



E700-MATR
04/1995
64621

UFR Sciences Exactes et naturelles

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADÉ

Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie
Option : Physiologie microbienne

**ROLE DE LA MOULE, *MYTILUS EDULIS*,
DANS LA TRANSMISSION DU
PARASITE DE L'HUITRE PLATE,
*MARTEILIA REFRINGENS***

Rapport de stage
Soutenu
Le 5 septembre 2003
Par Olivier MATHIA

Jury : Texier Catherine
Vivares Christian

Responsable de stage : Dr Franck BERTHE

Laboratoire de Génétique et Pathologie
IFREMER La Tremblade
17390 Ronce les Bains

www.ifremer.fr

ifremer



PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL	p 1
INTRODUCTION	p 3
MATERIEL ET METHODES	p 5
1) <u>Approche expérimentale</u>	p 5
2) <u>Matériel</u>	p 5
❖ <u>Expérience en rivière de la Trinité</u>	p 5
❖ <u>Expérience en claire à Oléron</u>	p 6
3) <u>Méthodes</u>	p 6
a) <u>Frottis</u>	p 6
b) <u>PCR et PCR-RFLP</u>	p 6
RESULTATS	p 9
1. <u>Expérience de la Trinité</u>	p 9
2. <u>Expérience de la claire</u>	p 9
a) <u>Présence de <i>Marteilia</i> dans les copépodes</u>	p 9
b) <u>Présence de <i>Marteilia</i> dans les moules</u>	p 9
DISCUSSION	p 11
REFLEXION PERSONNELLE	p 13
REMERCIEMENTS	p 14
BIBLIOGRAPHIE	p.15

ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucleique

dNTP : Désoxyribonucléotide

BET : Bromure d'Ethidium

DEL : Direction Environnement et aménagement du Littoral

DO : Densité Optique

EDTA : Ethylène Diamine Tetra acetic Acid

H : heure

IFREMER : Institut Française de Recherche pour l'Exploitation de la MER

ITS : Interval Transcript Sequence, intervalle transcrit

LCPC : Laboratoire Conchylicole de Poitou Charentes

LGP : Laboratoire de Génétique et Pathologie

M. maurini : *Marteilia maurini*

M. refringens : *Marteilia refringens*

min : minute

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

OIE : Office International des Epizooties

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation enzymatique en chaîne

REPAMO : Réseau de Pathologie des Mollusques

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TAE : Tris Acetate EDTA

Taq : *Thermophilus aquaticus*

Tris : hydroxymethyl aminomethane

PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL

L'IFREMER

Institut Française de Recherche pour l'Exploitation de la MER

1) Sur le plan national

L'IFREMER est un établissement Public à caractère industriel et commercial (EPIC). Il a été fondé le 5 juin 1984 et résulte de la fusion entre le Centre National pour l'Exploitation de l'Océan (CNEXO) et l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM).

Son budget annuel est d'environ 150 millions d'euros qui proviennent en partie des subventions accordées par l'Etat.

L'IFREMER emploie 1380 salariés.

Cet institut possède 5 centres (Boulogne-sur-mer, Brest, Nantes, Toulon et Tahiti) et 72 laboratoires ou services de recherche, répartis en 26 stations sur tout le littoral métropolitain et dans les départements et territoires d'outres mer (DOM/TOM).

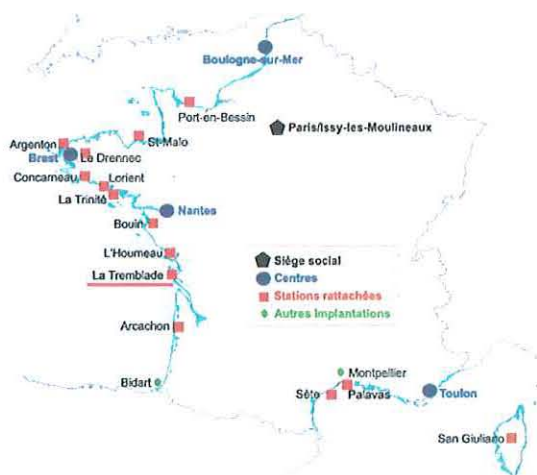
Ses missions :

Les missions de l'IFREMER sont la recherche et le développement technologique pour la connaissance de l'océan et de l'exploitation des ressources marines,

Soit de :

- ◆ Connaître, évaluer, prévoir l'évolution des ressources des océans et permettre leur exploitation durable,
- ◆ Améliorer les méthodes de surveillance, de prévision, d'évolution, de protection et de mise en valeur du milieu marin et côtier;
- ◆ Favoriser le développement socio-économique du monde maritime,
- ◆ Avoir un rôle de service public (aide à la décision), de conseil et d'expertise auprès de l'Etat, des collectivités territoriales, des milieux professionnels de la mer (marins, pêcheurs, aquaculteurs), et aussi des industriels de la transformation et de la valorisation des ressources maritimes.

2) La station de La Tremblade



La station IFREMER de La Tremblade est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral.

Elle regroupe 3 laboratoires :

- ◆ Un laboratoire côtier de la Direction Environnement et aménagement du Littoral (DEL) dont les missions consistent à mettre en œuvre des réseaux de surveillance garantissant aux conchyliculteurs et aux consommateurs une qualité des eaux et des coquillages.
- ◆ Le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes (LCPC) qui étudie entre autres la croissance des coquillages, afin d'améliorer les productions du bassin Marennes-Oléron.
- ◆ Le Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP) qui est spécialisé en génétique et pathologie des bivalves marins.

Directeur de la Station et du LGP : Philippe GOULLETQUER

3) Mon service : le LGP

Le LGP est le Laboratoire Communautaire de Référence pour les Maladies des Mollusques et le Laboratoire de Référence pour l'Office International des Epizooties (OIE) pour la marteillose et la bonamiose, deux parasitoses affectant l'huître plate, *Ostrea edulis*.

Ses fonctions consistent en l'entretien d'une collection de matériel de référence relatif aux maladies des mollusques marins (que se soient des blocks ou coupes histologiques, photographies, ADN, collection de souches de bactéries congelées, etc...), la mise au point de méthodes de diagnostic des principaux agents pathogènes, la formation d'experts et l'assistance à la Commission Européenne et la Commission des Standards pour les Animaux Aquatiques de l'OIE.

J'ai effectué mon stage dans l'équipe de pathologie du LGP, et plus particulièrement dans le cadre de l'étude de la marteillose, développée par le Dr Berthe.

