

64805
E320_LUC.C
OLR 1180

LYCEE BEL-AIR
BTS Analyse Agricole,
Biologique et Biotechnologique

**Contribution à l'étude du
cycle de
*Marteilia refringens***

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

Par

Marion LUCAS
Rapport de stage (juillet-septembre 2000)



Clares par Pierre dauphin

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 01180

Ifremer

Remerciements

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à Monsieur André Gérard, directeur de station, pour m'avoir permis de réaliser ce stage de 3 mois au sein du laboratoire Ifremer de génétique et pathologie de Ronce-les-Bains.

Merci également à Monsieur Frank Berthe, mon maître de stage qui a su éclairer ma lanterne pendant ces 3 mois.

Merci à Mademoiselle Corinne Audemard, thésarde avec qui j'ai beaucoup appris, même à enfiler les bottes jaunes et la blouse verte pour laver les huîtres à la brosse à ongles évidemment.

Une pensée également aux deux supères bretonnes Madame Nathalie Cochennec et Mademoiselle Frédérique Le Roux pour leurs conseils, leurs joies et leurs inoubliables éclats de rire.

Je remercie aussi Isabelle Arzul, Dimitri Moreau, Maeva Robert et Sarah Desbois pour leur aide précieuse.

Merci aussi aux autres stagiaires Béatrice Verdon, Loïc Raspail, Sophie Remoué et Sébastien Billy pour leur sympathie au laboratoire comme à la maison des stagiaires.

Sans oublier tous les autres membres du laboratoire : Delphine Rousic, Serge Heurtebise, Olivier Courtois, Stéphane Robert, Flo, Greg, Bruno, Christophe, Kéké et sa trottinette, Jean-Luc et les autres avec qui j'ai pu progresser dans la joie et la bonne humeur.

Sommaire

	Page :
Liste des abréviations	3
I. Présentation de l'Ifremer	4
1.1. Objectifs	5
1.2. Programmes	6
II. Petite histoire de l'huître	7
III. Introduction	8
IV. Matériel et méthodes	9
4.1. Lyse cellulaire	9
4.2. Extraction des acides nucléiques	10
4.3. Contrôle de l'ADN	11
4.4. Principe de la PCR	11
4.4.1. Les "acteurs" de la PCR	12
4.4.2. La réaction	12
4.4.2.1. Que se passe-t-il à chaque étape ?	13
4.4.2.2. Que se passe-t-il à chaque cycle ?	14
4.5. Recherche de l'ADN du parasite	15
4.5.1. Les amorces	15
4.5.2. PCR de contrôle	16
4.5.3. Recherche de l'ADN du parasite <i>Marteilia refringens</i>	18
V. Résultats	21
5.1. Espèces analysées	21

5.2. Contrôle de l'ADN	21
5.2.1. Résultat obtenu pour <i>Abra ovata</i>	21
5.2.2. Résultat obtenu pour <i>Anguilla anguilla</i>	22
5.2.3. Résultat obtenu pour <i>Balanus improvisus</i>	22
5.2.4. Résultat obtenu pour <i>Corophium volutator</i>	23
5.3. PCR de contrôle	24
5.3.1. Résultat obtenu pour <i>Abra ovata</i>	24
5.3.2. Résultat obtenu pour <i>Anguilla anguilla</i>	24
5.3.3. Résultat obtenu pour <i>Balanus improvisus</i>	25
5.3.4. Résultat obtenu pour <i>Corophium volutator</i>	25
5.3.5. Conclusion générale sur la PCR de contrôle	26
5.4. Recherche de l'ADN du parasite <i>Marteilia refringens</i>	27
5.4.1. Résultat obtenu pour <i>Anguilla anguilla</i>	27
5.4.2. Résultat obtenu pour <i>Balanus improvisus</i>	28
5.4.3. Conclusion générale sur la PCR de détection	28
VI. Discussion	30
VII. Bibliographie	32

Liste des abréviations

Ifremer : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer.

CREAA : Centre Régional d'Expérimentation et Application Aquacoles.

EPIC : Etablissement Public à Caractère Industriel et Commercial.

LGP : Laboratoire de Génétique et Pathologie.

DEL : Département Environnement du Littoral

LCPC : Laboratoire Côtier de Poitou Charente

DRA : Direction des Ressources aquacoles.

DRV : Direction des Ressources Vivantes.

OIE : Office International des Epizooties.

PCR : Polymerase Chain Reaction, Réaction de Polymérisation en Chaîne.

ADN : Acide déoxyriboNucléique.

ARN : Acide RiboNucléique.

EDTA : Ethylène Diamine Tetra-acétique Acide, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2, 2H_2O$

SDS : sodium Dodécil Sulfate.

I. PRÉSENTATION DE L'IFREMER

L'Ifremer est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC), créé par décret du 5 juin 1984 ; il est le seul organisme français à vocation entièrement maritime. Il est placé sous tutelle conjointe des ministères de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie, de l'Agriculture et de la pêche, de l'Equipement, des Transports et du Logement.

L'Ifremer est présent dans 24 sites répartis sur tout le littoral métropolitain et dans les DOM-TOM. L'Institut est composé de 5 centres (Boulogne, Brest, Nantes, Toulon et Tahiti) et d'une vingtaine de stations rattachées à ces centres. Le siège est à Issy-les-Moulineaux.

L'Ifremer propose de nombreux services et produits ayant trait à la recherche et à l'exploitation de la mer. Ils couvrent un vaste domaine allant de la diffusion d'informations sur les résultats de programmes de recherche, à la prestation s'appuyant sur les compétences scientifiques et techniques et les moyens d'investigation du domaine marin, qui sont la spécificité de l'Institut.

Située au cœur du bassin ostréicole de Marennes-Oléron, la station Ifremer de La Tremblade est composée de trois laboratoires qui développent des recherches dans les domaines de la surveillance de l'environnement littoral. Il y a le Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), le Laboratoire Conchylicole du Poitou Charente (LCPC) et le Département Environnement du Littoral (DEL).

Le Laboratoire de Génétique et Pathologie, spécialisé en génétique et pathologie des bivalves marins, est rattaché au Département des Ressources Aquacoles (DRA) lui-même faisant partie de la Direction des Ressources Vivantes (DRV) de l'Ifremer.

La station de La Tremblade était jusqu'au début de l'année 1999 implantée sur deux sites différents, Mus du loup et Ronce-les-Bains, ce qui ne facilitait pas les échanges entre les équipes ni les aspects logistiques. Les nouveaux locaux ont permis de réunir les équipes scientifiques de Mus du Loup et de Ronce les bains, et de prévoir de nouveaux laboratoires, notamment le premier laboratoire de bactériologie accrédité Ifremer. Le laboratoire de

Génétique et Pathologie a bénéficié dans cette extension d'un nouveau conservatoire de souches, d'une salle de bactériologie, de 6 nouveaux bureaux pour l'équipe de génétique et de divers locaux communs aux trois laboratoires (salles de réunion, bibliothèque...).

1.1. Objectifs :

Les principaux objectifs du laboratoire, visent essentiellement à développer des programmes chez les mollusques bivalves marins dans les domaines suivant :

- **la pathologie** : surveillance des ressources conchylicoles, identification des agents pathogènes, de leurs cycles de développement, mise au point de techniques de reproduction expérimentale des maladies, développement d'outils performants de diagnostic utilisables à des fins de recherche ou de contrôle, étude de l'impact de ces maladies et de leur évolution géographique et temporelle.

- **la génétique** : testage de nouvelles espèces, de nouvelles populations et d'hybridation pour limiter les risques liés à la monoculture, obtention de souches résistantes ou tolérantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent en cause les productions, création de souches ou de lignées présentant de meilleures performances de croissance, de qualité de chair, une meilleure adaptation aux conditions de milieu d'élevage ou éventuellement de faibles besoins métaboliques, pour améliorer la productivité des entreprises.

Le laboratoire Ifremer de La Tremblade est laboratoire de référence pour l'Office International des Epizooties (OIE), et par directive européenne (95/70 CE), laboratoire communautaire de référence pour les maladies des mollusques bivalves marins.

Les fonctions de ce laboratoire consistent notamment en l'entretien d'un ensemble de lames et de cultures d'agent pathogènes, la mise au point de méthodes de diagnostic des principaux agents pathogènes, l'établissement et la mise à jour de synthèses bibliographiques, ainsi que la collaboration avec les experts de la Communauté et des pays tiers en matière de pathologie des mollusques bivalves marins.

Toutefois, la position de laboratoire de référence en matière de pathologie et de génétique implique que certaines des études ou action de recherche débordent du cadre strict de mollusques.

1.2. programmes :

Le plan stratégique 1996-2000 de l'Ifremer fixe les axes stratégiques et les actions de développement technologique et industriel de l'Institut. Dans ce cadre, onze thèmes fédérateurs regroupant les grands objectifs et domaines d'intérêt prioritaire de l'Institut ont été définis.

