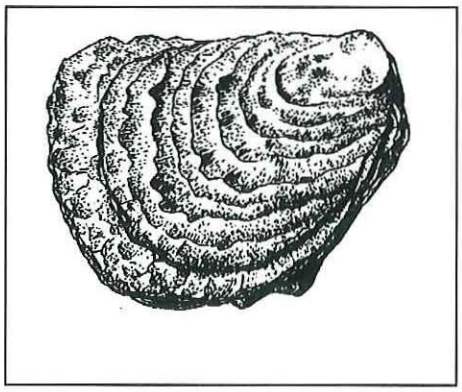
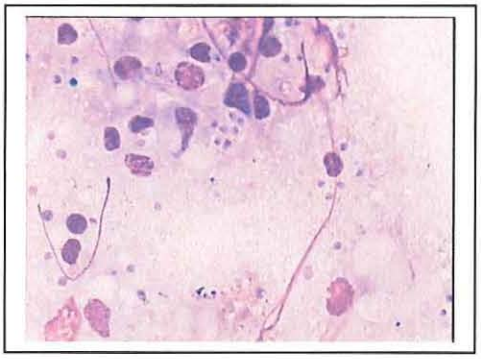
DUBOIS Rodolphe Lycée Jacques Bujault 79500 Melle

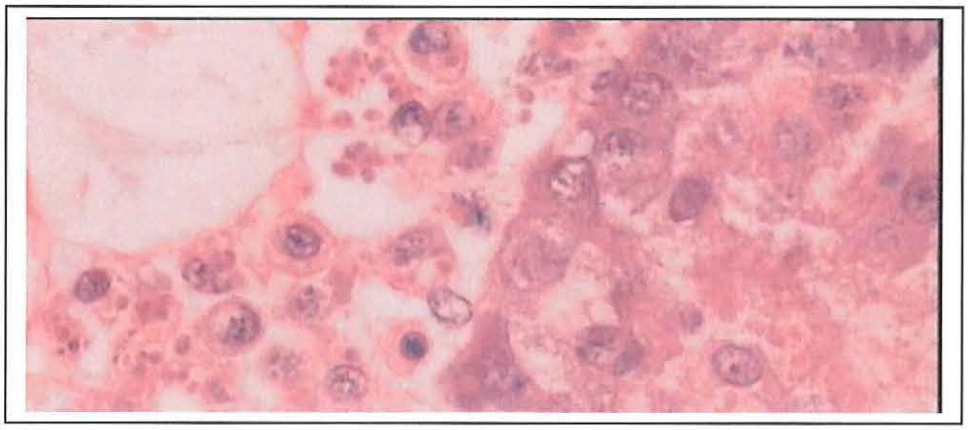
IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

Contribution à la validation de la technique de PCR pour la détection du parasite *Bonamia ostreae* chez l'huître plate, *Ostrea edulis*

E900 DUB.C.
04/1993
64618 3003







Stage effectué au Laboratoire de Génétique et Pathologie
de la station IFREMER de Ronce-les-Bains (17)

Brevet de Technicien Supérieur Agricole
D'analyses Biologiques et Biotechnologies

Session 2002-2004

SOMMAIRE

INTRODUCTION p.1

I. PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCEUIL p.2

1.1 L'IFREMER en général p.2

1.2 Présentation de la station IFREMER de Ronce-les-Bains p.3

1.3 Objectifs du Laboratoire Génétique et Pathologie p.5

II. CONTEXTE DU STAGE p.6

2.1 La production d'huîtres plates en France et informations sur les autres espèces p.6

2.2 Les principales maladies qui touchent *Ostrea edulis* p.7

2.3 La bonamiose p.8
2.3.1 Symptômes macroscopiques p.9
2.3.2 Symptômes microscopiques p.10
2.3.3 Mode d'infection de l'huître plate par le parasite p.11
2.3.4 Taxonomie p.12
2.3.5 Moyens de lutte p.13

2.4 Outils diagnostiques pour la détection de *Bonamia ostreae* p.14
2.4.1 Histologie et cytologie p.14
2.4.2 Outils moléculaires p.14
2.4.2.1 PCR p.14
2.4.2.2 Hybridation *in situ* p.15

2.5 Validation p.15
2.5.1 Etude de faisabilité p.15
2.5.2 Développement de la méthode et standardisation p.15
2.5.3 Détermination des caractéristiques de performances de la méthode p.16
2.5.4 Evaluation de la performance de la méthode pour la surveillance p.16
2.5.5 Maintien et amélioration des critères de validation p.16

III. MATERIEL ET METHODES p.17

3.1 Matériel biologique utilisé p.17

3.2 Traitement des échantillons p.17
3.2.1 Pour appositions p.17
3.2.2 Pour histologie p.17
3.2.3 Congélation p.17

3.3 Extraction d'ADN p.18

3.4 Vérification de la qualité de l'ADN extrait par spectrophotométrie UV p.18

3.5 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) p.19

3.6 Réalisation du gel d'agarose à 1% puis de l'électrophorèse p.20

IV. RESULTATS-DISCUSSIONS p.21

4.1 PCR universelle p.21

4.2 PCR pour la détection du parasite du genre *Bonamia* p.22
4.2.1 Comparaison des résultats acquis en PCR sur les échantillons de cœur et branchie p.22
4.2.2 Comparaison avec les appositions p.23
4.2.3 Comparaison par rapport à des données antérieures p.24
4.2.4 Problèmes rencontrés p.24

V. CONCLUSIONS-PERSPECTIVES p.26

BIBLIOGRAPHIE p.27

ANNEXE

INTRODUCTION

Ce rapport est le résultat d'un stage qui s'est déroulé au laboratoire de Génétique et Pathologie de la station IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) de Ronce-les-Bains. La station est située sur la côte Atlantique en Charente-Maritime et plus précisément dans le bassin ostréicole de Marennes-Oléron. Les principaux objectifs du laboratoire visent à développer des programmes d'étude chez les invertébrés marins, et plus particulièrement les mollusques bivalves (huîtres, moules, coques...) dans les domaines de la pathologie et de la génétique.

Mon stage s'inscrivait dans un travail de validation de méthode de PCR pour la détection du parasite intracellulaire *Bonamia ostreae* de l'huître plate française *Ostrea edulis*. Pour ce faire, les analyses ont été réalisées sur un lot de trois cent huîtres plates adultes en provenance de Quiberon (Bretagne). Les étapes suivies étaient les suivantes:

Pour chaque individu:

1. Extraction d'ADN qui a porté sur un échantillon de branchie et un échantillon de cœur.
2. Vérification de l'état de l'ADN extrait par PCR en utilisant des amorces universelles.
3. Détermination du statut de chaque échantillon vis-à-vis du parasite, par PCR en utilisant des amorces spécifiques du genre *Bonamia*.

Après avoir présenté la structure d'accueil et le contexte du travail réalisé, nous discuterons les résultats obtenus au cours de ce stage qui a eu lieu du 16 Juin au 5 Septembre 2003.

I.PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCEUIL:

1.1 L'IFREMER en général:

L'IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, est un Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial (EPIC) crée par un décret du 5 juin 1984 et qui gère un budget de près d'un milliard de francs. Ce budget provient en majeure partie de la subvention que lui verse l'Etat et à laquelle s'ajoutent des ressources propres que son statut d'EPIC lui permet de développer.

Les missions de l'IFREMER:

- la recherche finalisée dans tous les domaines de la mer et le développement des technologies d'interventions et de qualifications en milieu marin.
- la surveillance, l'observation et l'aide à la gestion des ressources et des milieux.
- le service public (aide à la décision), le conseil et l'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 marines.

Un peu plus de 1200 ingénieurs, chercheurs, techniciens et administratifs participent aux multiples missions de l'IFREMER. Ces personnes travaillent au siège social à Issy-les-Moulineaux, dans cinq centres (Boulogne-sur-Mer, Brest, Nantes, Toulon, Tahiti), des stations réparties le long du littoral français (Figure 1), et des délégations Outre-mer.
La présence de l'IFREMER sur l'ensemble du littoral constitue une des originalités et une des

Figure 1 Carte représentant les divers établissement rattachés à l'IFREMER en France.

forces de l'Institut. Elle permet à la fois d'assurer l'observation et la surveillance de l'environnement côtier et de rester proche du monde maritime et des professionnels de la mer. L'IFREMER est présent dans 78 laboratoires ou services de recherches répartis sur 24 sites sur le littoral métropolitain ou dans les DOM-TOM (Figure 2).