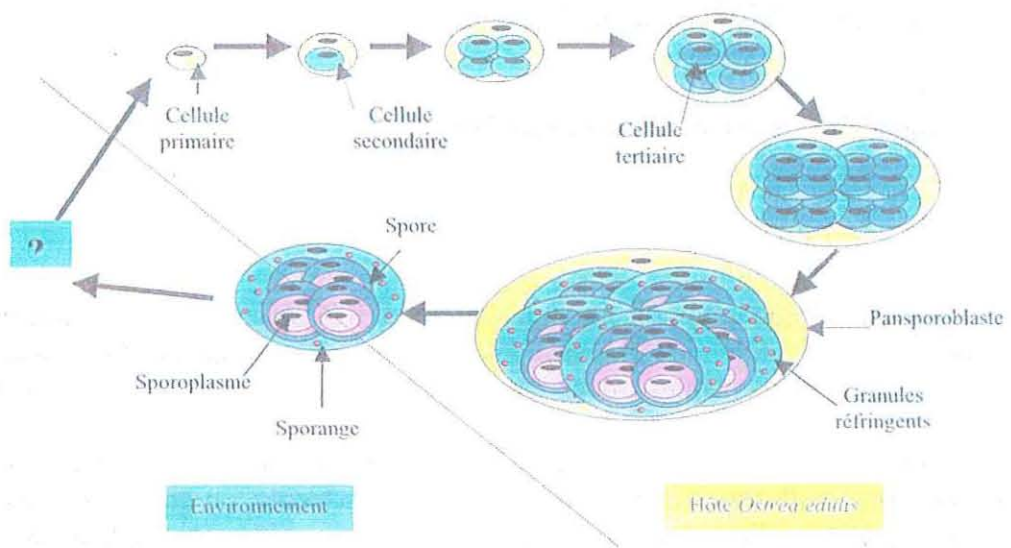


Figure 1 : Schéma du cycle de développement de *Marteilia refringens* au sein de *Ostrea*

INTRODUCTION

L'huître est un mollusque lamellibranche appartenant à la Famille des Ostreidae. Cette famille est notamment composée par le genre *Ostrea*.

Les huîtres comme tout autre organisme sont sujettes à diverses maladies, ainsi en France à la fin des années 70 on observe, dans la rivière de l'Aber Wrach située sur la côte Nord de la Bretagne, une épizootie touchant l'huître plate, *Ostrea edulis*, et se manifestant par des taux de mortalité pouvant atteindre 90% (Herrbach, 1971). A l'époque, malgré cette mortalité anormale, aucune mesure particulière visant à limiter les transferts d'huîtres plates n'est mise en place ou suivi d'effet. Ainsi, dès la fin de l'été 1969, apparaît dans les claires du Bassin de Marennes Oléron, une mortalité anormale d'huîtres plates d'origine bretonne.

Comps en 1970 ainsi que Herrbach en 1971 montrent que le phénomène est du à des cellules sphériques uninuclées qui semblent évoluer vers des cellules polynuclées donnant naissance à des sporanges caractérisés par la présence de corpuscule réfringents. Ces cellules particulières seront par la suite identifiées comme correspondant à des stades de développement de *Marteilia refringens*, parasite décrit par Grizel et collaborateurs (Grizel *et al.*, 1974). On donnera à la maladie le nom de maladie des Abers puis de marteiliose en raison de son agent causal.

La marteiliose se manifeste par une absence de croissance et une maigreur de l'huître. De plus on note que la masse viscérale est anormalement décolorée et jaune pâle. Les symptômes de la maladie sont parfois visibles macroscopiquement et accompagné d'une altération des branchies et des palpes. La mort des huîtres est vraisemblablement dûe au blocage de glande digestive par le parasite et à la baisse d'absorption pour l'hôte quoique l'on ne puisse exclure une action toxique (Grizel *et al.*, 1974, Grizel 1985).

Marteilia refringens est un parasite extra-cellulaire de la glande digestive de l'huître plate. Les premiers stades du parasite se développent au niveau des palpes, de la bouche et de l'estomac. Pour les stades les plus avancés, le développement se fait essentiellement au niveau de la glande digestive.

Le stade initial du parasite est constitué par une cellule souche ou cellule primaire (Grizel *et al.* 1974) dont la différenciation nucléo-cytoplasmique aboutit à la formation intra-cellulaire de cellules secondaires(cf figure 1).

Les cellules primaires peuvent contenir jusqu'à 8 cellules secondaires ou sporanges, terme utilisé pour les cellules contenant les spores et caractérisées par la présence de corpuscules réfringents (Herrbach 1971, Lubat 1990) qui par division endogène vont produire 4 cellules tertiaires (=spore) par cellules secondaires.

Chaque cellule tertiaire contient trois sporoplasmes issus de divisions endogènes.

Arrivée à maturation, la paroi des cellules primaires se rompt libérant les sporanges dans la lumière des diverticules digestifs (Herrbach, 1971 ; Grizel, 1985) ce qui occasionne la destruction des épithéliums de la glande digestive (Alderman, 1979 ; Robledo et Figueras, 1995). Le parasite est alors disséminé dans l'environnement via les fécès.

Les premiers critères de différenciation du genre *Marteilia*, basés sur les observations de l'ultrastructure du parasite ainsi que sur les hôtes qu'il infeste, semblent désormais insuffisants. Il a été démontré que la séquence 18S (codant pour l'ARN de la petite sous-unité ribosomique) s'avère être un outil plus précis pour la détermination de genre (Le Roux *et al.*, 1999 ; Berthe *et al.*, 2000). Toutefois le niveau de conservation de cette séquence semble être un obstacle à la différenciation de parasites proches. Certaines études ont donc été menées afin de pallier ce problème. Le Roux *et al* en 2001 ont montré qu'il existe un dimorphisme dans la région ITS-1 des gènes ribosomiaux chez *Marteilia*. Cela a permis de mettre en évidence l'existence un type O, détecté chez les huîtres, et un type M détecté chez les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*. Le types O pourrait correspondre à l'espèce *refringens* et le type M à l'espèce *maurini*.

Lors des études faites sur le dimorphisme des espèces de *Marteilia* en Europe (Le Roux *et al.*, 2001) il a été découvert quelque rare cas de co-habitation de *Marteilia* type O et Type M au sein d'un même organisme (=co-détection).

La co-détection est un phénomène qui semble être visible dans le milieu naturel mais rare, il convient donc d'étudier la fréquence de celui-ci.

Par conséquent, l'un des buts de mon stage est d'observer la prévalence de ce phénomène dans le milieu naturel. Pour cela nous avons prélevé des échantillons d'huîtres et de moules au sein de la rivière du Crac'h là où des co-détections ont été découvertes (Trinité, Morbihan).

Un de mes autres objectifs est de savoir dans les cas de co-détection chez *Mytilus edulis*, si la moule est vectrice du parasite de l'huître plate c'est à dire si le cycle du type O est complet chez cet hôte.

Il existe plusieurs hypothèses pouvant expliquer la co-détection chez la moule :

Les moules permettent le développement et la propagation du parasite (ce qui pourrait donner lieu à une réglementation pour le transport des moules).

Les moules sont un cul de sac pour les parasites.

Pour cela on a cherché à provoquer le passage du parasite de l'huître à la moule par l'intermédiaire d'un écosystème semi-clos(=la claire).