Les travaux du laboratoire LGP s'inscrivent dans deux de ces thèmes, avec les suivants :

- Thème : OBSERVATION ET SURVEILLANCE DE LA MER COTIERE.
Programme : Surveillance et évaluation des ressources côtières.

- Thème : OPTIMISATION ET DEVELOPPEMENT DES PRODUCTIONS AQUICOLES.
Programme : ⇒ Santé des populations d'élevage.
⇒ Amélioration génétique des espèces aquicoles.

II. PETITE HISTOIRE DE L' HUITRE



Palourdes, clams, praires, coques, pétoncles, bigorneaux, buccins, oursins foisonnent sur nos côtes et font cortège, sur les plateaux de fruits de mer, au coquillage roi, l'huître.

Elle restaure et désaltère mieux que nul fruit. Il faut dire qu'elle même, entre ses deux coques de calcite et d'araganite, consomme de 5 à 20 litres d'eau de mer par heure, pour ne retenir que les substance nutritives.

L'huître plate « *Ostrea edulis* » est consommé depuis plusieurs siècles. Les romains en dégustaient lors de leurs festins. Louis XIV préférait l'huître plate des Charentes, qui prennent une couleur verte par une longue station au fond d'anciens marais salant (les claires), quant à Louis XVI, il demanda que l'huître plate de Bretagne fut désormais portée à sa table, créant par la même, l'engouement des gens de la cour puis de la noblesse qui se devait de suivre.



III. INTRODUCTION

Lors des 30 dernières années, deux graves épidémies dues à des protozoaires parasites ont considérablement affaibli la production française d'huîtres plates *Ostrea edulis*. L'un de ces agents pathogènes, *Marteilia refringens* est responsable de la maladie des Abers ou Martellose apparue au cours de l'année 1968 (Bonami et Grizel, 1971) dans un petit estuaire du nord de la Bretagne. Ce parasite affecte la glande digestive de l'huître plate et provoque des mortalités dramatiques au sein des élevages. En 1979 l'apparition de *Bonamia ostreae*, parasite des hémocytes d'*Ostrea edulis*, a accentué la chute de cette production d'huîtres plates françaises.

Ces deux épidémies reflètent la fragilité de la production ostréicole vis-à-vis des agents pathogènes. La lutte contre les maladies des bivalves marins est confrontée à plusieurs problèmes dus en partie aux particularités de culture en milieu ouvert. L'utilisation de substances anti-infectieuses déversées dans l'eau n'est pas envisageable car elle nécessiterait la mise en œuvre de quantités très importantes dont les risques pour l'environnement ainsi que le coût ne peuvent être négligés. D'autre part, il n'est pas possible de protéger ces animaux en stimulant la production d'anticorps protecteurs, par la vaccination du fait de l'absence de réponse immunitaire. En conséquence, la seule solution envisageable actuellement est la gestion du risque de contamination soit par la sélection génétique d'animaux tolérants ou résistants à ces agents pathogènes soit par la connaissance exacte du cycle parasitaire et du lieu de contamination pour éviter une expansion et un transport de la maladie vers des zones saines.

De récentes études de génétique ont permis de sélectionner des huîtres plates *Ostrea edulis* tolérantes au parasite *Bonamia ostreae* (Baud et al., 1997). Cependant, cette même expérience n'a pas pu être réalisée pour *Marteilia refringens*, ce qui limite la lutte contre la martellose à la connaissance du cycle parasitaire.

Les travaux réalisés sur *Marteilia refringens*, privilégient les hypothèses d'un ou plusieurs hôtes, et/ ou de l'existence d'une phase libre du parasite ainsi que la possibilité d'une phase de maturation dans le sédiment. Cependant, il ne s'agit pour l'instant que d'hypothèses.

Un des sujets de recherche du laboratoire de La Tremblade a pour but de tester l'hypothèse de l'existence d'un ou de plusieurs hôtes dans le cycle de *Marteilia refringens* par la recherche systématique du parasite dans la faune associée aux huîtres plates.

Dans la zone endémique de *Marteilia refringens*, il a été vérifié préalablement que le cycle parasitaire restait fonctionnel pour des huîtres cultivées en claires ostréicoles. Ces bassins, traditionnellement utilisés pour l'élevage et l'affinage des huîtres, sont soumis à de larges variations thermiques et halines. Par conséquent, la richesse spécifique des claires

est dix à cent fois plus faible que sur l'estran (zone de balancement des marées) de Marennes-Oléron.

A la différence des techniques de détection telles que l'histologie ou l'immunologie, l'utilisation d'outils de biologie moléculaire présentent l'avantage d'avoir pour cible l'ADN du parasite, c'est-à-dire une molécule dont les caractéristiques se conservent quel que soit le stade du parasite. La mise au point de ces techniques résulte du séquençage du gène 18S de *Marteilia refringens* obtenu récemment et à partir duquel des amorces ont été réalisées (Le Roux *et al.* 1999, Berthe *et al.* 2000).

La recherche de *Marteilia refringens* est effectuée grâce à des outils de biologie moléculaire au sein de la faune des claires ostréicoles.

Au cours des deux dernières années, le laboratoire a entrepris un échantillonnage des différentes espèces de la claire dans le but de faire un suivi mois par mois de la présence ou non de l'ADN du parasite *Marteilia refringens*. En tout 80 espèces ont été identifiées au sein de la claire ostréicole. Toutes les espèces sont, les unes après les autres analysées par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) pour détecter la présence de l'ADN du parasite.

Les stades de développement du parasite au sein de l'huître plate *Ostrea edulis* sont bien connus du point de vue structural. Le parasite évolue par une succession de divisions endogènes aboutissant à la formation de sporanges relargués dans l'environnement.

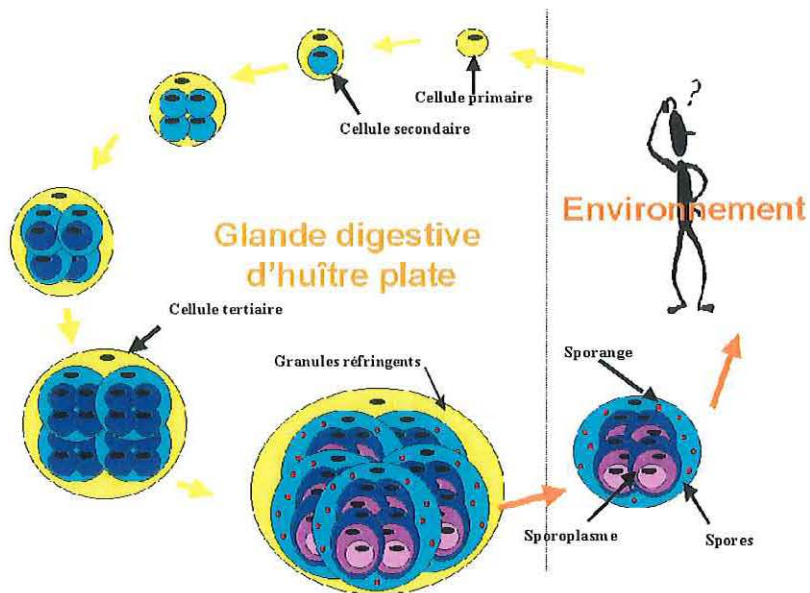


Figure 1 : Cycle de *Marteilia refringens*

La mise en évidence des hôtes intermédiaires de *Marteilia refringens* pourrait permettre la recherche d'une solution relative au déclin de la production d'*Ostrea edulis* ainsi qu'un système de prévention.

IV. MATERIEL ET METHODES

Après un échantillonnage dans la claire ostréicole située sur l'île d'Oléron (sur le site du CREAA, Centre Régional d'Expérimentation et d'Applications Aquacoles), les différentes espèces identifiées (zooplancton, macrofaune, meiofaune) sont conservées dans des tubes ou des pochettes à -80°C.

Lors de l'échantillonnage il a été fixé un pallié de 30 individus par mois pour chaque espèce ceci correspondant à une stratégie statistique.

Taille de la population	2% d'incidence de la maladie	5% d'incidence de la maladie	10% d'incidence de la maladie
50	46 (50)	29 (30)	20 (20)
100	76 (80)	43 (45)	23 (25)
250	110 (110)	49 (50)	25 (25)
500	127 (130)	54 (55)	27 (30)
1 000	136 (140)	55 (55)	27 (30)
2 500	142 (145)	56 (60)	27 (30)
5 000	142 (145)	57 (60)	27 (30)
10 000	146 (150)	57 (60)	27 (30)
100 000	147 (150)	57 (60)	27 (30)
1 000 000	147 (150)	57 (60)	27 (30)
>1 000 000	150 (150)	60 (60)	30 (30)

Tableau 1: taille minimal de l'échantillon nécessaire pour obtenir un intervalle de confiance de 95% pour trouver au moins un individu infecté à différente prévalence et taille de population.