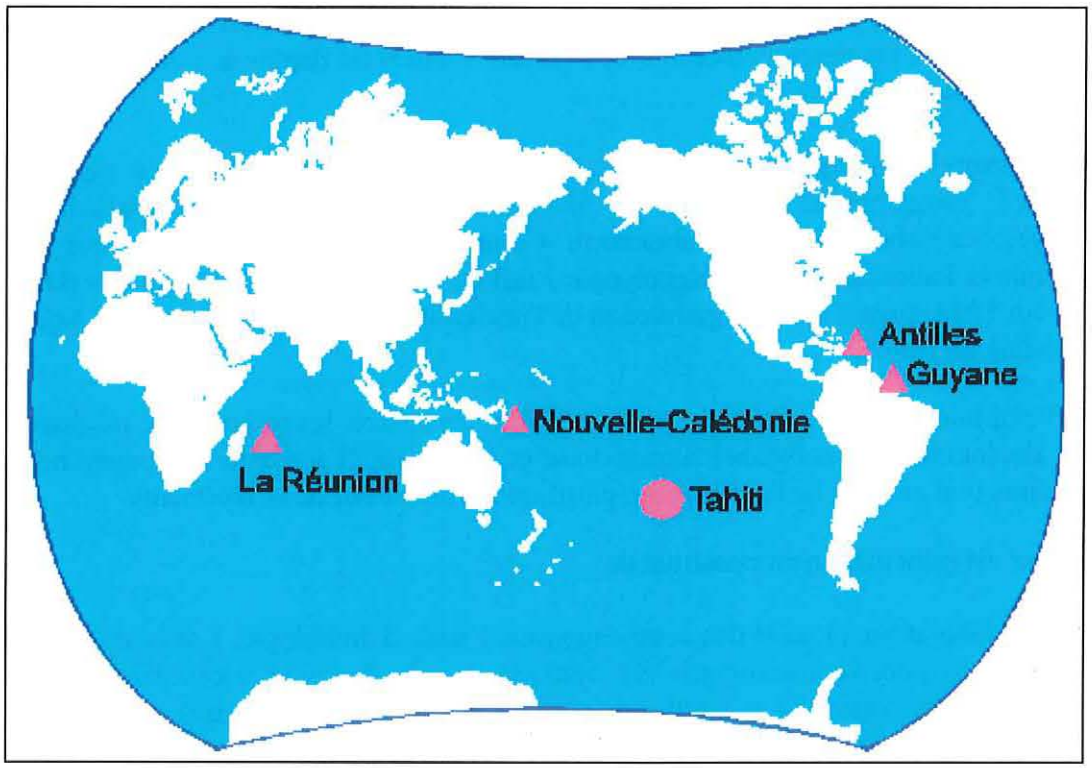


Figure 2 - Carte représentant les centres et stations rattachés à l'IFREMER et. se situant hors métropole.

Mais l'IFREMER, c'est aussi un groupe: en effet, à ces 1200 personnes, il faut ajouter environ 600 personnes qui travaillent dans des filiales pour valoriser la politique de recherche de l'Institut auprès, notamment, des professionnels de la mer et gérer les moyens de la flotte océanographiques.

1.2 Présentation de la station IFREMER de Ronce-les-Bains :

Située au cœur du bassin ostréicole de Marennes-Oléron, la station IFREMER de Ronce-les-Bains est composée de trois laboratoires qui développent des recherches dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral:

-Le Laboratoire Côtier "Environnement Littoral" de La Tremblade. Les avis donnés à l'Administration ou aux collectivités locales s'appuient sur les résultats de la surveillance ou ceux émanant des études spécifiques comme les études microbiologiques locales. Les missions de surveillance concernent un secteur qui correspond à la partie sud du département de la Charente-Maritime, s'étendant de la rive gauche de la Charente à la Gironde.

-Le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes (LCPC) de la Tremblade est implanté géographiquement dans le premier bassin ostréicole d'Europe (30 000 tonnes produites et 60

000 tonnes commercialisées chaque année). Il résulte du remaniement interne des laboratoires et unités de recherches au sein du Département Ressources Aquacoles qui s'est effectué en 1996 à l'IFREMER. Auparavant intégrée au laboratoire de Génétique – Aquaculture et Pathologie, l'Unité de Recherches Aquacoles en Poitou-Charentes (URAPC), crée en 1994, est devenue un laboratoire à part entière dans son fonctionnement depuis 1996 et officialisé en 1998 par la définition de ses mandats. La compétence géographique assurée par le laboratoire dans ses fonctions concerne l'ensemble des Pertuis Charentais depuis le Sud-Vendée jusqu'à l'embouchure de la Gironde.

-Le Laboratoire Génétique et Pathologie au sein duquel j'ai effectué mon stage, a une compétence géographique nationale et Internationale. En matière de pathologie des mollusques, ce laboratoire est Laboratoire Communautaire de Référence pour l'Union Européenne et Laboratoire de Référence pour l'Office International des Epizooties (OIE). Il a été crée fin 1994, suite à une réorganisation de l'ancien laboratoire des Ressources Aquacoles, puis remanié en 1996.

Le LGP emploie une quarantaine de personnes dont les cadres, les techniciens, les doctorants, les post-doctorants et le personnel administratif et logistique. Il accueille également beaucoup de stagiaires tout au long de l'année. Sa répartition s'effectue sur deux bâtiments.

Le premier est principalement constitué de:

-6 salles de laboratoire (1 salle des centrifugeuses, 1 salle d' histologie, 1 salle de préparation des échantillons pour la microscopie électronique, 1 salle de cultures cellulaires, 1 salle de bactériologie / électrophorèse et 2 salles réservées à la biologie moléculaire).
-1 salle de manipulation de radioéléments.
-1 salle climatisée pour le microscope électronique à transmission.
-1 laboratoire photo, 1 salle de rangement des produits, 1 laverie.
-8 bureaux, 1 salle de réunion et 1 bibliothèque.

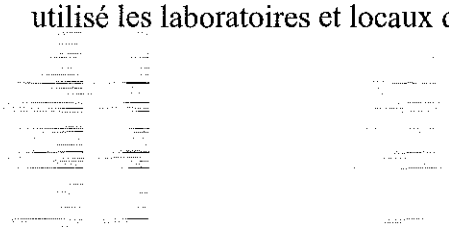
Le deuxième bâtiment est principalement constitué de:

-7 salles humides consacrées à l'élevage des huîtres.
-2 salles dédiées à la production de phytoplancton et une laverie.
-1 laboratoire de biométrie et une salle informatique.
-1 laboratoire de physiologie pour le CREMA l'Houmeau et l'URAPC.

Le laboratoire a également en charge la gestion et l'entretien de tout le circuit hydraulique qui se compose de:

-4 bassins de 300 m3 de réserve d'eau de mer.
-23 pompes de 10 à 300 m3/h.
-plusieurs kilomètres de tuyauterie.
-1 station de stérilisation au chlore des eaux de rejet.
-4 bassins de 20 m3 pour la production en masse de phytoplancton.

Mon thème de stage étant "la validation de méthode pour la détection du parasite intracellulaire *Bonamia ostreae* dans l'huître plate *Ostrea edulis*" j'ai donc principalement utilisé les laboratoires et locaux du premier bâtiment.



13. Objectifs du Laboratoire Génétique et Pathologie:

Spécialisé dans les domaines de la génétique et de la pathologie des invertébrés marins et plus spécifiquement des mollusques bivalves, le Laboratoire Génétique et Pathologie (LGP) dépend du Département des Ressources Aquacoles (DRA) lui-même placé sous la Direction des Ressources Vivantes (DRV) de l'IFREMER.

*Objectifs: Les principaux objectifs du laboratoire visent à développer des recherches chez les mollusques bivalves marins dans les domaines de:

- la pathologie: surveillance des ressources conchylicoles, identification des agents pathogènes, description de leur cycle de développement, mise au point des techniques de reproduction expérimentale des maladies, développement d'outils performants de diagnostic utilisables a des fins de recherche ou de contrôle, étude de l'impact de ces maladies et de leur évolution géographique et temporelle, étude des mécanismes cellulaires de défense mis en jeu par les mollusques dans certaines maladies.

et de

- la génétique: étude des ressources génétiques, tests sur de nouvelles espèces, de nouvelles populations et d'hybrides pour limiter les risques liés a 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 d'élevage ou éventuellement de faibles besoins métaboliques, pour améliorer la productivité des entreprises.

En tant que laboratoire thématique, le LGP anime les programmes de recherche en génétique et pathologie au sein de la DRV.

En pathologie, le LGP anime enfin un réseau de surveillance en pathologie des mollusques (REPAMO).

Par ailleurs, le LGP est impliqué dans le projet MOREST (mortalité estivale) qui étudie les huîtres creuses, à la fois dans les volets génétiques et pathologies.

L'IFREMER Ronce-les-Bains est reconnu comme Site Européen Marie Curie depuis 2001 pour la formation de doctorants des pays membres.