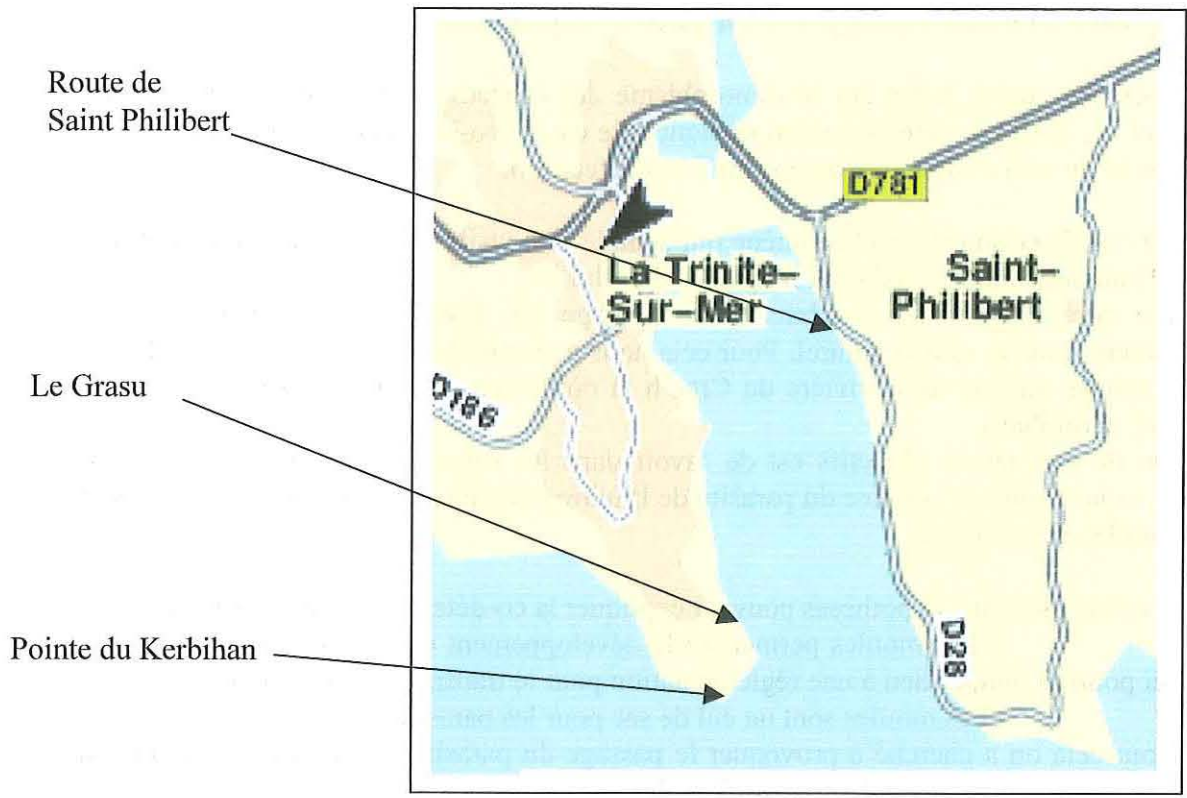


Figure 2 : Carte des points d'échantillonnage.

MATERIEL ET METHODES

1) Approche expérimentale

Afin d'étudier la co-détection chez la moule *Mytilus edulis*, nous avons recherché le phénomène dans le milieu naturel que constitue la rivière du Crac'h mais nous avons aussi essayé de le reproduire expérimentalement dans les claires ostréicoles.

Dans ces deux situations, la recherche de parasite s'est effectuée grâce à diverses techniques. Des techniques telles que le frottis et la PCR/RFLP nous permettent une identification du parasite alors que l'hybridation *in situ* et l'histologie nous permettent de localiser *Marteilia*.

La démarche de notre recherche a été, tout d'abord, de déterminer les individus infectés par un *Marteilia* grâce à l'utilisation de frottis, effectués sur la glande digestive. Une fois que l'on a détecté la présence d'un type de *Marteilia*, il convient de connaître à quelle espèce il appartient. Pour cela, nous avons utilisé la PCR/RFLP qui permet de différencier *Marteilia refringens* de *Marteilia maurini* et ainsi d'évaluer la prévalence du phénomène. Dans le cas d'une co-détection, c'est à dire de présence conjointe des deux parasites, il semble nécessaire de pouvoir localiser *Marteilia refringens* chez la moule afin de pouvoir déterminer si sa présence est due à un accident ou si elle correspond à une véritable infection, et à une sporulation. L'hybridation *in situ* est une technique qui semble bien convenir à ce type de recherche car elle permet de localiser spécifiquement *Marteilia* (schéma résume cf annexe 1).

2) Matériel

❖ Expérience en rivière de la Trinité

Les prélèvements ont eu lieu le 15 juillet pour diverses raisons. Tout d'abord à cette date, la température de la rivière du Crac'h dépassait les 17°C ; ce qui permet, comme l'ont démontré Audemard *et al* en 2001, le re-largage du parasite par l'huître plate. De plus, le fort coefficient de marée, ce jour là, permet une collecte plus aisée à marée basse.

Nous avons échantillonné 3 lots de 200 moules, chaque lot correspondant à un lieu géographique de l'estuaire du Crac'h. En effet, on sait que le re largage de *Marteilia refringens* par *Ostrea edulis* est fonction non seulement de la température mais aussi de la salinité paramètre pour lequel les différents points prélevés nous permettent d'avoir un gradient (l'échantillonnage c'est fait de l'intérieur de la rivière vers l'extérieur : Route de Saint Philibert, le Grasu et la pointe du Kerbihan, cf figure 2).

Il a été décidé de récupérer 600 moules car il semble que la prévalence du phénomène à étudier soit inférieure à 1%. En effet, l'étude précédente sur ce site (cf stage de S.Faure) semble montrer que le taux d'apparition du phénomène est inférieur à 0.5% par conséquent le prélèvement de 600 moules permet d'avoir une probabilité de détection de 95% pour un évènement dont la prévalence est inférieure à 1%.

Nous avons également échantillonné 200 huîtres plates trouvées sur les tables ostréicoles servant à la culture d'huîtres creuses. Ce lot d'*Ostrea edulis*, nous permet de vérifier la présence de *M. refringens* sur ce site.

❖ Expérience en claire à Oléron

Afin de forcer le passage de *Marteilia refringens* de l'huître vers la moule, 1000 individus (*Mytilus edulis*) provenant des filières du Pertuis Breton ont été, dans un premier temps, placés à 21°C pour permettre leur acclimatation à des températures élevées. Cette étape s'avère nécessaire afin d'éviter une mortalité trop élevée lors de leur placement en claire où les températures avoisinent 28°C (température létale pour les moules).

Dans un deuxième temps, après 2 semaines à 21°C, les 3 poches de moules indemnes de *Marteilia* ont été installées sur les tables ostréicoles de la claire, à côté d'huîtres plates parasitées, nous avons ensuite procédé à 2 échantillonnages de moules. Les deux prélèvements, constitué chacun de 150 individus, ont été réalisés, la première fois après 3 semaines de co-habitation entre les moules et les huîtres puis après 1 mois et 3 semaines, ces délais sont nécessaires pour s'assurer du passage du parasite de l'huître vers la moule.

Parallèlement à cela nous avons effectué des prélèvements de copépodes une semaine avant chaque échantillonnage de moule car le copépode fait parti des hôtes du parasite (Audemard, 2001) par conséquent ce prélèvement nous permet de vérifier la présence de *Marteilia refringens* au sein de notre claire.

3) Méthodes

a) Frottis

Cette technique permet une visualisation rapide d'éventuels stades de *Marteilia* présent dans la glande digestive (screening).