4.1. Lyse cellulaire :

Lors de cette étape notre but est de libérer l'ADN et l'ARN des tissus. Pour y parvenir on utilise une enzyme la protéinase K à 0.2 mg/ml, qui dégrade les protéines, en association avec une solution de lyse contenant du SDS à 0.5 % (détergent qui permet de lyser les membranes) ainsi que du chlorure de sodium à 100mM, du Tris à 10 mM (pH 8) et de l'EDTA à 25 mM (pH 8).

Il faut environ 1 ml de solution d'extraction pour 100 mg de tissus. La solution est ajoutée aux tissus préalablement broyés dans des tubes qui sont plonger dans la glace pour

éviter que les DNases ne dégradent l'ADN, le tout est ensuite placé au bain-marie durant la nuit à 55°C.

4.2. Extraction des acides nucléiques :

Cette étape a pour but de purifier l'ADN et l'ARN de tous les autres composés c'est la déprotéinisation.

On prélève 500 µl du lysat, un volume équivalent de phénol et de chloroforme/ alcool isoamylique 24/1 sont mélangés. Le mélange est centrifugé 10 minutes à 10000 g. Lors de cet étape l'ADN reste dans la phase aqueuse et les "Déchets" (protéines, lipides ...) dans la phase phénolique. On prélève la phase aqueuse et l'on précipite l'ADN par 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3M, ph 5.4 et 2.5 volumes éthanol absolu, le tout pendant une demi-heure à -20°C.

On centrifuge les tubes (10 min à 10000 g) puis on rince le culot d'ADN avec de l'éthanol à 70%. Après un nouvelle centrifugation (10 min à 10000 g) on laisse sécher le culot d'ADN à l'air libre. L'ADN est ensuite dissout dans 50 µl de tampon TE (10mM Tris pH 7.4 et 1mM EDTA pH 8) puis on le conserve à 4 °C.

4.3. Contrôle de l'ADN :

Pour évaluer la quantité ainsi que la qualité de l'ADN on réalise une électrophorèse en gel d'agarose à 1%. Le gel est réalisé avec 1 g d'agarose dissout dans 100 ml de tampon TAE 1X (Tris base 242 g, 5701ml d'acide acétique et 100ml EDTA à 0.5 mM pH 8, le tout dilué au 20^{ème} pour avoir une solution à 1X), on ajoute 5 µl de Bromure d'éthidium, produit intercalant de l'ADN, présentant une fluorescence rose-orangée sous des UV courts (environ 300 nm). Le dépôt est constitué de 10 µl d'ADN mélangé à 2 µl de tampon de dépôt qui permet d'alourdir l'ADN pour qu'il migre au sein du gel et pour permettre au manipulateur de suivre cette migration. La migration est réalisé dans du tampon TAE 1X pendant une demi-heure à 90 volts puis visualisation aux UV de l'ADN.

4.4. Principe de la PCR :

Cette technique est appelée réaction de polymérisation en chaîne ou PCR. La PCR est une technique de biologie moléculaire mise au point en **1985** par **Karry Mullis**. C'est une technique d'**amplification génique**, c'est à dire qu'elle permet de repérer un

fragment d'ADN ou de gène précis, même présent en quantité infime dans un mélange, puis de le multiplier rapidement.

Le principe de la PCR est d'utiliser **de manière répétitive** l'une des propriétés des ADN polymérase : celle de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce.

4.4.1. Les "acteurs" de la PCR :

a- l'**ADN** sous forme bicaténaire (formé de 2 brins complémentaires), contenant le fragment du génome à amplifier. On le représente de cette manière :



b- deux **amorces**, sens et anti-sens : ce sont de petits brins d'ADN monocaténaire d'environ 20 paires de bases, (appelés oligonucléotides) capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.



c- une enzyme : la **Taq Polymerase** (Taq), une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

Taq

d- les 4 **nucléotides** : dGTP, dATP, dTTP, dCTP appelés globalement dNTP (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), qui sont les éléments de base utilisés par la Taq pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

4.4.2. La réaction :

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes :

1. dénaturation

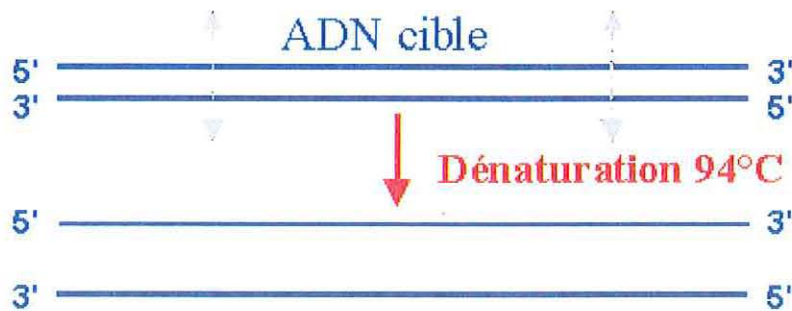
2. hybridation

3. élongation

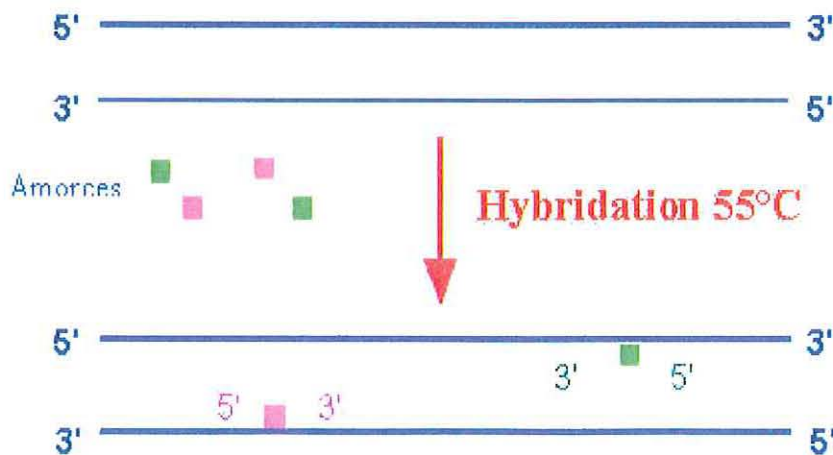
Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans les différentes cupules d'une micro plaques qui sera soumise aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de températures sont réalisés automatiquement dans un **thermocycleur**.

4.4.2.1. Que se passe-t-il à chaque étape ?

a. **dénaturation** : le tube est chauffé 1 minute à 94°C. Les doubles brins d'ADN se séparent. On dit alors que **l'ADN est dénaturé**.

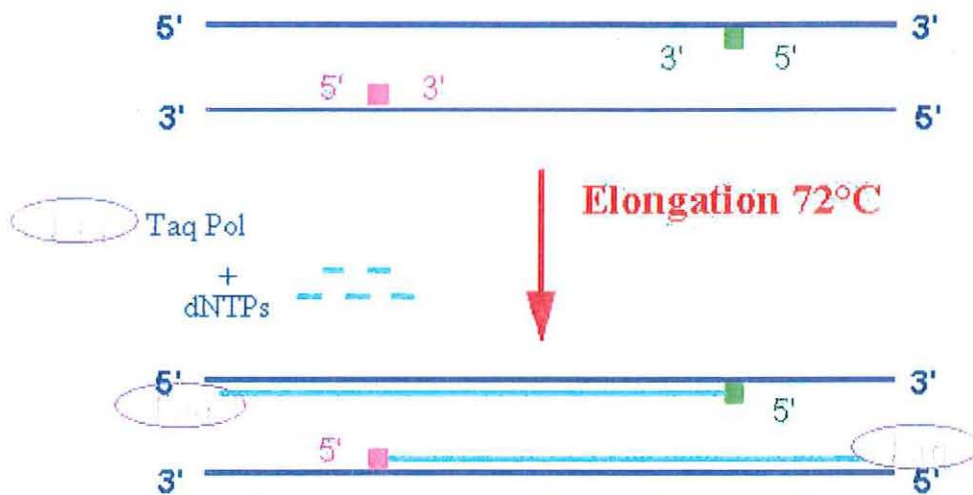


b. **hybridation** : La température est rapidement abaissée à 55°C. Les amorces "reconnaissent" leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN cibles. Elles s'hybrident chacune sur leur brin respectif. Cette étape dure une minute pour laisser le temps aux amorces de s'hybrider correctement.



c. **élongation** : La température est ensuite augmentée à 72°C, ce qui permet à la Taq Polymérase d'ajouter des nucléotides aux amorces hybridées, dans le sens 5' vers 3'. Cette étape dure 1 minute.