II.CONTEXTE DU STAGE:

2.1 La production d'huîtres plates en France et informations sur les autres espèces:

L'ostréiculture représente une part importante de l'aquaculture française avec une production d'environ 160 000 tonnes par an, ce qui place la France en quatrième position derrière la Chine, le Japon et la Corée du Sud (FAO, 2000). Cependant, le développement de cette activité peut être limité par des mortalités d'origine infectieuse. Les gisements naturels d'huîtres plates *Ostrea edulis* (Figure.3) sont exploités depuis des siècles et étaient jugés inépuisables.

Figure 3. Photo d'huîtres plates, *Ostrea edulis*.

Pourtant, sous la double action du climat (gelées) et de la surpêche, ces ressources montraient quelques signes d'épuisement.
De plus, l'huître plate *Ostrea edulis* a subi l'impact de deux maladies: la marteiliose et la bonamiose qui ont induit une diminution importante de sa production, qui est passée de 20 000 tonnes dans les années 70 à 1 800 tonnes aujourd'hui (annexe). L'huître plate est en majorité produite en Bretagne et dans une bien moindre mesure en Méditerrannée (exemple: Palavas, Leucate). La principale zone de captage d'*O. edulis* se situe dans la Baie de Quiberon (Morbihan), tandis que les zones de grossissement se situent à Quiberon, Cancale et Binic (Côtes d'Armor) (Figure.4).

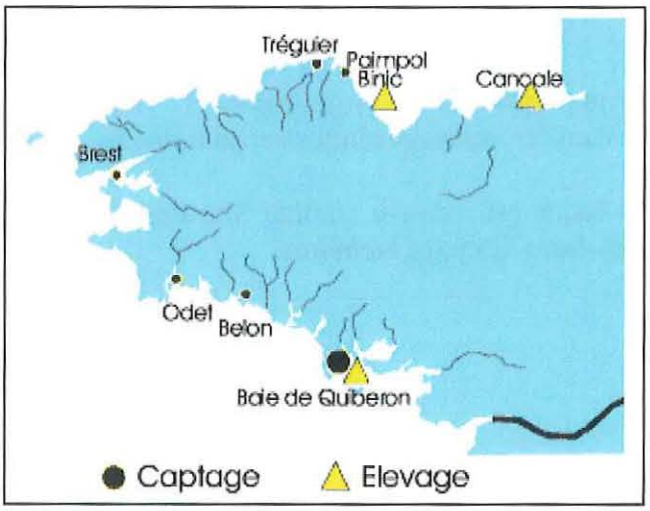


Fig.4 Schéma représentant les diverses zones d'élevage et de captage en Bretagne.

Par ailleurs, en France, une maladie virale (virus apparenté aux *Iridoviridae*) a totalement décimée les populations d'huîtres creuses portugaise *Crassostrea angulata* entre 1966 et 1971 (Comps 1970a, Comps et Duthoit, 1976). Dès 1860 ces huîtres étaient importées depuis le Portugal vers le bassin d'Arcachon. Au cours d'un de ces transports, le bateau "Le Morlaisien" fut obligé, en pleine tempête, de se réfugier dans l'estuaire de la Gironde, et de rester à l'abri plusieurs jours. Il fût contraint de jeter sa cargaison et c'est ainsi que cette espèce se répandit largement sur nos côtes grâce à un pouvoir de filtration cinq fois supérieur à celui de l'huître plate.

Pour palier à cette disparition de l'huître creuse portugaise, l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*, qui démontre une absence de sensibilité à l'iridovirus, a été importée en France et a permis son élevage et la relance de l'économie ostréicole; c'est ainsi que le cheptel d'huîtres portugaises touché par de sévères pertes fût remplacé progressivement par l'introduction de cette nouvelle espèce (Grizel et Heral, 1991)(Figure.5). C'est à l'heure actuelle l'espèce d'huître majoritairement produite en France avec 140 000 tonnes par an (FAO, 2001).

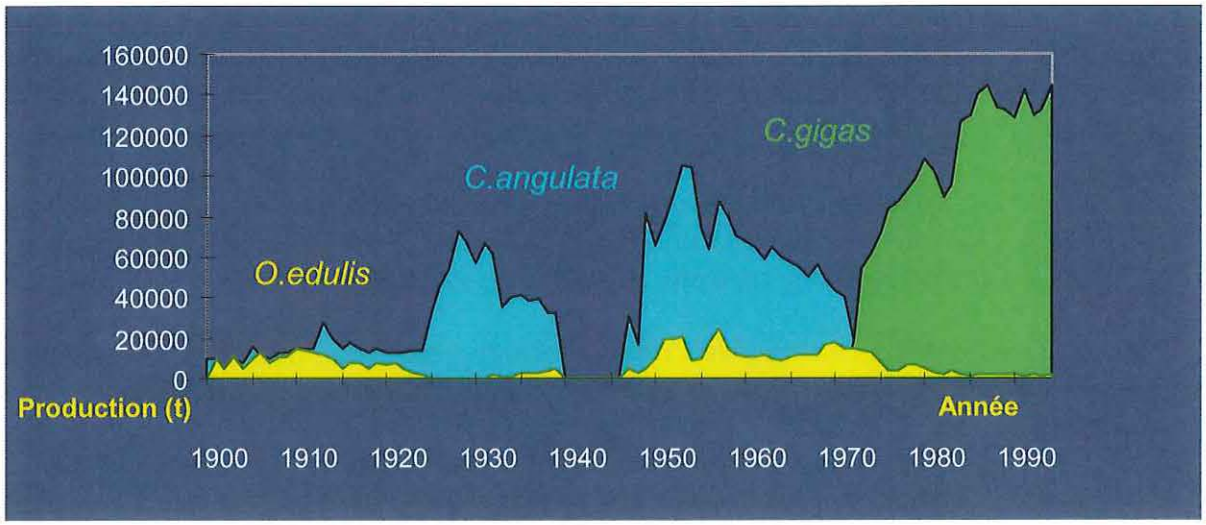


Figure.5 Graphique illustrant l'évolution de la production des différentes espèces d'huîtres élevées en France, de 1900 à 1995.

2.2 Les principales maladies qui touchent *Ostrea edulis:*

Deux principales maladies affectent l'huître plate *Ostrea edulis*. Il s'agit de deux maladies parasitaires, la marteiliose et la bonamiose:

La bonamiose due à *Bonamia ostreae* et la marteiliose due à *Marteilia refringens* sont deux maladies à déclaration obligatoire en France et en Europe. Cette mesure est imposée par l'Office International des Epizooties (OIE) en raison de l'impact économique considérable qu'elles ont sur la production d'huître plate française et européenne, mais aussi par la Commission Européenne (Directive 91/67/EEC, Liste II de l'annexe A).

- La première est apparue dans l'Aber Wrach, dans le Finistère (Herrbach, 1971), au cours de l'été 1968 et le parasite qui en est responsable est également signalé dans la région de Marennes (Charente-Maritime), ce protozoaire pathogène a été appelé *Marteilia refringens* (Comps 1970b, Herrbach 1971, Grizel *et al.*, 1974). Il s'est progressivement développé dans la plupart des centres d'élevage d'huîtres plates de Bretagne, mais aussi dans plusieurs bassins ostréicoles de la façade Atlantique.

-La bonamiose est apparue durant le mois de juin 1979 (Pichot *et al.*, 1980, Comps *et al.*, 1980, Comps, 1983), dans les parcs de l'Ile Tudy en Bretagne.
Elle sera décrite plus en détail ci-dessous.

2.3 La bonamiose:

Le parasite *Bonamia osteae* appartient au groupe des microcells. Le terme de microcells (Farley *et al.*, 1988) s'applique à des organismes non-sporulants, de petite taille de l'ordre de quelques µm), habituellement ronds et possédant un noyau circulaire ou excentré. Ce groupe est composé d'organismes très pathogènes qui induisent de fortes mortalités chez leurs hôtes respectifs. Les principaux représentant des microcell, listés par l'OIE, sont:

- *Bonamia ostreae* infecte les espèces d'huître *Ostrea edulis*, *O. conchaphila*, *O. angasi*, *O. puelchana* et *Tiostrea chilensis*. La répartition géographique de la bonamiose due à ce parasite est la suivante: Danemark, Pays-Bas, **France,** Irlande, Royaume Uni (sauf l'Ecosse), Italie, Espagne et USA.

- *Bonamia exitiosus* infecte les espèces d'huître *Ostrea angasi et Tiostrea chilensis.* La répartition géographique de la bonamiose induite par ce parasite est la suivante: Australie, Nouvelle Zélande.

- *Mikrocytos roughleyi* infecte l'espèce d'huître *Saccostrea commercialis*. La mikrocytose due à ce parasite se trouve uniquement en Australie.

- *Mikrocytos mackini* infecte les espèces d'huître *Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *O. edulis*, *Ostrea conchaphila*. La mikrocytose due à ce parasite se trouve uniquement sur la Côte ouest du Canada, USA.