Pour cela un fragment de glande digestive est prélevé sur la moule, il est ensuite séché sur papier filtre. Le fragment est ensuite appliqué sur une lame de verre ; celle-ci passe successivement dans différents bains afin de permettre la fixation (méthanol) puis coloration des structures cellulaires à l'aide d'un kit Giemsa (hemacolor 2 et 3), puis rincé à l'eau et séché.

b) PCR et PCR-RFLP

❖ *Extraction de l'ADN :*

Une demi-moule congelée à -20°C est broyée puis mélangée avec 10 volumes d'une solution de lyse (NaCl 100mM, EDTA 25mM pH=8, SDS 0.5%, Tris 5mM pH=8) additionnée de Protéinase K (100µg/mL). On laisse incuber une nuit à 55°C avant de mélanger 1 volume de solution de lyse avec 2 volumes d'un mélange phénol + chloroforme. Une centrifugation pendant 10 minutes à 10.000 rpm à température ambiante permet de récupérer le surnageant contenant les acides nucléiques auquel on ajoute 1/10 de volume d'acétate de sodium à 3M pH=5.4 ainsi que 2,5 volumes d'éthanol absolu. Après

une incubation de 30 minutes à -20°C , et une centrifugation de 10 min à 10.000 rpm à une température de 4°C , le culot est lavé grâce à 1 ml d'éthanol à 70°C . De nouveau, on centrifuge pendant 5 min à 10.000 rpm à 4°C avant de sécher les culots ainsi obtenus. Les acides nucléiques sont remis en suspension dans $50\ \mu\text{l}$ d'eau.

Les contrôles d'extractions se font soit par la mesure du rapport DO 260nm/DO 280 nm soit par migration sur gel agarose à 0.7% dans un tampon TAE 1X (en présence de BET) (méthode : $5\ \mu\text{l}$ d'extrait + $95\ \mu\text{l}$ d'eau).

❖ *Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :*

La technique de PCR est utilisée pour amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un fragment d'acide nucléique situé entre 2 séquences connues .

Pour un tube PCR, on mélange $1\ \mu\text{L}$ d'extrait (à $100\ \mu\text{g}$ d'ADN/ml) avec $5\ \mu\text{L}$ de tampon enzyme, $2.5\ \mu\text{L}$ de MgCl_2 , $5\ \mu\text{L}$ de dNTP, $0.5\ \mu\text{L}$ Taq DNA polymérase, $0.5\ \mu\text{L}$ d'amorces et $35\ \mu\text{L}$ d'eau.

Programme PCR

5 min à 94°C (dénaturation)

30 cycles correspondant à :

1) dénaturation : 1min à 94°C

2) hybridation : T_m selon les amorces utilisées

3) élongation : 1min à 72°C

#10 min à 72°C (élongation)

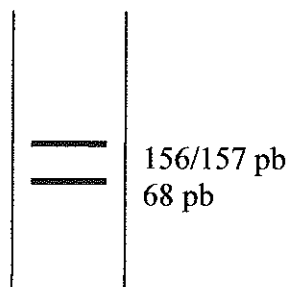
Le contrôle de la PCR se fait par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1% dans un tampon TAE 1X en présence de BET, ce contrôle se fait grâce a des séquences conservées dans le règne eucaryote (amorces CAS1S et CS1 ; Le Roux *et al* 1999).

❖ *Digestion enzymatique avec Hha I (RFLP)*

Cette enzyme permet une coupure différentielle de l'ITS-1 du genre *Marteilia*. En effet *Marteilia maurini* possède trois sites de restriction sur son ITS alors que *Marteilia refringens* n'en possède que deux.

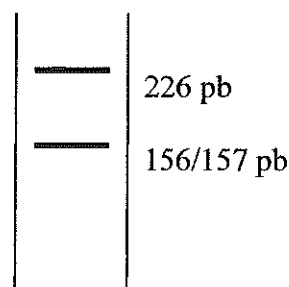
La digestion des produits de PCR par l'enzyme de restriction *Hha I* permet d'obtenir deux types de profil correspondant à *Marteilia refringens* et *Marteilia maurini* et un troisième profil signifiant la présence simultanée de *Marteilia refringens* et *M. maurini* u co-détection.

Profil PCR/RFLP de *M.maurini*

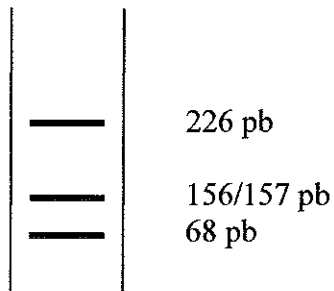


OU

Profil PCR/RFLP de *M.refringens*



Profil PCR/RFLP d'une co-détection à *Marteilia refringens* et *Marteilia maurini*



Pour obtenir cela on mélange 10 μ L de produit PCR, 2 μ L de tampon enzyme 10X, 1 μ L d'enzyme (*Hha* I), 7 μ L d'eau avant de laisser incuber 1heure à 37°C. On procède ensuite à une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 2% dans un tampon TAE 1X en présence de BET.

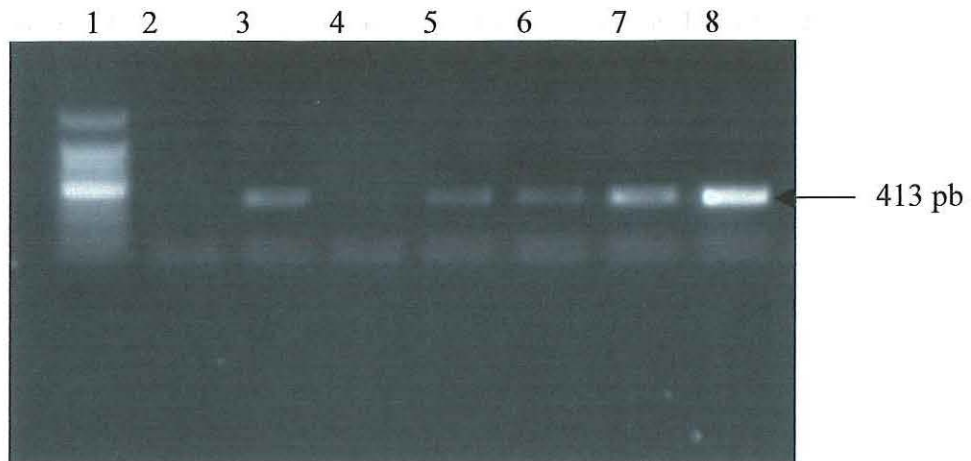


Figure n°3 : Produit de PCR-ITS utilisant les amorces spécifiques de *Marteilia* (M2S et M3AS). La migration des produits PCR se fait sur un gel d'agarose à 1% et est visualisé grâce au Bromure d'éthidium.