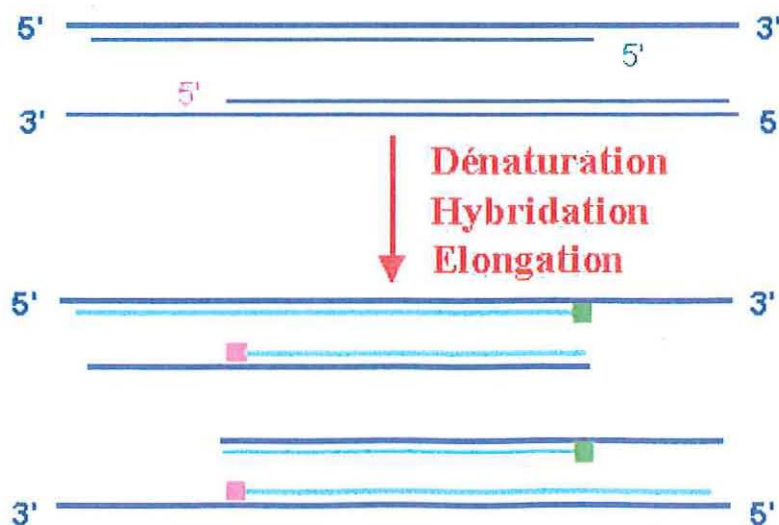
Un nouveau brin d'ADN, dont la séquence est complémentaire de celle du brin cible, est donc synthétisé.



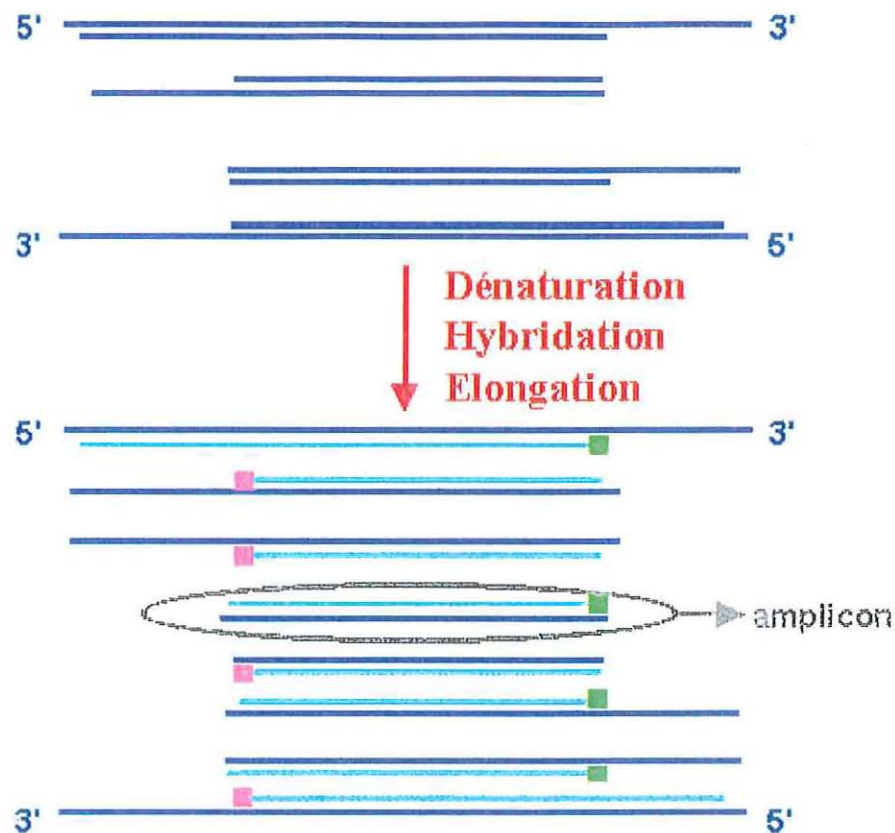
4.4.2.2. Que se passe-t-il à chaque cycle ?

Le premier cycle a permis de synthétiser autant de brins complémentaires (plus courts puisque bornés par une amorce) que de brins cibles présents dans le tube. Ils deviennent à leur tour des ADN cibles.

Au deuxième cycle, la quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins dont la taille est limitée par les deux amorces, font leur apparition.



Au troisième cycle apparaissent les premiers amplicons, ADN doubles brins bornés par les amorces, correspondants au fragment d'ADN recherché.



Au fil des cycles, la quantité d'amplicons va augmenter de façon exponentielle.

Une électrophorèse est ensuite réalisée dans les mêmes conditions que lors de l'étape de contrôle de l'ADN avec pour échantillon l'ADN ayant subi une PCR. La vitesse de migration étant dépendante du poids moléculaire, donc du nombre de bases de l'ADN testé, la présence et la taille des amplicons pourront ainsi être vérifiées.

4.5. Recherche de l'ADN du parasite :

4.5.1. Les amorces :

Lors de la manipulation il a été utilisé deux amorces différentes. Les amorces sont des séquences de bases homologues des extrémités du fragment à amplifier.

Il a été mis en évidence des zones conservées et spécifiques sur le gène (18S) codant pour la petite sous-unité ribosomale de *Marteilia refringens* (Berthe et al. 2000). Les

zones conservées étant identique à toutes les espèces de l'homme à *Marteilia refringens*, et les zones spécifiques étant propre à une espèce.

Au sein des zones conservées on a défini des amorces conservées et au sein des amorces spécifiques on a défini des amorces spécifiques du parasite *Marteilia refringens* (Le Roux et al. 1999).

Par conséquent les amorces conservées (amorces : CS1, CAS1) doivent théoriquement amplifier un fragment du gène quelque soit l'espèce, elle servent donc de contrôle interne de la réaction de PCR.

Les amorces spécifiques (amorces : SS2, SAS1) doivent amplifier une zone spécifique du gène 18S de *Marteilia refringens* ce qui permet de détecter l'ADN du parasite dans une espèce, et seulement cet ADN là.

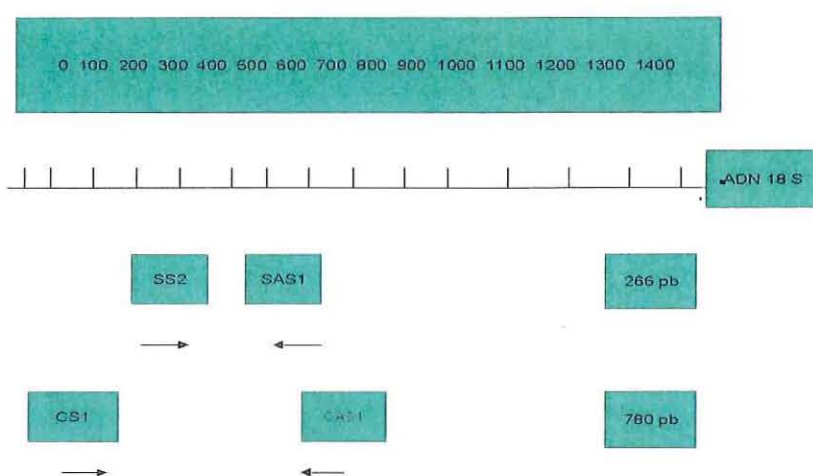


Figure 1 : schéma du gène 18S du parasite *Marteilia refringens* et position des amorces conservées (CS1, CAS1) et spécifiques du parasite (SS2, SAS1) utilisées au cours de cette étude.

4.5.2. PCR de contrôle :

L'amplification est réalisée sur un volume de 50 µl contenant 1 µl d'échantillon (ADN dissout), du tampon TP 10X, 2.5mM de chlorure de magnésium, 0.2 mM de nucléotides libres (ATP, GTP, TTP, CTP), le couple d'amorce (5' et 3' à 1mM) et 2 unités de Taq Polymérase.

Chaque cupule est recouverte d'huile minérale (2 gouttes) pour éviter l'évaporation puis la plaque est placée dans le thermocycleur.

Le thermocycleur effectue un cycle, tout d'abord une dénaturation de 4 min à 94°C puis il réalise 30 cycles de 1 min à 94°C (dénaturation), 1 min à 55°C (hybridation) et 1 min à 72°C (élongation), enfin le cycle se termine par une élongation de 10 min à 72°C pour que l'enzyme puisse terminer les brins d'ADN complémentaires commencés.

Une électrophorèse est ensuite réalisée en gel d'agarose à 1% pour le contrôle de l'ADN avec pour échantillon l'ADN ayant subi une PCR. La vitesse de migration étant dépendante du poids moléculaire, donc du nombre de bases de l'ADN testé, la présence et la taille des amplicons pourront ainsi être vérifiés.