Dans le cas de *Bonamia ostreae*, il est présent tout le long des côtes Française à l'exception de la Côte Nord, depuis la rive droite de la Seine à la frontière Belge, ainsi que le banc de Granville (Figure 6) (page ci-après).

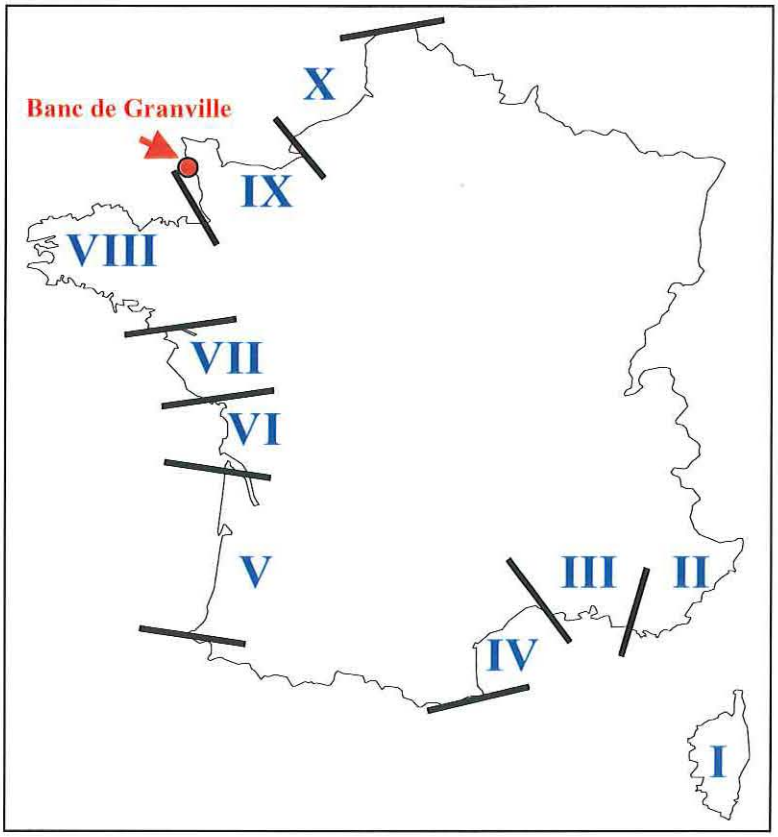


Figure 6. Carte représentant le découpage en 10 zones du réseau de surveillance REPAMO. *Bonamia ostreae* est absent de la zone X et du Banc de Granville.

La bonamiose décrite ci-après, est celle induite chez Ostrea edulis par le parasite *Bonamia ostreae* (vu ci-dessus).

2.3.1 Symptômes macroscopiques:

Extérieurement, aucun signe particulier ne caractérise cette maladie si ce n'est, à marée basse, la présence anormale d'huîtres "baillantes" sur les parcs. L'examen de ces sujets montre dans la majorité des cas une glande digestive normalement pigmentée et, souvent, la présence de produits de réserve. Toutefois, des observations plus poussées révèlent chez certaines huîtres une couleur légèrement grisâtre et une odeur nauséabonde caractéristique d'une phase prémortem.
Par ailleurs, des lésions branchiales peuvent être notées sur un ou plusieurs feuillets branchiaux. Si la présence de ces lésions est très souvent liée à celle du parasite, la maladie peut affecter une huître sans pour autant engendrer ces signes cliniques. Il y a une relation entre l'évolution de la maladie et celles des atteintes branchiales, les lésions étant plus importantes chez les huîtres bien infectées. Les lésions branchiales peuvent se présenter sous forme de perforations plus ou moins grandes, situées dans le milieu du filament branchial, ou à sa base, et d'indentations localisées au niveau de la bordure des branchies (Tige *et al.*, 1980) (Figure 7) (page ci-après).

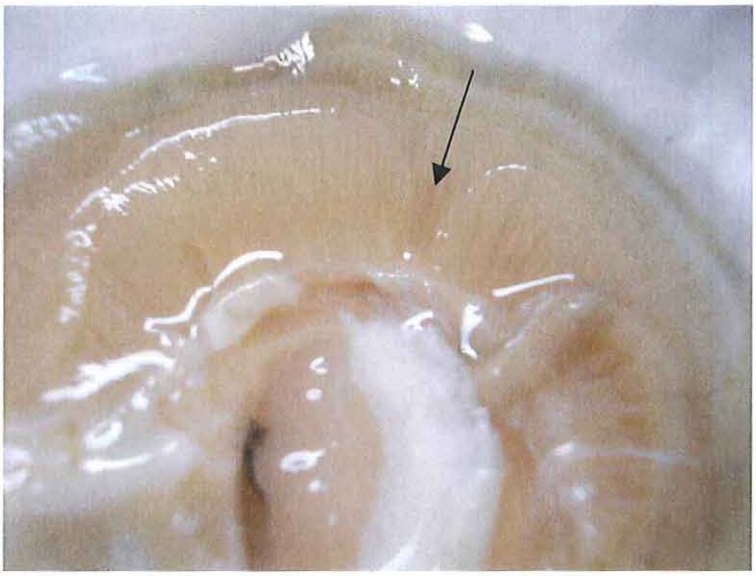


Figure 7. Indentations dues à *Bonamia ostreae* chez *Ostrea edulis*.

Leur nombre est variable et croît généralement avec l'intensité de la maladie. Le stade ultime de leur évolution est l'érosion très prononcée des feuillets branchiaux, entraînant dans ce cas une maigreur de l'hôte. Ces différentes lésions sont entourées d'un liseré jaunâtre caractéristique.

2.3.2 Symptômes microscopiques:

D'un point de vue anatomo-pathologique, l'infection se caractérise par l'accumulation d'hémocytes (cellules du système de défense) dans les lacunes de tous les tissus conjonctifs (Comps, 1983) Le parasite se présente comme de petites cellules de 2 à 3 µm de diamètre. (Figure 8).

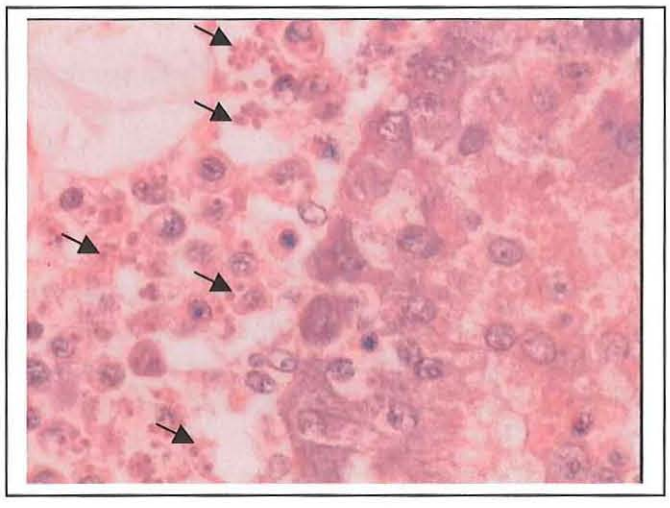


Figure 8. Présence de *Bonamia ostreae* (→) dans une coupe de cœur (*O. edulis*).

La présence de ces cellules est souvent associée à une dégradation du tissu conjonctif et à des ulcérations au niveau des branchies accompagnées d'importantes réactions inflammatoires
Deux formes parasitaires ont été mieux décrites en microscopie électronique: des formes denses et des formes claires (Comps, 1983).

*Les formes denses sont les plus répandues:
Ces cellules renferment un cytoplasme riche en grains denses qui correspondent à des ribosomes (Comps, 1983). Le noyau limité par deux membranes unitaires est constitué de matériel granuleux opaque aux électrons. Ces cellules renferment par ailleurs plusieurs mitochondries dont le diamètre varie entre 0.5 et 1.8 µm. A l'intérieur des mitochondries, les replis membranaires, peu nombreux, sont en forme de crêtes. Enfin, et suivant le plan de coupe, un corps dense sans structure apparente de 0.5 µm de diamètre peut être observé.
*Les formes claires, par rapport aux formes denses, présentent certaines différences structurales. Le noyau, peut comporter un volumineux nucléole localisé en périphérie. Les mitochondries sont caractérisées par la présence de crêtes membranaires plus nettes et plus nombreuses. Un troisième type d'organelle est représenté par des formes membranaires refermées en saccule. Les formes denses, plus répandues dans les tissus très parasités, et les formes claires, décrites dans les tissus d'huîtres peu parasités, ont été interprétées respectivement comme les formes de résistance et les formes végétatives du parasite.