Puits 1 : Echelle. Puits 2 : Témoin négatif. Puits 3 à 7 : Produits PCR. Puits 8 : Témoin positif

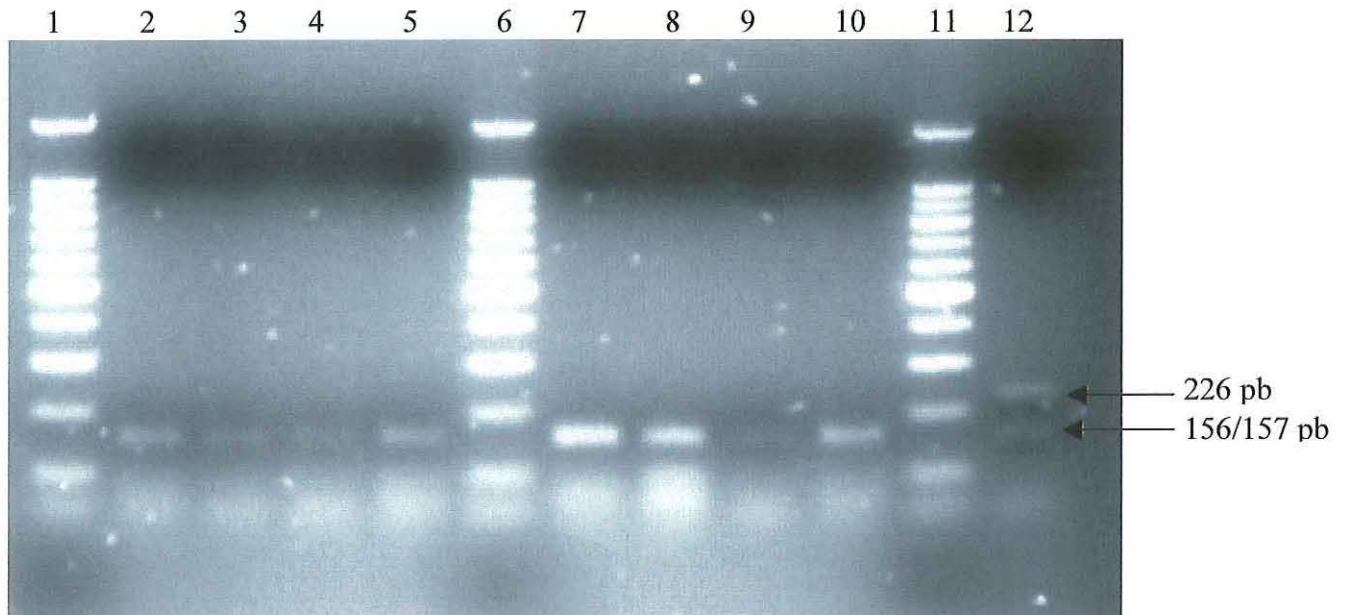


Figure 4 : Digestion des produits de la PCR-ITS par l'enzyme *Hha* I. La migration des produit PCR se fait sur un gel d'agarose à 2% et est visualisé grâce au Bromure d'éthidium.

Puits 1 : Echelle. Puits 2 à 5 : Produits de la digestion par *Hha* I des ADN de moules amplifiés grâce aux amorces M2S et M3AS. Puits 6 : Echelle. Puits 7 à 10 : Produits de la digestion par *Hha* I des ADN de moules amplifiés grâce aux amorces M2S et M3AS. Puits 11 : Echelle. Puits 12 : Produit de la digestion par *Hha* I des ADN de copépodes amplifiés grâce aux amorces M2S et M3AS.

RESULTATS

1. Expérience de la Trinité

Sur les trois lots de moules échantillonné à la Trinité un seul a été traité durant mon stage. Ce lot de 200 moules a donné 29 résultats positifs en détection de *Marteilia* par frottis de glande digestive. Après la PCR conservée puis spécifique pour *Marteilia*, on constate que 21 individus sont positifs (cf annexe 2 et cf figure 3). Aucun de ces 21 cas ne révèle un profil caractéristique de *Marteilia refringens* après digestion par l'enzyme *Hha I* (cf figure 4).

2. Expérience de la claire

a) Présence de *Marteilia* dans les copépodes

Le but de l'expérience réalisée en claire était de forcer le parasite à passer de l'huître plate, *Ostrea edulis*, à la moule, *Mytilus edulis*. Pour cela il est nécessaire de vérifier que le parasite *Marteilia refringens* est bien présent au sein de la claire et que son cycle y est bien fonctionnel. Nous savons que le copépode *Paracarcia grani* est un hôte de *M. refringens* et que cette espèce est présente dans notre claire d'expérimentation. Pour chacun des tamis, nous avons fait une extraction, une PCR ainsi qu'une digestion enzymatique du produit d'amplification (cf annexe 3).

❖ Echantillon du 10/08/03 :

Seule les ADN issus des tamis 125µm et 300µm sont exploitables. Ces deux prélèvements ont donné une amplification en PCR conservée. La présence de *Marteilia* est confirmée pour le tamis de 300µm, de plus nous avons constaté par digestion à *Hha I* que l'espèce présente était *Marteilia refringens* (cf figure 4).

❖ Echantillon du 28/08/03 :

En ce qui concerne la deuxième série de copépodes prélevés, l'amplification en PCR conservée a été possible, mais nous n'avons pas mis en évidence la présence de *Marteilia* en PCR spécifique.

b) Présence de *Marteilia* dans les moules

Les 200 frottis de glande digestive provenant du premier prélèvement n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de *Marteilia*.

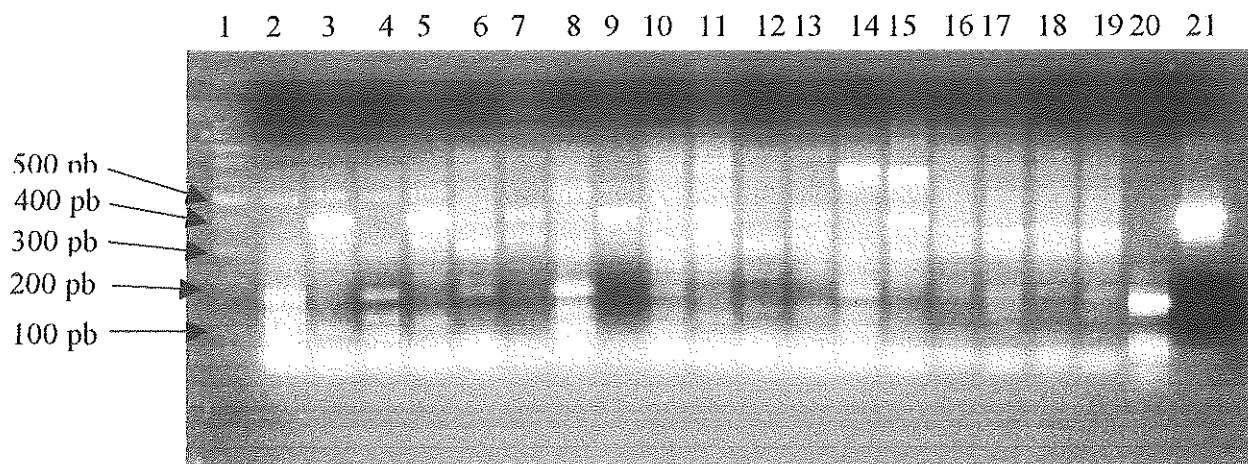


Figure 5 : Digestion des produits de la PCR-ITS par l'enzyme *Hha* I. La migration des produits PCR se fait sur un gel d'agarose à 2% et est visualisée grâce au Bromure d'ethidium. Puits 1 : Echelle. Puits 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 et 18 : Produits de la digestion par *Hha* I des ADN de moules amplifiés grâce aux amorces M2S et M3AS. Puits 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 et 19 : Produits amplifiés grâce aux amorces M2S et M3AS et non digéré des moules. Puits 20 : Produit de la digestion par *Hha* I de l'ADN amplifié d'une moule contrôlée positive à *Marteilia maurini*. Puits 21 : Produit d'amplification de l'ADN d'une moule contrôlée positive à *Marteilia maurini*.