Cette étape nous permet de déterminer à quelle dilution de l'ADN nous devons travailler pour obtenir une bonne amplification lors de la PCR de détection réalisée avec les amorces conservées et spécifiques.

→ Comment interprète t'on un gel après une PCR de contrôle ?

Nous avons pris comme exemple le cas d'une espèce faisant partie du groupe des Holothuries analysée au cours de cette étude.

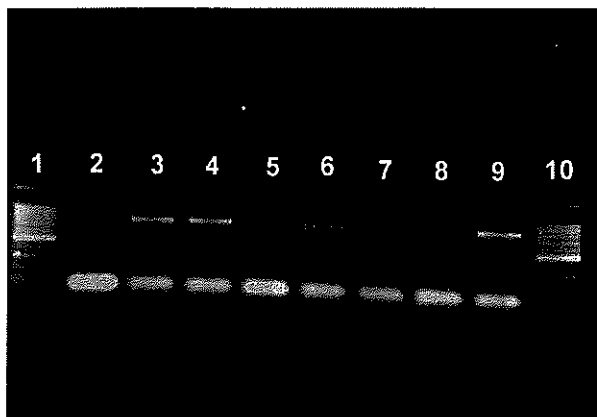


Figure 3 : migration réalisée après une PCR de contrôle avec les amorces conservées (CS1, CAS1) sur un gel d'agarose à 1%. (1 et 10-marqueur de taille, 2-témoin négatif, 3-ADN d'*Holothuries* non dilué, 4-ADN d'*Holothuries* dilué au 1/10^{ème}, 5-ADN d'*Holothuries* dilué au 1/100^{ème}, 6-ADN d'*Holothuries* non dilué plus ADN+, 7-ADN d'*Holothuries* dilué au 1/10^{ème} plus ADN+, 8-ADN d'*Holothuries* dilué au 1/100^{ème} plus ADN+, 9-témoin positif :ADN de *Marteilia refringens*)

Pour bien interpréter notre gel après une PCR de contrôle il faut comprendre à quoi correspondent les différentes bandes.

Les puits numéro 1 et 10 correspondent au marqueur de taille, chaque taille est représentée par une bande donc en partant du bas jusqu'à la bande la plus épaisse on a 100, 200, 300, 400 et 500 paires de bases puis vient ensuite 600, 700, 800, 900, 1000 et 1500 paires de bases. Ce marqueur permet de contrôler si l'on a bien amplifié le bon fragment d'ADN dans notre cas avec des amorces conservées (CS1 et CAS1) l'amplification doit apparaître à 780 paires de bases.

Le puits numéro 2 correspond au témoin négatif aucun ADN n'a été ajouté au mélange PCR, il nous permet de vérifier s'il n'y a pas de contamination lors de la préparation de la PCR.

Les puits 3, 4 et 5 correspondent à l'ADN à tester à des concentrations différentes (non dilué, dilué au 1/10^{ème}, dilué au 1/100^{ème}), cette gamme de dilution nous permet de visualiser à quel dilution de l'ADN on a la plus grande amplification. Ultérieurement en fonction de ce résultat on pourra réaliser une PCR de détection à la dilution donnant la plus grande amplification.

Les puits numéro 6, 7 et 8 correspondent à l'échantillon à ses différentes concentrations auxquelles on a ajouté de l'ADN de *Marteilia refringens* dilué au dixième dans ces différentes solutions. Cela nous permettra de mettre en évidence une éventuelle inhibition de la réaction d'amplification.

La bande numéro 9 correspond au témoin positif, il contient le mélange PCR plus de l'ADN de *Marteilia refringens*.

D'après la figure 3, la meilleur amplification d'ADN est obtenu pour la dilution au 1/10^{ème} (puits 3). On recherchera l'ADN de *Marteilia refringens* sur tous les ADN de cette espèce préalablement dilués au 1/10^{ème}.

4.5.3. Recherche de l'ADN du parasite *Marteilia refringens* :

Pour cette nouvelle PCR on suit la même démarche que pour la PCR de contrôle à ceci près que l'on prépare 2 mélanges PCR, l'un avec les amorces conservé (CS1, CAS1) et l'autre avec les amorces spécifiques de l'ADN du parasite (SS2, SAS1).

Le mélange PCR contenant les amorces conservé nous servira de témoin d'amplification pour chacun des ADN à tester où l'ADN de *Marteilia refringens* sera recherché. Le mélange PCR contenant les amorces spécifiques servira à la détection de l'ADN du parasite.

→ Comment interprète t'on un gel d'agarose après une PCR de détection ?

Nous avons pris comme exemple le cas d'une espèce faisant partie du groupe des Balanes analysée au cours de cette étude.

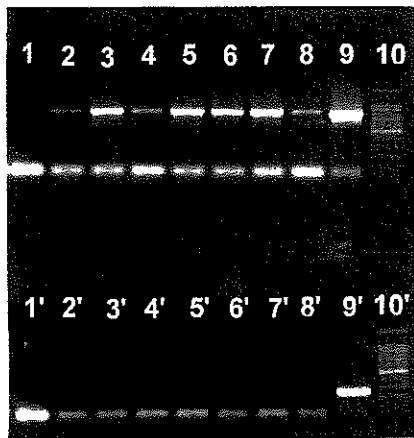


Figure 4 : migration réalisé après une PCR de détection avec des amorces spécifique (SS2, SAS1) sur un gel d'agarose à 1%. (Les puits de 1 à 10 ont été amplifié avec les amorces conservées (CS1, CAS1), les puits de 1' à 10' ont été amplifié avec les amorces spécifiques (SS2, SAS1) 10 et 10'-marqueur de taille, 1 et 1'-témoin négatif, 9 et 9'-témoin positif : ADN de *Marteilia refringens*, 2 à 8-*B.improvisus* au 100ème avec amorces conservées, 2' à 8'-*B.improvisus* au 100ème avec amorces spécifiques)

Analyse de la PCR réalisé avec les amorces conservées (CS1, CAS1).

Le puits 10 contient le témoin positif : ADN du parasite, on vérifie qu'il y a amplification et qu'il est bien à 780 paires de bases.

Les puits de 2 à 9 contiennent l'ADN des échantillons à analyser, en correspondance avec la PCR de contrôle on doit obtenir une bonne amplification de l'ADN ce qui est vérifié sur la figure 4.

Analyse de la PCR avec les amorces spécifiques (SS2, SAS1).

Le puits 10' est le témoin positif : ADN du parasite, on vérifie qu'il y a amplification et qu'il est bien à 266 paires de bases.

Les puits de 2' à 9' contiennent les même échantillon à analyser que les bandes de 2 à 9. La différence vient que le mélange PCR contient les amorces (SS2 et SAS1) spécifique de l'ADN de *Marteilia refringens*, donc si l'on observe une bande d'amplification à ce niveau cela signifierait que notre échantillon contiendrait de l'ADN du parasite. Sur la figure 4 on observe aucune amplification donc on peut conclure que cette espèce ne contient d'ADN de *Marteilia refringens*.

TAXONOMIE DES DIFFERENTES ESPECES ETUDIEES			
PHYLUM	CLASSE	ORDRE	ESPECE
Phylum des Mollusques			
	Classe des Gastropodes		
			<i>leucophytia bidentata</i>
		ordre des Bullomorpha	<i>Haminea hydatis</i>
	Classe des Bivalves		
		ordre des Veneroïda	<i>Abra ovata</i>
Phylum des Poissons			
	Classe des Poissons		
		ordre des Apodes	<i>Anguilla anguilla</i>
Phylum des Crustacés			
	Classe des Cirripèdes		
		Ordre des Thoracica	<i>Balanus improvisus</i>
	Classe des Malacostracés		
		Ordre des Isopodes	<i>Idothea chelipes</i>
			<i>Isopode</i>
		Ordre des Amphipodes	<i>Corophium volutator</i>
			<i>Corophium sp.</i>
		Ordre des Décapodes	<i>Crangon crangon</i>
			<i>Paleomon serratus</i>
			<i>paleomonetes varians</i>
phylum des Annelida			
	Classe des Oligocheata		
			<i>Tubificoides benedeni</i>
Phylum des Echinodermata			
	Classe des Holothuriidae		
			<i>Holothuries</i>
Phylum des Insecta			
			larves d'insectes
			Nom indéterminé

Tableau 2 : Taxonomie des différentes espèces étudiées

V.RESULTATS

5.1. Espèces analysées :

Le tableau 2 regroupent l'ensemble des espèces étudiées au cours de ce stage. 16 espèces ont été analysées durant cette période.

Le tableau 3 regroupent le nombre d'individus prélevés à différentes dates d'échantillonnage.

On remarque que pour certaines dates il n'y a pas eu de prélèvement et que les prélèvements ne sont pas toujours de 30 individus par espèces et par dates. Chaque espèces ayant ses particularités de saison et de quantité dans la claire il a été difficile effectuer un échantillonnage de 30 individus par espèces et par dates.