2.3.3 Mode d'infection de l'huître plate par le parasite:

Bonamia. ostreae s'introduirait dans l'huître lorsque celle-ci filtre l'eau de mer pour se nourrir. Il prendrait alors pour cibles les hémocytes qui sont les cellules du système de défense. Il adhère aux hémocytes et se fait englober par eux par invagination de leur membrane plasmique. Il se trouve à l'intérieur de l'hémocyte dans une vacuole ressemblant à un phagosome. Il semble capable de survivre et de se multiplier à l'intérieur de ces cellules en évitant les mécanismes post-phagocytaires de défense des hémocytes (enzymes lysosomiales, enzymes protéolytiques, oxydants toxiques...). Il induit par la suite les dégâts cités précédemment.
Une étude en microscopie électronique réalisée par Montes *et al.*, (1994) a permis de décrire la présence de *Bonamia ostreae* dans des cellules épithéliales de branchie. La présence du parasite à ce niveau suggérerait qu'il soit libéré dans le milieu par les cellules épithéliales. L'hypothèse que le site d'entrée du parasite puisse être aussi les branchies ne peut toutefois être exclue. En effet, les branchies sont continuellement en contact avec l'eau de mer qui peut contenir des parasites. En outre, elles ne possèdent qu'une mince couche protectrice de cellules à mucus séparant le milieu environnant du système circulatoire (hémocytes). D'autre part, les lésions histologiques, caractérisées par des réactions inflammatoires localisées, confirmeraient cette dernière hypothèse. On ne peut toutefois omettre l'élimination de parasites dans les fécès puisque des lésions au niveau de l'épithélium stomacal ont été rapportées (Comps, 1983). Enfin, il est probable qu'un grand nombre de parasites soit libérés peu après la mort de l'huître à la suite de la dégradation des tissus par la lyse cellulaire. Malgré ces études, le cycle complet de *B. ostreae* reste aujourd'hui inconnu avec cependant une constante: aucune spore n'a jamais été décrite.
La possibilité pour le parasite de se transmettre à des huîtres saines par simple contact (cohabitation) avec des huîtres infectées a été démontrée expérimentalement, prouvant la non nécessité d'un hôte intermédiaire.
Autre fait important, les huîtres parasitées sont en très grande majorité des huîtres adultes (2-3 ans), tandis que les jeunes huîtres (appelé "naissain" jusqu'à 12 mois) montrent un taux de parasitisme proche de 0%.

2.3.4 Taxonomie:

Les organismes du groupe des microcells ne peuvent se distinguer par les lésions qu'ils induisent, ni par leur hôte ou leur aire géographique. La taxonomie de ces microorganismes

reposent donc sur des études ultrastructurales mais aussi de plus en plus sur l'analyse et la comparaison de séquences de gènes d'intérêt phylogénétique (exemple: gène codant pour la petite sous-unité ribosomale 18S).

Du point de vue de l'organisation ultrastructurale simple, *Bonamia ostreae* a été apparenté aux Haplosporidies mais il se distingue par la présence de quelques éléments structuraux: les particules denses structurées ou PDS présents dans les formes denses et les formes claires du parasite. Ces PDS ont été rapprochés des haplosporosomes décrits chez certaines Haplosporidies (Perkins, 1979).
Au niveau ultrastructural, le cytoplasme des formes denses, riche en grains ribosomaux de 2.5 nm, renferme des mitochondries pouvant atteindre 1.8 µm qui présentent quelques rares petites crêtes. En outre, il contient souvent une inclusion parasphérique de nature lipidique et de taille variable et des PDS à proximité de la membrane unitaire des cellules. Le rôle de ces particules denses structurées n'a pas été clairement déterminé. La présence d'ADN à l'intérieur des PDS a toutefois été suspectée. Ces particules mesurant 130 à 170 nm de long et 130 nm de diamètre seraient, selon Comps, (1983), riches en ADN. Elles sont constituées d'un noyau central opaque, enveloppé par un cortex composé d'une couche claire interne et d'une couche claire externe séparée par une couche médiane dense de 10 nm. Elles sont très probablement d'origine golgienne.
Le noyau, mesurant approximativement 1 µm, est constitué d'un nucléoplasme finement granuleux et dense aux électrons, entouré par deux membranes.
Le cytoplasme des formes claires présente des mitochondries comportant des crêtes internes plus nombreuses et tubulaires, des corps de Golgi composés de formations membranaires en saccules empilées par deux ou trois unités, de petites vésicules provenant du bourgeonnement des saccules et des haplosporosomes en moyenne plus grands que ceux des formes denses mais de structure identique. Un gros granule lipidique peut également être observé.
Le noyau est composé d'un nucléoplasme granuleux et d'un nucléole dense situé en position pariétale.
Des études ont également été menées sur la caractérisation moléculaire du parasite *B. ostreae*, grâce à des amorces spécifiques Bo-Boas, qui ont permis l'obtention des séquences de la petite sous-unité ribosomale (18S).
Devant l'impossibilité de rattacher ce parasite à un groupe déjà connu, un nouveau genre et une nouvelle espèce ont été créés: *Bonamia ostreae* (en 1980).

2.3.5 Moyens de lutte:
Pour préserver les cheptels et réduire à leur plus bas niveau possible les risques d'introduction et de propagation d'agents pathogènes, les moyens de lutte sont en général basés sur la prophylaxie médicale, le contrôle zoosanitaire et l'amélioration zootechnique et génétique.

- La prophylaxie médicale:

L'absence de réponse immunitaire "spécifique" rend la vaccination, au sens conventionnel du terme, impossible. Les huîtres ne possèdent pas de lymphocytes, cellules directement impliquées chez les vertébrés dans les réponses vis-à-vis d'un agent pathogène pouvant être stimulées au moyen de la vaccination.
D'autre part, les traitements médicaux, ne peuvent déboucher sur des applications pratiques, soit en raison de leur inefficacité, soit en raison de leur difficulté d'application car les huîtres sont élevées dans un milieu ouvert (Grizel, 1985). Ce type d'approche ne semble donc pas une voie à privilégier.

- Le contrôle zoosanitaire:

Outre un arsenal législatif (Directives européennes et législation nationale), le contrôle zoosanitaire repose sur la fiabilité des techniques de diagnostic pour limiter les transferts d'animaux infectés et contrôler ainsi la dissémination de la maladie. Les textes nationaux imposent un contrôle zoosanitaire du cheptel conchylicole français. Ce contrôle vise en particulier à déterminer le statut de la production vis-à-vis des agents pathogènes à déclaration obligatoire que sont *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae.*

- L'amélioration zootechnique et génétique:

Elle a permis, suite aux plans de relance successifs, d'améliorer les techniques d'élevage afin de limiter l'impact de la Bonamiose.
L'IFREMER, à partir de 1985, a adopté une démarche de sélection pour la résistance à *Bonamia ostreae.* L'Ifremer a très vite recouru à des surinfections expérimentales pour augmenter et contrôler les pressions de sélection (Mialhe *et al.*, 1988a, Hervio, 1992, Culloty et Mulcahy, 1992, Cochennec, 1997). Quelques années de sélection massale ont permis d'augmenter significativement la survie des huîtres par rapport à des témoins issus du milieu naturel (Martin *et al.*, 1993, Naciri, 1994, Baud *et al.*, 1997, Naciri-Graven *et al.*, 1999).
Depuis 1992, une réorganisation du programme a été opérée afin d'évaluer l'héritabilité et limiter l'importance de la consanguinité (Naciri-Graven *et al.*, 1998). Des expériences réalisées avec des huîtres issues de la troisième génération de sélection ont montrés des taux de survie significativement supérieur chez les huîtres sélectionnées comparativement aux huîtres naturelles, respectivement 52.3% et 2.5%. Les taux de survie sont, en outre, corrélés aux taux de prévalence par *B. ostreae* (Bédier *et al.*, 2001).
Le programme de sélection, tel qu'il est défini aujourd'hui, vise à sélectionner des animaux résistants à la Bonamiose mais s'attache aussi à améliorer les performances de croissance pour essayer "de prendre de vitesse" le développement de la maladie. En effet, les conséquences économiques de la maladie peuvent être surmontées de deux manières: soit en améliorant la survie au cours des deuxième et troisième années d'élevage, soit en obtenant des huîtres de taille commerciale plus rapidement.

2.4 Outils diagnostiques pour la détection de *Bonamia ostreae*:
Les mesures de contrôle reposent sur la détection et l'identification de *Bonamia ostreae,* et, par conséquent sur la sensibilité et la spécificité (définies ci-après dans le paragraphe 2.4.4) des techniques de diagnostic.

2.4.1 Histologie et cytologie:

La microscopie électronique à transmission (MET), est intéressante pour la description de nouveau parasite, ou dans le cadre d'une confirmation de diagnostic. Cependant, au vue de la lourdeur de cette méthode, elle ne peut être utilisée en routine.