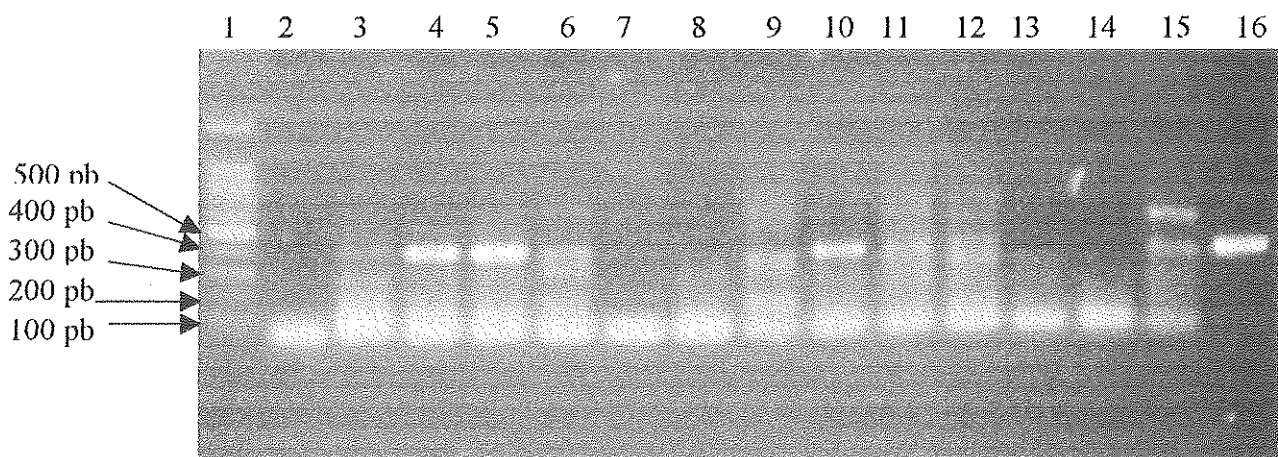


Figure 6 : Produit de PCR-ITS utilisant les amorces spécifiques de *Marteilia* (M2S et M3AS). La migration des produits PCR se fait sur un gel d'agarose à 1% et est visualisée grâce au Bromure d'ethidium. Puits 1 : Echelle. Puits 2 : Témoin négatif. Puits 3 à 15 : Produits PCR. Puits 16 : Témoin positif.

Une semaine après l'échantillonnage des moules, nous avons constaté que les fortes chaleurs étaient responsables de fortes mortalités de moules. Nous avons toutefois réussi à récupérer 42 individus peu dégradés, sur lesquels nous avons entrepris d'effectuer une extraction suivie d'une PCR et d'une digestion (cf annexe 4).

Les analyses faites sur ces moules montrent qu'il y a 17 individus répondant de manière positive à la PCR conservée. Seuls trois d'entre eux présentent de manière claire un parasite de type *Marteilia maurini* (cf figure 5), les autres ne répondent pas à la PCR ITS ou ont des profils difficilement interprétables en raison de nombreuses bandes surnuméraires (cf figure 6). Ces bandes résiduelles pourraient être dues à l'état de dégradation des moules qui ont-ils des ADN fortement dégradés.

D'après les résultats obtenus jusqu'à maintenant, il semble que *Marteilia refringens* ne soit pas passé chez les moules.

DISCUSSION

D'après les résultats obtenus sur les moules prélevées à la Trinité, le taux d'infestation des moules par *Marteilia maurini* est de l'ordre de 10,5%. Cette valeur est très inférieure à ce qui avait été trouvé l'année précédente sur le même site ou encore aux données enregistrées par le réseau de surveillance Repamo. Cela peut s'inscrire dans le cadre de fluctuations pluriannuelles de la prévalence et de l'incidence de la marteiliose.

Il est à remarquer que l'année précédente, les températures ont été globalement inférieures aux moyennes saisonnières et ont pu conduire à une réduction de la circulation du parasite.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence le phénomène de co-détection précédemment décrit sur ce site par Le Roux et collaborateurs (2001). Une précédente tentative, quoique sur une population inférieure, avait également échoué (stage S. Faure). Ces résultats tendent à confirmer que la co-infection est un événement rare ou juste transitoire. Dans ce dernier cas, la date de prélèvement de nos moules pourrait jouer sur nos résultats.

En effet si les prélèvements ne sont pas effectués au moment où le parasite est présent chez les moules nous n'obtenons alors pas de co-détection. Ce dernier point est très important compte tenu de la dynamique du parasite. Pour être confirmée, une telle hypothèse nécessiterait un échantillonnage sur une échelle temporelle plutôt que spatiale, choix fait dans le cadre de notre étude.

Il reste toutefois à confirmer nos résultats sur deux échantillons de moules issues du même estuaire, l'un en aval et sous influence océanique et l'autre en amont et plus exposé à *M. refringens* du fait des activités ostréicoles et de la salinité du site.

Cependant le choix de traiter en priorité l'échantillon du Grasu correspondait au fait qu'il est le seul site sur lequel la co-détection ait été mise en évidence. Toutefois, à ce jour, seul les frottis positifs ont été testés (PCR et RFLP), il conviendrait de poursuivre cette étude par une analyse des moules correspondant aux frottis négatifs.

En ce qui concerne l'expérience réalisée en claire, nous pouvons dire que la claire est potentiellement capable d'assurer le passage de *Marteilia refringens* puisque le parasite est détecté dans le zooplancton de cet écosystème dont il a été montré qu'il intervient dans le cycle du parasite. Le test a toutefois été réalisé sur le compartiment zooplanctonique sans tri des différentes espèces de copépodes ou autres, ce qui limite la portée de l'information.

L'expérience acquise sur le sujet montre cependant que c'est un site où le cycle est fonctionnel. Il semble cependant que la claire ne constitue pas le meilleur système d'expérimentation pour les moules puisque la viabilité de ces moules est affectée par la chaleur ce qui a conduit à 100% de mortalité dans le cours de cette étude.

Il semble qu'après trois semaines d'exposition à la présence du parasite, les moules ne sont toujours pas infectées par celui-ci. L'absence de *Marteilia* dans la glande digestive de ces moules peut s'expliquer de diverses manières.

Le délai d'exposition au parasite peut être trop court (peu probable) ou bien cela peut venir du fait que *Marteilia refringens* n'est encore arrivé à la glande digestive (sporulation fastidieuse). Mais on peut se demander si *Marteilia refringens* a le même tropisme pour la glande digestive aussi bien chez la moule que chez l'huître.

Malgré la présence de *Marteilia refringens* dans la claire (zooplancton, huîtres donneuses), c'est *M. maurini* que nous avons détecté dans les moules. Si ce résultat peut sembler cohérent à première vue, il pose quelques questions.

En effet, comment peut-on retrouver *M. maurini* alors que le zooplancton est détecté à *M. refringens*, où est la source de *maurini* si l'on considère que les moules étaient indemnes avant expérience, ... sont autant de questions soulevées par ces résultats.