En effet il n'a pas toujours été possible de prélever 30 individus de chaque espèces de part leur abondance et l'influence des saisons sur leur présence.

Au cours de l'analyse de ces différentes espèces, 5 types différents ont été mis en évidence. Pour les illustrer l'analyse de 4 espèces a été détaillée :

- Le bivalve ; *Abra ovata*
- L'anguille ; *Anguilla anguilla*
- Les balanes ; *Balanus improvisus*
- Le crustacé ; *Corophium volutator*

Toutes ces espèces étaient conservées à - 80°C après leur échantillonnage, voici les résultats obtenus étape par étape.

5.2. Contrôle de l'ADN :

5.2.1. Résultat obtenu pour *Abra ovata* :

La migration de l'ADN a été obtenue après extraction sur 30 *Abra ovata* à raison de 5 individus par tubes. Nous analysons donc 6 extraits d'ADN.

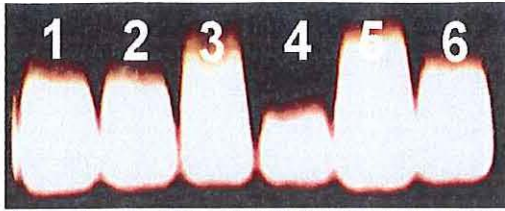


Figure 5 : migration d'ADN d'*Abra ovata* sur gel d'agarose à 1%.(ADN de 5 individus par puits)

Sur la figure 5 on voit que l'ADN de cet espèce est totalement dégradé, mais une PCR de contrôle a été réalisée sur le tube numéro 1 .

5.2.2. Résultat obtenu pour *Anguilla anguilla* :

la migration de l'ADN a été obtenue après extraction sur 4 Anguilles à raison de 2 individus par tubes. Nous analysons donc 2 extraits d'ADN.

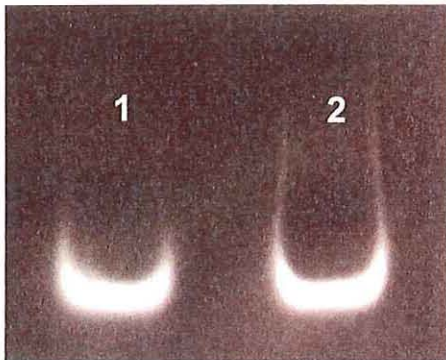


Figure 6 : migration d'ADN d'*Anguilla anguilla* sur gel d'agarose à 1%.(ADN de 2 individus par puits)

Sur la figure 6 on voit de l'ADN totalement dégradé cela peut être dû à une présence de sels ce qui lui donne cette forme particulière, mais une PCR de contrôle a été réalisée sur le tube numéro 1.

5.2.3. Résultat obtenu pour *Balanus improvisus* :

la migration de l'ADN a été obtenue après extraction sur 30 balanes à raison de 4 à 5 individus par tubes. Les Balanes étant de grosseur différente les tubes de 4 individus contenait de grosses Balanes et les autres de petites Balanes. Nous analysons donc 7 extraits d'ADN.

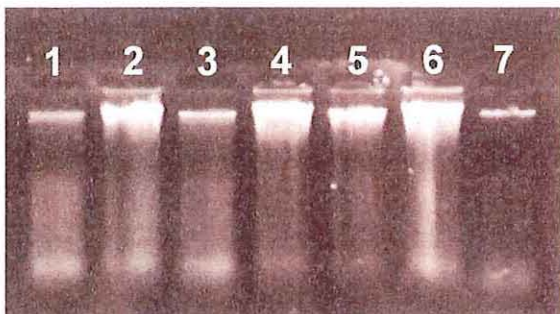


Figure 7 : migration d'ADN de *Balanus improvisus* sur gel d'agarose à 1%.(ADN de 4 à 5 individus par puits)

Sur la figure 7 on note la présence d'ADN non dégradé. On remarque qu'il n'y a pas homogénéité de la quantité d'ADN dans les différents puits ceci pouvant venir du problème de taille rencontré lors de la préparation de l'échantillon. En observant la figure 7 on peut conclure que les puits 2, 4, 5 et 6 contiennent plus d'ADN que les puits 1, 3 et 7. On réalise une PCR de contrôle sur le tube numéro 1.

5.2.4. Résultat obtenu pour *Corophium volutator* :

La migration de l'ADN a été obtenue après extraction sur 32 *Corophium volutator* à raison de 5 individus par tubes pour les tubes 1, 2, 3 et 4 puis 6 individus par tubes pour les tubes 5 et 6. Nous analysons donc 6 extraits d'ADN.

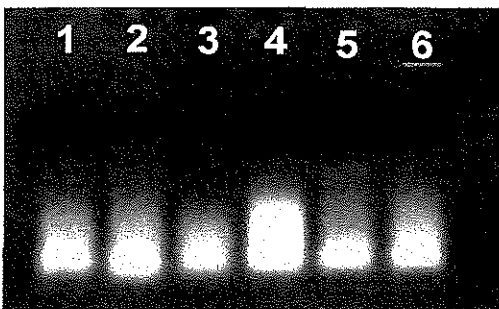


Figure 8 : migration d'ADN de *Corophium volutator* sur gel d'agarose à 1%. (ADN de 5 à 6 individus par puits)

Sur la figure 8 on observe de l'ADN totalement dégradé sauf pour le puits 6 où une légère bande d'ADN n'est pas dégradé. On réalise une PCR de contrôle sur le tube 6.

5.3. PCR de contrôle :

5.3.1. Résultat obtenu pour *Abra ovata* :

Migration obtenu après une PCR de contrôle réalisée sur da l'ADN dégradé d'*Abra ovata*.

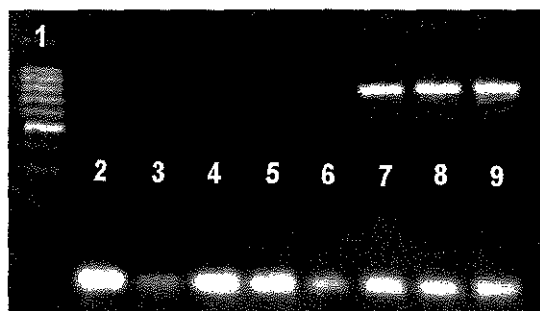


Figure 10 : migration réalisé sur gel d'agarose à 1% après une PCR de contrôle avec les amorces (CS1 et CAS1).(1-marqueur de taille, 2-témoin négatif, 3-*A.ovata* non dilué, 4-*A.ovata* dilué au 1/10^{ème}, 5-*A.ovata* dilué au 10/100^{ème}, 6-*A.ovata* non dilué plus ADN+, 7-*A.ovata* dilué au 1/10^{ème} plus ADN+, 8-*A.ovata* dilué au 1/100^{ème} plus ADN+, 9-témoin positif : ADN de *Martellia refringens*)

Sur la figure 10 on remarque que le témoin positif est correct (puits 9). Il y a amplification de l'ADN en présence d'ADN positif (puits 7 et 8) sauf pour l'ADN non dilué (puit 6) ou il y a inhibition. Il n'y a pas d'amplification sur les dilutions simples (puits 3, 4 et 5) donc soit il n'y a pas assez d'ADN soit il y a inhibition notamment pour l'ADN non dilué (peut-être du à la coquille).

D'après ces résultat, l'ADN de l'espèce *Abra ovata* ne permet pas une amplification convenable avec des conservées (CS1, CAS1). Par conséquent, il ne sera pas possible de rechercher l'ADN de *Martellia refringens* au sein des ADN de cette espèce.

5.3.2. Résultat obtenu pour *Anguilla anguilla* :

Migration obtenu après une PCR de contrôle réalisé sur de l'ADN dégradé d'*Anguilla anguilla*.



Figure 11 : Migration réalisé sur un gel d'agarose à 1% après une PCR de contrôle avec les amorces (CS1 et CAS1).(1 et 10-marqueur de taille, 2-témoin négatif, 3-*A.anguilla* non dilué, 4-*A.anguilla* dilué au 1/10^{ème}, 5-

A.anguilla dilué au 1/100^{ème}, 6-*A.anguilla* non dilué plus ADN+, 7-*A.anguilla* dilué au 1/10^{ème} plus ADN+, 8-*A.anguilla* dilué au 1/100^{ème} plus ADN+, 9-témoin positif : ADN de *M.refringens*)

Sur la figure 11 on observe que l'ADN de *Marteilia refringens* a été amplifié (puits 9). On remarque aussi que pour les dilutions contenant de l'ADN positif (puits 7 et 8) il y a amplification sauf pour le puits 6 où il y a inhibition. Pour les dilutions simples (puits 3, 4 et 5) il y a une très légère amplification pour la dilution au dixième (puits 4).