La méthode de diagnostic de référence est l'histologie, la bonamiose se caractérisant par la présence de petites cellules (2-5 µm) à l'intérieur des hémocytes ou libres dans les tissus conjonctifs, en particulier ceux de la glande digestive et des filaments branchiaux. L'histologie présente l'avantage de considérer l'animal dans son ensemble; cependant cette technique est relativement lourde, peu sensible et nécessite du personnel compétent pour les lectures.
La technique des coupes histologiques a été cependant simplifiée peu à peu par la technique d'apposition de tissus cardiaques (Bachère *et al.*, 1982, Zabaleta et Barber, 1996, O'Neill *et al.*, 1998) ou de branchies. Histologie et apposition sont aujourd'hui retenues par l'Office International des Epizooties (Diagnostic manual for aquatic animal diseases, OIE, 2000).
Cette technique (Bachère, 1982, O'Neill *et al.*, 1998) n'a pas permis d'améliorer la sensibilité, mais la relative simplicité de mise en œuvre a réduit considérablement le délai de réponse. Aujourd'hui, cette technique est essentiellement utilisée dans le cadre de suivis d'épidémio-surveillance de sites déjà contaminés par le parasite.

2.4.2 Outils moléculaires:

Des outils moléculaires à la fois plus sensibles et plus spécifiques ont été développés pour la détection et l'identification de *Bonamia ostreae* tels que l'hybridation *in situ* et la PCR.

2.4.2.1 PCR:

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Karry Mullis et qui permet d'amplifier *in vitro* une partie spécifique d'un acide nucléique donné (ADN ou ARN) afin d'en obtenir une quantité assez importante pour être détectée.
Deux amorces (sens et anti-sens) spécifiques s'hybrident sur l'acide nucléique cible en présence d'un excès de désoxynucléotides et de Taq polymérase (ADN polymérase stable à haute température). La technique de PCR est une technique rapide à mettre en œuvre, généralement sensible et spécifique. Elle est un outil intéressant dans le cadre d'un diagnostic présomptif ou pour établir le statut d'une zone vis-à-vis d'un agent pathogène.
Deux techniques de PCR ont été développées pour la détection de l'agent *pathogène Bonamia ostreae* (Cochennec, 2000, et Carnegie, 2000.).
Nous avons retenu la technique développée par Cochennec *et al.*, dans le cadre de ce stage. Cette méthode repose sur l'utilisation des amorces spécifiques de genre Bo-Boas.

2.4.2.2 Hybridation *in situ*:

L'hybridation in situ (HIS) est une technique de biologie moléculaire qui permet de mettre en évidence et de localiser des séquences d'acides nucléiques dans des cellules ou des tissus par l'utilisation de sondes complémentaires. S'effectuant sur une coupe histologique de tissu, elle apporte ainsi des informations précises sur la localisation de l'agent pathogène ciblé.
Le marquage des sondes peut être réalisé par des isotopes radioactifs ("sondes chaudes") ou par des produits non- radioactifs ("sondes froides") soit fluorescents (FISH) soit non-fluorescents comme la biotine ("sondes biotynilées"), la digoxigénine ou des enzymes (phosphatase alcaline par exemple). Le mode de révélation varie en fonction de la nature du marquage, autoradiographie dans le cas de sonde radioactive, microscopie à fluorescence dans le cas de FISH, avidine ou streptavidine pour la biotine, anticorps marqués par un enzyme et/ou par l'or colloïdal pour la digoxigénine, anticorps ou chromogènes pour les enzymes.
En ce qui concerne le parasite *Bonamia ostreae*, la sonde ADN double brin utilisée pour réaliser l'hybridation *in situ* est produite en PCR en utilisant les amorces spécifiques de genre Bo-Boas (Cochennec, 2001). L'HIS permet de localiser les parasites à l'intérieur des hémocytes.

2.5 Validation:

Pour assurer la qualité de résultats d'analyses diagnostiques, il est nécessaire de mettre en place des systèmes d'assurance qualité et de contrôle qualité. Ceci requiert des protocoles bien établis et des échantillons-contrôles. La validation de la méthode est un autre facteur essentiel pour assurer que le résultat des tests reflète le vrai statut des échantillons.
Afin de standardiser la validation des outils diagnostiques des maladies infectieuses, l'Office International des Epizooties (OIE) y a consacré un chapitre entier dans son manuel OIE 2004.

La validation comporte 5 étapes:
- étude de faisabilité.
- développement de la méthode et standardisation.
- détermination des caractéristiques de performance de la méthode.
- évaluation de la performance de la méthode pour la surveillance.
- maintien et amélioration des critères de validation.

2.5.1 Etude de faisabilité:

Elle permet de savoir si la méthode choisie a des chances d'être validée, elle repose sur trois critères de base que sont:
- le choix des échantillons sur lesquels vont porter les analyses.
- le choix de la méthode.
- le choix des réactifs.

2.5.2 Développement de la méthode et standardisation:

Cette étape s'appuie sur l'optimisation et la standardisation des réactifs et protocoles qui comprend:
- la sensibilité analytique (il s'agit de la plus petite quantité de produit recherché pouvant être détectée par la méthode employée).
- la spécificité analytique (c'est lorsque la méthode s'emploie à ne rechercher que le produit voulu).

- l'évaluation préliminaire de la répétabilité (savoir si les mêmes échantillons fourniront les mêmes résultats).

Il est à noter que la sensibilité analytique n'a pas été définie pour la PCR pour la détection du parasite *Bonamia ostreae*.

2.5.3 Détermination des caractéristiques de performances de la méthode:

Les deux étapes précédentes indiquent que la méthode peut être utilisée pour la surveillance, l'étape suivante consiste à établir les caractéristiques de performances de la méthode.
Il s'agit d'estimer en particulier la sensibilité et la spécificité diagnostique.

- sensibilité diagnostique: aptitude d'un test à fournir une réponse positive chez un individu infecté. Elle s'estime par la proportion d'individus infectés fournissant une réponse positive au test.

- spécificité diagnostique: aptitude d'un test à fournir une réponse négative chez un individu indemne. Elle s'estime par la proportion d'individus indemnes fournissant une réponse négative au test.

2.5.4 Evaluation de la performance de la méthode pour la surveillance:

ans cette étape, il s'agit de définir les règles d'interprétation des résultats ainsi que les facteurs pouvant modifier la validité de la méthode:
- la mise en catégorie des données tests (positif ou négatif).
- calcul du taux d'infection dans la population cible.
- comptabiliser le nombre de résultats positifs ou négatifs, pour valider l'interprétation des résultats des tests.

2.5.5 Maintien et amélioration des critères de validation:

Une méthode validée doit en permanence être évaluée, par exemple la reproductibilité ou l'efficacité des réactifs utilisés doivent être testées. Cette dernière étape est axée sur deux points:
- remplacement des réactifs standardisés par comparaison avec des réactifs d'usage courant.
- étendre la validation à d'autres populations par des tests sur des animaux référencés représentant ces mêmes populations.

La validation de méthode permet de démontrer son aptitude et sa fiabilité vis-à-vis des exigences réglementaires et normatives en vigueur.

Ma participation dans le processus de validation de la méthode de détection du parasite intracellulaire *Bonamia ostreae* dans l'huître plate française *Ostrea edulis* par la technique de PCR, se situait au niveau de la troisième étape (Détermination des caractéristiques de performances de la méthode). Il s'agissait d'obtenir des résultats de qualité quant au statut des échantillons analysés vis-à-vis de l'agent pathogène *Bonamia ostreae*.

III.MATERIEL ET METHODES:

3.1 Matériel biologique utilisé :
Il s'agit d'un lot de trois cents huîtres plates françaises *Ostrea edulis* adultes (2-3 ans) provenant d'un parc en eau profonde de la Baie de Quiberon, qui est une zone de captage et de grossissement. Les huîtres analysées n'ont subi aucun transfert. Le nombre d'huîtres était en réalité de trois cent onze.
Chaque huître a été traitée de façon à pouvoir réaliser des analyses en appositions, en histologie et en PCR pour la détection du parasite *Bonamia ostreae.*

3.2 Traitement des échantillons:

3.2.1 Pour appositions:
Pour réaliser des appositions, il faut préalablement ouvrir l'huître en lui sectionnant le muscle adducteur en prenant soin de ne pas abîmer le corps du mollusque. Puis, le cœur est prélevé à l'aide d'une pince de précision, et séché brièvement sur du papier. Dix à quinze empreintes sont ensuite réalisées sur une lame. La même opération est réalisée avec le prélèvement de branchie. Les lames sont ensuite colorées à l'aide d'un kit hémacolor selon le protocole suivant:

- Une à deux minutes dans la solution d'hémacolor 1 (il s'agit de méthanol ayant le rôle de fixateur).
- Deux minutes dans la solution d'hémacolor 2
- Deux minutes dans la solution d'hémacolor 3

Après la coloration, les lames sont rincées à l'eau courante (5 minutes) puis mises à sécher à l'air libre. Pour le montage, les lames sont plongées dans un bain de xylène (solvant), puis on procède à la fixation d'une lamelle sur la lame à l'aide d'une goutte de résine Eukitt déposée à la pipette Pasteur. Les lames vont alors sécher une nuit sous hotte aspirante. Une fois sèche, les lames sont stockées à température ambiante. Les appositions seront observées au microscope optique.