Afin de déterminer si *Marteilia refringens* peut potentiellement infecter les moules *Mytilus edulis* il convient de poursuivre la recherche par l'analyse des frottis négatifs enfin de s'assurer que le parasite n'est pas présent chez la moule.

En effet il se peut que *Marteilia refringens* ne se retrouve pas dans la glande digestive, dans ce cas, la PCR ou l'histologie seraient de bons outils de détection du parasite. De plus, il pourrait être nécessaire de considérer des dynamiques différentes des deux types du parasite.

Nos résultats toutefois vont dans le sens d'une relative spécificité de *maurini* pour la moule et de *refringens* pour l'huître. Nos résultats sont en contradiction relative avec ceux obtenus par des équipes espagnoles montrant des détections de *refringens* chez des moules méditerranéennes, et, d'autre part, cette question de la spécificité de *refringens* a de lourdes conséquences en matière de gestion de risque.

C'est pourquoi il sera nécessaire de prolonger cette étude, en exploitant, dans un premier temps, l'ensemble des échantillons préparés.

REFLEXION PERSONNELLE

Grâce à ce stage, j'ai pu me rendre compte du fonctionnement d'un laboratoire de recherche et de son organisation. J'ai donc pu apprécier la vie d'un laboratoire qui semble t'il dépend de la bonne coordination du personnel en ce qui concerne la gestion du matériel ainsi que l'utilisation des équipements.

Ces trois mois au sein de l'IFREMER m'ont donné permis de visualiser l'établissement d'un protocole expérimental. Je comprends maintenant que la définition d'un protocole complet et rigoureux permet une bonne exploitation des résultats et par conséquent l'obtention d'une meilleure interprétation des phénomènes observés.

Ce stage m'a aussi permis de prendre conscience des problèmes inattendus qui peuvent subvenir au cours d'une expérience et des solutions qu'il convient de mettre en place. Il me semble désormais que l'adaptation est un facteur clefs dans l'accomplissement d'un travaille de recherche.

Mon stage m'a permis de mettre en pratique mes acquis théoriques.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Monsieur Philippe GOULLETQUER de m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein de l'IFREMER

Je tiens à exprimer toute notre reconnaissance au Professeur Christian VIVARES qui m'a trouvé ce stage.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude au Docteur Franck BERTHE pour m'avoir aiguillé tout au long de ce stage et pour l'autonomie qu'il m'a permis d'acquérir.

Un grand merci au Docteur Isabelle ARZUL pour toutes les réponses qu'elle a donnée à mes « petites questions ».

Mes remerciements vont aussi : à Bruno pour ses performances artistiques sur un groupe dont le nom correspond à une taille de soutien gorges, à Céline pour m'avoir soutenu dans mon sevrage de cassette, de frottis et de minigrip, à Maeva pour les vidéos (que je n'est pas eu le temps de regarder d'ailleurs), à La Mexicaine pour sa bonne humeur et qui bien fait rigoler, à Béatrice pour le moment passer au boulot (au milieu de La Tremblade a pousser la voiture d'Eric), à Nicolas pour m'avoir tant parler de la Moldavie, à Adeline (malheureusement je ne suis pas drôle), à Tim pour m'avoir fit découvrir l'ultimate et ses margarita, à Yoann pour sa méthode d'entraînement pour l'ultimate (le coup de poigné du coup droit).

Je remercie aussi Delphine, Florence, Martine, Serge, Tristan, Jean-Pierre, Laurence, Stéphane, Raphaël, Jean-Côme, Denis et tous ceux que j'ai oublié, pour leur patience, leur soutien, leur conseil.

Merci à tout le monde.

BIBLIOGRAPHIE

ALDERMAN D. J. (1979). Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Marine Fishery Review* 41, 67-69.

AUDEMARD C., BARNAUD A., COLLINS C. M., LE ROUX F., SAURIAU P.-G., COUSTAU C., BLACHIER P., & BERTHE F. C. J. (2001). Claire ponds as an axperimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies : new perspectives. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 257, 87-108.

BERTHE F.C.J., F. LE ROUX, E. PEYRETAILLADE, P. PEYRET, D. RODRIGUEZ, M. GOUY & C. P. VIVARES (2000). The existence of the phylum Paramyxia Desportes and Perkins, 1990 is validated ny the phylogenetic analysis of the *Marteilia refringens* small subunit ribosomal RNA. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47(3): 288-293.

COMPS M. (1970). Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le bassin de Marennes. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 34, 317-326.

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J.R., COUSSERANS F., DUTHOIT J.L., & LE PENNEC M.A. (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linne. *Sci. Pêche. Bull. Inst. Pêches marit.* 240:7-29.

GRIZEL H. (1985). Etude des récentes épizooties de l'huître plate (*Ostrea edulis* Linné) et leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse Doctorat es Sciences, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 145 p.

HERRBACH B. (1971). Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 35, 79-87.

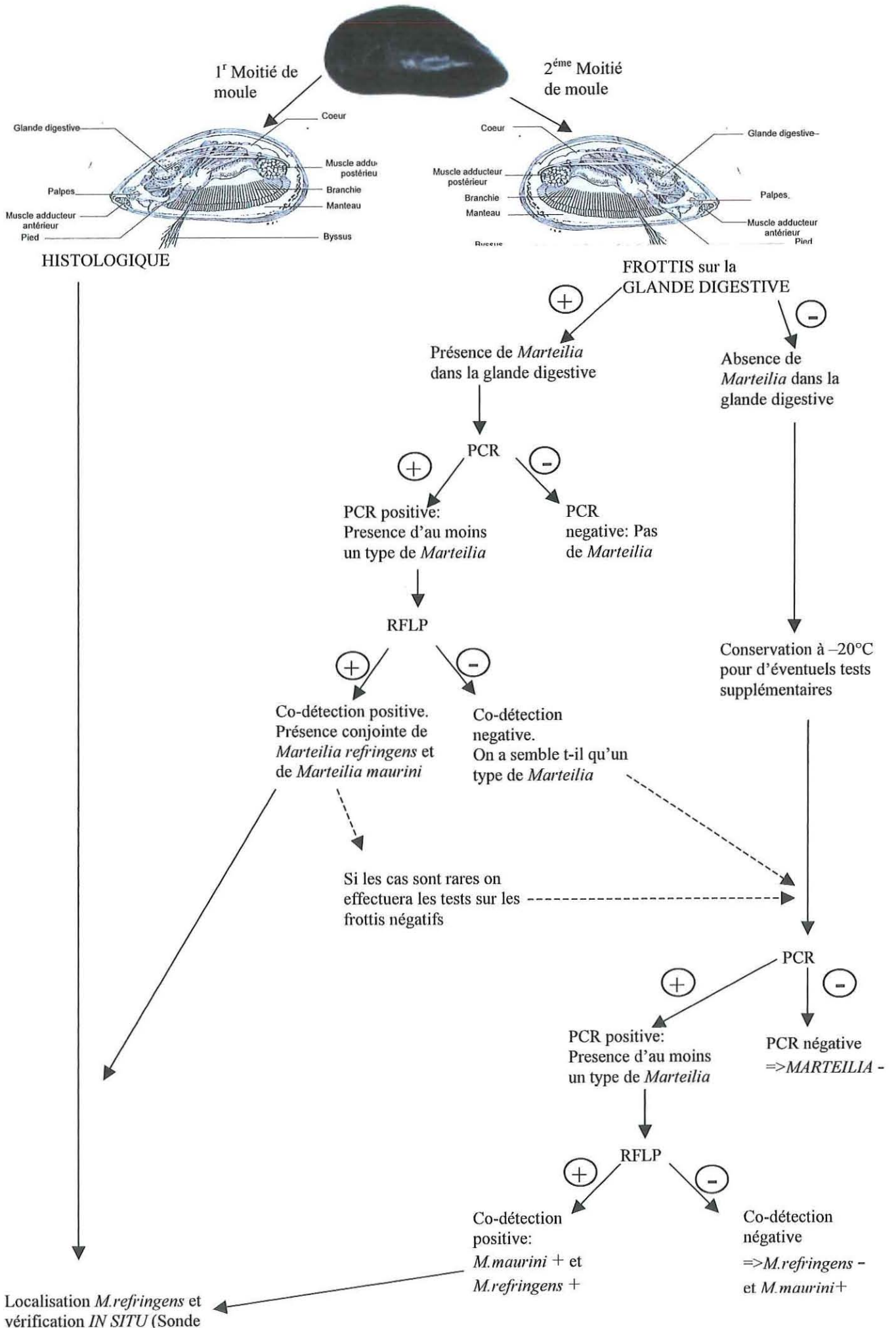
LE ROUX F., C. AUDEMARD, A. BARNAUD, F.C.J. BERTHE (1999). DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* 1 (6): 588-597.