D'après ces résultats, l'ADN de l'espèce *Anguilla anguilla* permet une amplification convenable avec des conservées (CS1, CAS1) à la dilution au dixième. Par conséquent, il sera possible de rechercher l'ADN de *Marteilia refringens* au sein de tous les ADN de cette espèce préalablement dilué au dixième.

5.3.3. Résultat obtenu pour *Balanus improvisus* :

Migration obtenue après une PCR de contrôle réalisée sur de l'ADN non dégradé de *Balanus improvisus*.

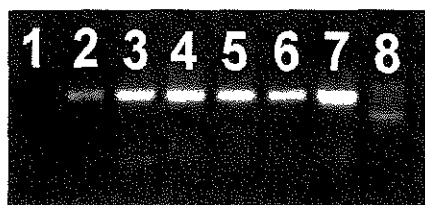


Figure 12 : migration réalisée sur un gel d'agarose à 1% après une PCR de contrôle avec les amorces (CS1 et CAS1). (1-*B.improvisus* non dilué, 2-*B.improvisus* dilué au 1/10^{ème}, 3-*B.improvisus* dilué au 1/100^{ème}, 4-*B.improvisus* non dilué plus ADN+, 5-*B.improvisus* dilué au 1/10^{ème} plus ADN+, 6-*B.improvisus* dilué au 1/100^{ème} plus ADN+, 7-témoin positif : ADN de *M.refringens*, 8-marqueur de taille)

Sur la figure 12 on remarque que l'ADN de *Marteilia refringens* a été amplifié (puits 7). On remarque aussi que pour les dilutions contenant l'ADN positif (puits 4, 5 et 6) il y a amplification. Pour les dilutions simples (puits 1, 2 et 3) la meilleure amplification est obtenue avec la dilution au centième de l'ADN de *Balanus improvisus*.

D'après ces résultats, l'ADN de l'espèce *Balanus improvisus* permet une amplification convenable avec des conservées (CS1, CAS1) à la dilution au centième. Par conséquent, il sera possible de rechercher l'ADN de *Marteilia refringens* au sein de tous les ADN de cette espèce préalablement dilué au centième.

5.3.4. Résultat obtenu pour *Corophium volutator* :

Migration obtenue après une PCR de contrôle réalisée sur de l'ADN non dégradé de *Corophium volutator*.

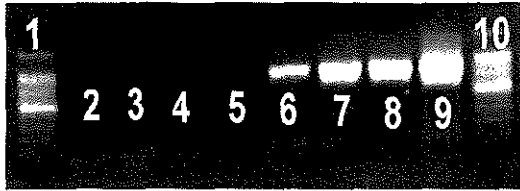


Figure 13 : migration réalisé sur gel d'agarose à 1% après une PCR de contrôle avec les amorces (CS1 et CAS1). (1 et 10-marqueur de taille, 2-témoin négatif, 3-*C.volutator* non dilué, 4-*C.volutator* dilué au 1/10^{ème}, 5-*C.volutator* dilué au 1/100^{ème}, 6-*C.volutator* non dilué plus ADN+, 7-*C.volutator* dilué au 1/10^{ème} plus ADN+, 8-*C.volutator* dilué au 1/100^{ème} plus ADN+, 9-témoin positif : ADN de *M.refringens*)

Sur la figure 13 on remarque que le témoin positif est correct (puits 9). Il y a amplification de l'ADN en présence d'ADN positif (puits 6, 7 et 8). Il n'y a pas d'amplification sur les dilutions simples (puits 3, 4 et 5) donc il n'y a pas assez d'ADN.

D'après ces résultat, l'ADN de l'espèce *Corophium volutator* ne permet pas une amplification convenable avec des amorces conservées (CS1, CAS1). Par conséquent, il ne sera pas possible de rechercher l'ADN de *Martellia refringens* au sein des ADN de cette espèces.

5.3.5. conclusion générale sur la PCR de contrôle :

Sur les 16 espèces analysées, 7 espèces (*Abra ovata*, *Corophium volutator*, *Crangon crangon*, *leucophytia bidentata*, *Haminea hydatis*, *Idothea chelipes* et *Isopodes*) n'ont pas permit une amplification convenable avec des amorces conservées (CS1, CAS1). Par conséquent, il n'a pas été possible de rechercher l'ADN de *Martellia refringens* au sein des ADN de ces espèces. Mais 9 espèces (*Anguilla anguilla*, *Balanus improvisus*, *Corophium* sp., *Paleomon serratus*, *Paleomonetes Varians*, *Tubificoïdes benedeni*, *Holothuries*, les larves d'insectes et l'espèces dont le nom et indéterminé) ont permit une amplification convenable avec les amorces conservées (CS1, CAS1). Par conséquent, il a été possible de rechercher l'ADN de *Martellia refringens* au sein de tous les ADN de ces espèces à la dilution donnant la meilleure amplification pour chacune.

5.4. Recherche de l'ADN du parasite *Marteilia refringens* :

D'après les résultats de la PCR de contrôle prise en exemple seules les espèces *Anguilla anguilla* et *Balanus improvisus* permettent une poursuite de manipulation. Pour les autres espèces n'ayant pas été amplifiées à la PCR de contrôle la recherche de l'ADN du parasite ne pourra pas être effectuée.

5.4.1. Résultat obtenu pour *Anguilla anguilla* :



Figure 15 : migration réalisée sur gel d'agarose à 1% après une PCR de détection. (Les puits de 1 à 5 ont été amplifiés avec les amorces conservées (CS1, CAS1), les puits de 1' à 5' ont été amplifiés avec les amorces spécifiques (SS2, SAS1) 1 et 1' - marqueur de taille, 2 et 2' - témoin négatif, 5 et 5' - témoin positif : ADN de *M.refringens*, 3 et 4 - *A.anguilla* au 10^{ème} avec amorces conservées, 3' et 4' - *A.anguilla* au 10^{ème} avec amorces spécifiques)

Analyse de la PCR réalisée avec les amorces conservées (CS1, CAS1).

Sur la figure 15 on remarque que le témoin positif est correct (puits 5). Il y a amplification de l'ADN d'*Anguilla anguilla* dans le puits 3 mais pas le 4. On pourra conclure pour cette espèce en s'appuyant que sur le puits 3.

Analyse de la PCR avec les amorces spécifiques (SS2, SAS1).

Sur la figure 15 on remarque que le témoin positif est correct (puits 5'). Il n'y a pas amplification de l'ADN d'*Anguilla anguilla* dans le puits 3'.

D'après ces résultats, cela signifie que l'espèce *Anguilla anguilla* ne contient d'ADN de *Marteilia refringens*. Cependant il faut noter que seul 1 échantillon (soit 2 individus) a été

analysé. Il reste donc difficile de conclure sur le fait que cette espèce fasse ou non partie du cycle de *Marteilia refringens*.

5.4.2. Résultat obtenu pour *Balanus improvisus* :

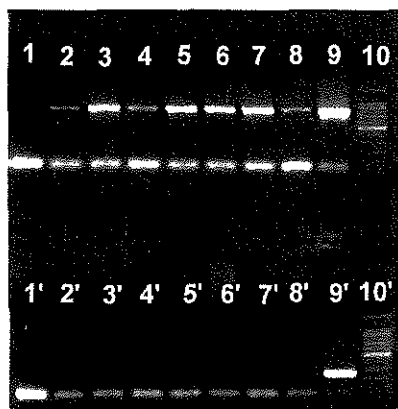


Figure 16 : migration réalisé sur gel d'agarose à 1% après une PCR de détection. (Les puits de 1 à 10 ont été amplifié avec les amorces conservées (CS1, CAS1), les puits de 1' à 10' ont été amplifié avec les amorces spécifiques (SS2, SAS1), 10 et 10'-marqueur de taille, 1 et 1'-témoin négatif, 9 et 9'-témoin positif : ADN *M.refringens*, 2 à 8-*B.improvisus* au 100^{ème} avec amorces conservées, 2' à 8'-*B.improvisus* au 100^{ème} avec amorces spécifiques)

Analyse de la PCR réalisé avec les amorces conservées (CS1, CAS1).

Sur la figure 16 on remarque que le témoin positif est correct (puits 9). Il y a amplification de l'ADN de *Balanus improvisus* dans les puits de 2 à 8.

Analyse de la PCR avec les amorces spécifiques (SS2, SAS1).

Sur la figure 16 on remarque que le témoin positif est correct (puits 9'). Il n'y a pas amplification de l'ADN de *Balanus improvisus* dans les puits de 2' à 8'.

D'après ces résultat, cela signifie que l'espèce *Balanus improvisus* ne contient pas d'ADN de *Marteilia refringens*. Donc on peut conclure que sur le nombres de balanes aucune ne fait pas parti du cycle de *Marteilia refringens*.