3.2.2 Pour histologie (cassettes):
Les cassettes en plastique sont un moyen simple, rapide et efficace pour inclure en paraffine une tranche représentative de tous les tissus de l'animal. La tranche est faite à l'aide d'un ustensile tranchant, puis, placée dans la cassette avec une pince. La cassette est ensuite refermée puis placée dans du fixateur (eau de mer filtrée 600 ml; alcool 95° 600 ml; formol 30% 150 ml; glycérol 200 ml; + acide acétique 10% du volume) pendant au moins 24 heures. Les cassettes sont ensuite mises dans un automate qui assure la déshydratation des tissus par des bains successifs d'éthanol de concentration croissante puis de xylène et l'imprégnation tissulaire avec de la paraffine liquide à 60°C. Afin de former un bloc, les tissus sont placés dans un moule que l'on remplit de paraffine liquide puis les moules sont mis à refroidir. Une fois la paraffine durcie, les blocs sont démoulés et conservés à température ambiante pour être plus tard découpés en fine lamelle à l'aide d'un microtome. Elles seront par la suite déposées sur lame et colorées par différentes techniques, la plus utilisée étant la coloration à l'hémalun-éosine.

3.2.3 Congélation (pour extraction d'ADN):
Les prélèvements de cœur et de branchie sont conservés à -80°C dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. Le reste de l'animal, quant à lui, est conservé à -20°C en pochette plastique, pour pouvoir si besoin, reprélever des tissus pour d'éventuelles analyses moléculaires supplémentaires.

3.3 Extraction d'ADN :

1. Les échantillons (cœur et branchie) conservés à –80°C sont progressivement décongelés puis broyés à l'aide de pistons Pellet en plastique à usage unique. Ils reçoivent alors 500 µl de tampon de digestion, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%, pH 8 et additionné de protéinase K (0.2 mg/ml).
2. Les échantillons sont incubés 3 heures au minimum dans un bain-marie à 55°C.
3. 500 µl de solution de lyse de l'échantillon sont prélevés puis placés dans un tube Eppendorf de 2 ml auquel on ajoute 1 ml de solution de phénol-chloroforme. Le mélange est vortéxé puis centrifugé (10 000 t/min, 10 minutes, 25°C). Trois phases sont alors mises en évidence : la phase phénolique, au fond, contenant les lipides, la phase protéiques (ou interphase) formant une galette blanche où se trouvent les protéines retenues par le phénol et la phase aqueuse contenant les acides nucléiques qui est prélevée puis transférée dans un nouveau tube.
4. L'étape 3 est répétée pour éliminer les protéines restantes.
5. Au surnageant, sont cette fois-ci ajouté 500 µl de chloroforme afin d'éliminer les traces de phénol. Les échantillons sont vortéxés et centrifugés (10 000 t/min, 10 minutes, 25°C). Le surnageant est prélevé et transféré dans un nouveau tube.
6. Au volume de surnageant V, est ajouté 0.1 V d'acétate de sodium à 3 M et pH 5.4 et 2.5 V d'éthanol absolu (alcool 100°) afin de précipiter les acides nucléiques.
7. Après homogénéisation, les tubes sont incubés 30 minutes à –20°C afin d'accélérer la précipitation. Les échantillons sont ensuite centrifugés (10 000 t/min, 10 minutes, 4°C).
8. Un culot visible s'est alors formé dans le fond du tube. Le surnageant est éliminé. Le culot est rincé avec 1 ml d'éthanol à 70°. Le tout est centrifugé (10 000 t/min, 5 minutes, 4°C).
9. Le surnageant est à nouveau éliminé. Le culot est ensuite séché en plaçant les tubes ouverts dans une étuve à 50–60°C ou à l'air libre.

Les déchets toxiques tels que le phénol-chloroforme et le chloroforme sont récupérés dans des bidons spéciaux réservés à ces types de produits dangereux. Leur manipulation nécessite d'ailleurs le port de gants appropriés en nitrile et le travail sous hotte ventilée.

3.4 Vérification de la qualité de l'extraction et de la quantité d'ADN par spectrophotométrie UV (UltraViolet) :

L'ADN et les protéines absorbent dans le domaine de l'ultraviolet à des longueurs d'ondes respectives de 260 et 280 nanomètres. On vérifie la contamination par les protéines de l'extrait d'ADN à l'aide du rapport DO (Densité Optique) 260 / 280 (ADN / Protéines). Sa valeur doit être comprise entre 1.7 et 2. Une valeur proche de 1.7 indique une probable contamination en protéines.
Le spectrophotomètre permet également de quantifier l'ADN grâce à la DO à 260 nm.
La concentration (C) en ADN de l'échantillon est calculée en µg/µl selon la formule suivante, sachant que le coefficient 50 (en µg/µl d'ADN) correspond à une DO égale à 1:

$$C = DO\ 260 \times 50 \times (dilution / 1000)$$

Cette vérification s'effectue dans une cuve en quartz.

3.5 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :
Le milieu réactionnel doit contenir :

- Les deux amorces oligonucléotidiques monobrins complémentaires chacune d'une des extrémités à amplifier.
- Des désoxynucléotides libres dATP, dCTP, dGTP, dTTP qui vont être incorporables pour former le brin néosynthétisé.
- L'enzyme permettant la synthèse d'un néobrin à partir des amorces ; il s'agit d'une ADN polymérase thermostable, la plus utilisée étant la Taq polymérase.
- Du MgCl2 et une solution donnant au milieu réactionnel un pH et une concentration saline optimisant le fonctionnement de l'enzyme (tampon).

A ce mélange réactionnel est ajouté l'échantillon (ADN extrait) à tester.

Au cours d'un cycle, l'ADN bicaténaire subit plusieurs transformations :

- Dénaturation en deux brins monocaténaires.
- Hybridation des amorces sur la cible.
- Elongation = synthèse d'un nouveau brin à partir des amorces et grâce à la Taq polymérase. Il en résulte deux ADN bicaténaires.
- n cycles permettent d'obtenir 2^n copies d'ADN.

La PCR dite universelle est réalisée à l'aide des amorces universelles (s'hybrident avec tous types d'ADN) Cs1-Cas1 pour permettre de savoir si l'ADN n'a pas été dégradé. En effet, un ADN dégradé ne pourra être amplifié. Le protocole suivi est celui décrit page précédente.

La PCR pour la détection de *Bonamia ostreae* est réalisée à l'aide des amorces spécifiques de genre Bo-Boas (s'hybrident uniquement avec l'ADN du parasite étudié). Un résultat positif indique donc que l'échantillon, est par conséquent l'individu, est infecté par *Bonamia ostreae.*

Voici l'exemple du protocole que j'ai suivi (en µl/tube) :

	PCR universelle	PCR Bonamia
H_20	35 µl	32.5 µl
Tampon 10X	5 µl	5 µl
MgCl2 (50 mM)	2,5 µl	5 µl
DNTP (5mM)	5 µl	5 µl
Cs1 (100 mM)	0.5 µl	0.5 µl (Bo à 100 µM)
Cas1 (100 mM)	0,5 µl	0.5 µl (Boas à 100 µM)
Taq polymérase (5 U/µl)	0,5 µl	0.5 µl

Après une dénaturation initiale de 4 min à 94°C, les températures et temps de dénaturation, hybridation et élongation utilisés étaient respectivement, 94°C 1 min, 55°C 1 min et 72°C 1 min. Ces étapes étaient renouvelées 30 fois, puis suivies d'une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

Par la suite on conserve les échantillons à 4°C pour effectuer plus tard une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

3.6 Réalisation du gel d'agarose à 1% puis de l'électrophorèse:

Un gel d'agarose à 1%, 1 g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE 1X (Trisbase 40 mM; acide acétique 40 Mm; EDTA 1 mM.), est réalisé après dissolution par chauffage. L'addition de 5µl de BET (Bromure d'Ethidium) permet de suivre la migration de l'échantillon car il s'intercale entre les brins d'ADN et émet une fluorescence sous lumière UV. Le gel est entièrement immergé dans une cuve pour électrophorèse contenant du TAE 1X. Un marqueur de poids moléculaire est déposé pour permettre d'évaluer la taille de l'ADN qui a migré ainsi que des témoins négatifs et positifs indispensables pour l'interprétation des résultats. Un volume de 10 µl d'échantillon additionné de 2 µl de solution bleue permettant la visualisation de la migration du dépôt, est déposé dans chaque puits. L'ADN migre de l'électrode négative vers l'électrode positive.
Les échantillons migraient à 150 Volts pendant 45 minutes.
Après migration, le gel est observé sous lampe UV relié à un système vidéo permettant la prise de photos et ainsi de conserver les résultats des analyses effectuées.
Le gel est par la suite jeté dans un bidon pour déchets toxiques car il contient du BET, produit toxique qui se manipule également avec des gants en nitrile.