LE ROUX F., G. LORENZO, P. PEYRET, C. AUDEMARD, A. FIGUERAS, C. VIVARES, M. GOUY & F.C.J. BRETHER (2001). Molecular Evidence for the Existence of Two Species of *Marteilia* in Europe. *Journal of Eukaryotic Microbiology* : 48 (4) : 449-454.

LUBAT V. (1990). Approches biologiques et moléculaire dans l'étude des myxosporidies, du PKX et des *Marteilia*. Thèse Doctorat es Sciences. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 118 p.

ROBLEDO, J.A.F.; & FIGUERAS, A. J. (1995). The effects of culture-site , depth, season and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from Galicia, Spain. *Journal of Parasitology* 81, 354-363.

APPROCHE EXPERIMENTALE



ANNEXE 2

RESULTATS OBTENUS POUR LES MOULES DE LA TRINITE SUR MER
POSITIVE EN FROTTIS


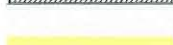
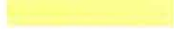
29-23-21

Numéro d'échantillon.	Résultat extraction ADN		PCR conservée pour 100µg/ml	PCR-ITS pour 100µg/ml	RFLP des Prod PCR-ITS
	DO 260/280	Quantité d'ADN µg/ml			
M-055-037	1,81	43,1	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-020	1,74	68,8	-	-	
M-055-048	1,67	43,4	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-018	2,17	28,7	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-011	1,93	53,1	+	-	
M-055-087	1,86	422,9	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-155	2,04	262,5	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-179	1,86	515,9	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-064	1,98	497,6	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-194	1,97	397	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-157	1,83	809,1	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-196	1,73	652,7	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-052	1,72	441,7	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-045	1,74	756,2	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-062	1,75	1255,9	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-150	1,69	600,6	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-081	1,72	555,8	+	-	
M-055-053	1,74	857	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-099	1,77	1023,5	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-120	1,74	529,2	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-049	1,79	1170,8	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-117	1,79	844,8	+	-	
M-055-068	1,71	519	+	-	
M-055-139	1,87	738	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-132	1,71	942	+	-	
M-055-070	1,86	1570,5	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-102	1,85	665,8	+	+	<i>M.maurini</i>
M-055-100	1,69	647,3	+	douteux	
M-055-090	1,72	784,9	+	douteux	

test non effectué
 résultat positif
 résultat négatif

RESULTATS OBTENUS POUR LES DIFFERENTS PRELEVEMENTS DE COPEPODES DE LA
CLAIRE


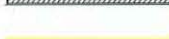

Numéro d'échantillon.	Résultat extraction ADN			PCR conservée pour 100µg/ml	PCR-ITS pour 100µg/ml	RFLP des Prod PCR- ITS
	DO 260/280	Dilution(µl)	Quantité d'ADN µg/ml			
PREMIER PRELEVEMENT DE COPEPODE: FAIT LE 10/07/03						
C-10/07-125	1,78	5+95	117		-	
C-10/07-300	1,77	5+95	230,6	+	+	<i>M.refringens</i>
SECOND PRELEVEMENT DE COPEPODE: FAIT LE 28/07/03						
C-28/07-80a	1,85	5+95	448,5	+	-	
C-28/07-80b	1,75	5+95	479,9	+	-	
C-28/07-100	1,85	5+95	406,7	+	-	
C-28/07-125a	1,97	5+95	563,3	+	-	
C-28/07-125b	2,01	5+95	322,7	+	-	
C-28/07-300		2+98	8,3	-		
C-28/07-400	1,87	5+95	860,3	+	-	

 test non effectué
 résultat positif
 résultat négatif

C-28/07-100: C= copepode
 28/07=date du prélèvement
 100=taille de la maille du tamis en µm sur lequel les ADN ont été récupéré

RESULTATS OBTENUS POUR LES MOULES DE LA CLAIRE

Numéro d'échantillon.	Résultat extraction ADN		PCR conservée pour 100µg/ml	PCR-ITS pour 100µg/ml	RFLP des Prod PCR-ITS
	DO 260/280	Quantité d'ADN µg/ml			
1	1,09	36,8	-	-	
2	1,25	283,3	-	-	
3	1,63	37,8	-	-	
4	1,73	47,6	+	-	
5	1,37	62,8	+	+	<i>M.maurini</i>
6	1,72	1221,1	-	-	
7	1,67	129,9	+	+	<i>M.maurini</i>
8	1,77	272,3	-	-	
9	1,88	796	-	-	
10	1,78	242,5	-	-	
11	1,76	797,6	-	-	
12	1,76	400,4	-	-	
13	1,75	72,7	-	-	
14	1,71	354,4	-	-	
15	1,73	1375,7	-	-	
16	1,75	299,4	-	-	
17	1,71	458	-	-	
18	1,68	59,4	-	-	
19	1,69	105,5	-	-	
20	1,65	201	-	-	
21	1,72	666,7	-	-	
22	1,7	86,4	-	-	
23	1,71	321,2	-	-	
24	1,71	552,4	-	-	
25	1,76	1139,8	+	douteux	douteux
26	1,72	419,1	+	-	
27	1,78	595,3	-	-	
28	1,77	1108,8	+	-	
29	1,72	694,1	+	-	
30	1,74	547,6	+	+	<i>M.maurini</i>
31	1,72	818,4	+	douteux	douteux
32	1,8	893,6	-	-	
33	1,7	1207,1	+	douteux	douteux
34	1,71	366,4	+	-	
35	1,68	370	-	-	
36	1,75	355	+	-	
37	1,67	359,7	+	douteux	douteux
38	1,72	538,1	+	-	
39	1,74	886	+	-	
40	1,75	553,5	+	-	
41	1,77	664,8	-	-	
42	1,74	407,4	+	-	

 test non effectué
 résultat positif
 résultat négatif