5.4.3. Conclusion générale sur la PCR de détection :

Sur les 9 espèces (*Anguilla anguilla*, *Balanus improvisus*, *Corophium sp.*, *Paleomon serratus*, *Paleomonetes Varians*, *Tubifcoïdes benedeni*, *Holothuries*, les larves d'insectes et l'espèces dont le nom et indéterminé) analysées par PCR de détection aucune n'a montré la présence d'ADN de *Marteilia refringens*. On peut donc conclure que sur le nombre d'individus représentant les espèces aucun ne fait parti du cycle de *Marteilia refringens*.

Les résultats de toutes les espèces analysées au cours de cette étude ont été synthétisés dans le tableau ci-après (tableau 4).

49

RESULTATS ESPECE PAR ESPECE									
	Contrôle de l'ADN		PCR (contrôle interne) amorces CS1 et CAS1		Détection de l'ADN du parasite amorces SS2 et SAS1		Conclusion		
	non dégradé	dégradé	amplification	pas d'amplification	présence	absence	hote potentiel	hors cycle	indéterminé
Espèces 1998									
<i>Abra ovata</i>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Anguilla anguilla</i>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Balanus improvisus</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Corophuim sp</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Corophuim volutator</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Crangon crangon</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Leucophytia bidentata</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Haminea hydatis</i>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Idothea chelipes</i>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Isopode</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Paleomon serratus</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Paleomonetes varians</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Espèces 1999									
Larves d'insectes	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nom indéterminé	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Tubifcoïdes benedeni</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Holothuries</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Tableau 4 : résultats des différentes manipulations réalisées, espèces par espèces.

VI. DISCUSSION

Au cours des ces 30 dernières années de nombreuses techniques on été employées pour détecter la présence du parasite *Marteilia refringens* au sein des différentes espèces, la première étant le frottis coloré, l'histologie (Grizel et Tigé, 1969), l'immunologie et enfin la PCR (Le Roux et *al.*, 1999).

L'histologie a été essayé comme technique de détection du parasite *Marteilia refringens* mais cette technique c'est vite révélée inappropriée car les stades de développement du parasite au sein de ou des hôte(s) intermédiaire(s) ne sont pas connus. De plus cette technique était longue et fastidieuse.

La technique PCR c'est donc révélé comme la technique la plus rapide et la plus fiable car on prend pour cible l'ADN du parasite, c'est-à-dire une molécule dont les caractéristiques se conservent quelque soit le stade du parasite. Ce qui a facilité les recherches car le nombres espèces est surtout le nombres d'individus par espèces c'est révélé être surprenant.

Cette étude a donné une grande quantité de résultat dont deux aspects bien distincts en sont ressortit :

- Il y a tout d'abord un aspect positif non négligeable car certaines espèces étudiées comme *Balanus improvisus*, *Corophium sp.*, *Paleomon serratus*, *Paleomon varians*, Larves d'insectes, *Tubificoides benedeni*, *Holothuries* et l'espèces dont le nom est indéterminé ont pu être exclu des hôtes potentiels du cycle parasitaire de *Marteilia refringens*. En effet lors de la recherche de l'ADN du parasite il n'y a eu aucune amplification avec les amorces spécifique (SS2, SAS1).

- Mais il y a également un second aspect également non négligeable car un grand nombres d'espèces comme *Abra ovata*, *Anguilla anguilla*, *Corophium volutator*, *Crangon crangon*, *Leucophytia bidentata*, *Haminea hydatis*, *Idothea chelipes*, *Isopodes* n'ont pas données d'amplification avec les amorces conservées (CS1, CAS1). Lors de la manipulation elles ont été omises sachant qu'il n'était pas possible de réaliser une PCR de détection, mais elles ne peuvent cependant pas être exclue du cycle parasitaire de *Marteilia refringens*.

Lors des différentes manipulations il a été rencontré différents problèmes plus ou moins importants, il a fallu palier à ces problèmes rapidement.

La lyse cellulaire est l'étape la plus déterminante lors de cette étape si l'échantillon dégel on perd une grande quantité d'ADN car les Dnases aurons dégradé l'ADN. Il faut donc travailler au maximum dans la glace.

Mais les problèmes peuvent venir des coquilles et des carapaces qui ont montrées à plusieurs reprise qu'elles agissaient en temps que composé inhibiteur lors de l'amplification de l'ADN. Des espèces comme *Abra ovata* possède une coquille de plus elles sont très petites. Il a donc fallu enlever les coquilles au scalpel. D'autre espèces comme *Crangon crangon* qui est une crevette grise possède une carapace mais l'on avait pas le temps de les décortiquer à la main donc on les a placé dans une poche et on les a écrasé au maillet sur un pain de glace pour ne récupérer que la chair. Il est important que l'animal soit bien broyer pour une bonne extraction.

Le problèmes le plus souvent rencontré lors d'une PCR est un problèmes de contamination du mélange, pour y palier il a fallu déterminer des salles dites "saines" et des salles dites "contaminées". La démarche étant que les produits aillent du "sain" vers le "contaminé" et non l'inverse.

Pour toutes les espèces étudiées au cours de ce stage, la PCR n'est qu'une technique de détection de l'ADN du parasite car :

- si l'on ne détecte pas d'ADN de *Marteilia refringens* on exclue l'espèce du cycle.
- si on détecte de l'ADN de *Marteilia refringens* il faut alors envisager deux autres technique : la technique de Southern Blot pour confirmer la spécificité de la détection de l'ADN du parasite, et si il y a effectivement détection on réalise une hybridation *in situ* pour visualiser où l'ADN du parasite est situé. Il est tout a fait probable que lors de l'hybridation *in situ* l'ADN de *Marteilia refringens* soit détecté à la sur face de l'animal ou dans son système digestif ce qui signifierait qu'il a seulement ingéré le parasite. Dans ce cas l'espèce n'est pas considéré comme un hôte intermédiaire. Mais il est possible que le parasite soit dans d'autres organes tel que le foie ou les ovaires. Dans ce cas l'espèce est un hôte intermédiaire de *Marteilia refringens*.

Durant cette étude on s'est attaché uniquement à la faune de la claire ostréicole mais cependant on ne peut pas exclure la flore de la claires ostréicole tel que le phytoplancton mais aussi la possibilité d'une phase libre du parasite voir même une maturation de celui-ci dans le sédiment.

VII. BIBLIOGRAPHIE

- 📖 AUDEMARD C, A. BARNAUD, F. LE ROUX, P-G. SAURIAU et F. BERTHE. Modèle de transmission expérimentale et outils de biologie moléculaire pour l'étude du cycle de *Marteilia refringens*. Affiche Ifremer.
- 📖 BAUD J-P., A. GERARD, Y. NACIRI-GRAVEN. 1997. Comparative growth and mortality of *Bonimia Ostreae* resistant and wild flat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. *Marine Biology*. 130 :71-79.
- 📖 BERTHE F., F. LE ROUX, E. PEYRETAILLADE, P. PEYRET, D. RODRIGUEZ, M. GOUY, C-P. VIVARES. 2000. Phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Marteilia refringens* validates the existence of phylum paramyxea. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47 (3) :288-293.
- 📖 BONAMI J-R, H. GRIZEL. 1971. Recherche sur une maladie épizootique de l'huître plate, *Ostrea edulis linné*. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 35 (4) :415-418.
- 📖 FRANC A. 1980. Sur quelques aspects inédit du cycle de *Marteilia refringens* Grizel et col, 1974, Parasite de l'huîtres plates *Ostrea edulis L.* *Cahiers de biologie Marine*. Tome XXI : 99-106.
- 📖 GERARD A. Rapport d'activité 1999. Laboratoire génétique et pathologie, 35 pp.
- 📖 GRIZEL H, G. TIGE. 1977. Observation sur le cycle de *Marteilia refringens*. *Haliotis*, 8 :327-330.
- 📖 LE ROUX F. Cours de biologie moléculaire. Laboratoire de génétique et de pathologie. Ifremer Ronce les bains, 60 pp.
- 📖 LE ROUX F. 1998. PCR, hybridation in situ et PCR in situ. Formation Ifremer, 60 pp.
- 📖 LE ROUX F, C. AUDEMARD, A. BARNAUD, F. BERTHE. 1999. DNA probes as potential for the detection of *Marteilia refringens*. *Mar. Biotechnol.* 1 : 588-597.

Référence informatique :

- 🔗 <http://www.lesfreresblanc.com/francais/huîtres.htm>
- 🔗 <http://perso.club-internet.fr/fan...8/ostrea/petitehistoirehuitre.htm>
- 🔗 <http://www.ifremer.fr>
- 🔗 <http://www.malarde.pf/pcr.htm>