IV. RESULTATS – DISCUSSIONS :

4.1 PCR universelle :

La PCR universelle est employée pour vérifier l'intégrité de l'ADN extrait et savoir s'il est amplifiable. Un échantillon est positif si le produit de PCR a une taille de 700 paires de bases (pb) (Figure 9)

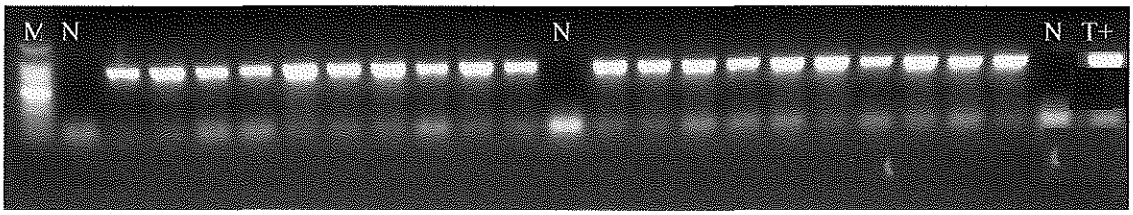


Figure 9. Exemple de résultat d'analyse en PCR universelle avec les couples d'amorces Cs1-Cas1, sur les échantillons 93 c à 112 c. M : marqueur de poids moléculaire 100 pb. N : témoin négatif. T+ : témoin positif.

Sur 311 individus traités, soit 622 échantillons analysés (cœurs et branchies), 20 d'entre eux n'ont pas permis d'obtenir d'amplification en PCR universelle 97% des échantillons présentent donc un produit d'amplification. Les résultats sont présentés sous forme d'un tableau (annexe). La quasi totalité des extraits d'ADN n'est pas dégradée et pourra être analysée en PCR pour la détection de *Bonamia ostreae*.

Les 20 échantillons (3 %) pour lesquels aucun produit n'a pu être obtenu en PCR universelle, sont les suivants : 2c, 2b, 3b, 5c, 6c, 8b, 12c, 28c, 65c, 69c, 75c, 77c, 79c, 80c, 81c, 85c, 91c, 123c, 127c et 309c.Ils ne seront donc pas analysés en PCR pour la détection de *Bonamia ostreae*.

Il est important de noter que la plupart des échantillons négatifs en PCR universelle, sont des échantillons de cœur (17/20). Cela peut s'expliquer du fait que dans le cœur se trouvent des pigments et des sels potentiellement inhibiteurs de la réaction de PCR. Une autre explication possible, qui cette fois-ci s'applique également aux échantillons de branchies, est l'obtention d'un rapport DO 260/DO 280 < 1.7 ou d'une trop faible quantité d'ADN.
De façon générale, les problèmes rencontrés lors des analyses en PCR universelle étaient pour la plupart liés à la concentration en ADN des échantillons. En effet, les principaux ajustements réalisés ont porté sur celle-ci. De meilleurs résultats étaient obtenus à des concentrations en ADN de l'ordre de 100 µg/ml pour les échantillons de branchies et 50 µg/ml pour les échantillons de cœurs. Des dilutions systématiques étaient effectuées sur chaque échantillon pour s'approcher au mieux de ces valeurs et ainsi optimiser les chances de réussite de la PCR.

4.2 PCR pour la détection de parasite du genre *Bonamia* :

4.2.1 Comparaison des résultats acquis en PCR sur les échantillons de cœur et de branchie
Pour des raisons de temps, les PCR pour la détection de *Bonamia ostreae* ont été effectuées sur 211 individus. Un échantillon est considéré positif si le produit de PCR obtenu à une taille de 300 paires de bases (pb) (Figure 10).

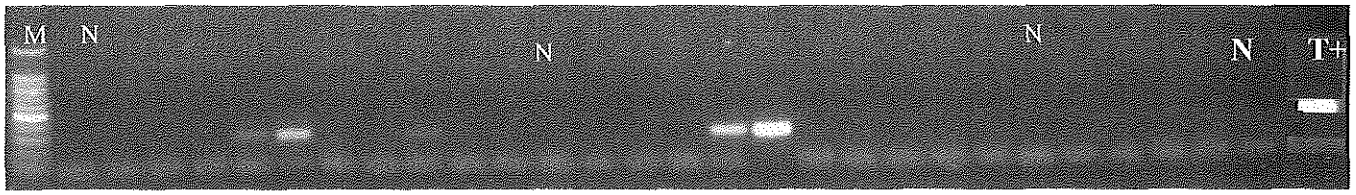


Figure 10. Exemple de résultat d'analyse en PCR pour la détection de *Bonamia ostreae*, avec les couples d'amorces spécifiques de genre Bo-Boas sur les échantillons 120 b à 131 c. M : marqueur de poids moléculaire 100 pb. N : témoin négatif. T+ : témoin positif.

Les PCR pour la détection de *Bonamia ostreae* ont été réalisées uniquement sur les échantillons ayant fourni un résultat positif en PCR universelle. En effet, si l'ADN parasitaire est présent dans l'extrait analysé, il pourra être amplifié.
L'interprétation des résultats (annexe) n'a pas été aussi aisée qu'en PCR universelle, en particulier lorsque les produits d'amplification obtenus étaient en faible quantité (faible intensité des bandes observées sur le gel d'agarose). Les résultats ont été classés en quatre catégories en fonction du degré d'intensité des produits d'amplification sur gel d'agarose:
- Positif, notés ++++.
- Moyennement positifs, notés ++.
- Faiblement positifs, notés +.
- Négatifs, notés –.

Au total, 75 échantillons sur 422, soit 17.8 %, ont été détectés positifs. Il s'agit de 29 échantillons de cœur et 46 échantillons de branchie.
Un individu est considéré positif lorsque l'un des deux échantillons (cœur ou branchie) est positif. Les individus positifs représentent 25,6% des individus analysés (54/211). Parmi ces 54 individus, 23 possèdent les deux échantillons positifs. On peut donc estimer que le taux d'infection à *Bonamia ostreae* est de 25,6% sur les individus analysés.

Une analyse comparative des résultats obtenus révèle un taux d'infection de 13.7% pour les cœurs (29/211) et de 21.8% pour les branchies (46/211).
Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer le plus fort taux d'infection dans les branchies :

- les échantillons de cœur peuvent présenter d'avantage d'inhibiteurs de la réaction de PCR que les échantillons de branchie.

- les branchies présentent effectivement un taux d'infection plus élevé. Le parasite s'introduirait dans l'huître lorsque celle-ci filtre l'eau de mer, les branchies seraient donc les premières à être en contact avec l'agent pathogène. Puis, avec le temps, le parasite serait véhiculé par l'hémolymphe à l'intérieur du système circulatoire de l'hôte via le coeur et se

retrouverait dans tous les organes de l'animal, notamment les branchies. De ce fait, le cœur qui concentre les hémocytes (cellules cible de *Bonamia ostreae*) devrait logiquement concentrer les cellules parasitaires. Les branchies, quant à elles, devraient être infestées par des parasites nouvellement infestant et des parasites redistribués via le cœur et présenteraient donc un plus grand nombre de parasites que le cœur.

- une autre hypothèse consiste à penser que l'infection à *B. ostreae* des individus analysés est récente.

4.2.2 Comparaison avec les appositions:

Les appositions de cœur et branchie des individus analysés en PCR ont été réalisés par le personnel du laboratoire d'analyse.
Au total, 28 échantillons sont apparus positifs, soit 6.6% (28/422). Il s'agit de 14 échantillons de cœur et 14 échantillons de branchie. 6.6 % des appositions de cœur sont infectés de même que les branchies. Si un individu est considéré positif lorsqu'au moins un échantillon (cœur ou branchie) est positif, 20 individus, soit 9.5%, sont infectés par *Bonamia ostreae*.

Contrairement à la PCR pour la détection de Bonamia ou le taux respectif de parasitisme dans les branchies et les cœurs était de 13.7 % et 21.8 %; avec les appositions, ce taux est de 50 % pour les deux types d'échantillons analysés en appositions.

Le fait d'obtenir un plus grand nombre d'échantillons positifs en PCR pour la détection de *Bonamia ostreae* qu'en appositions (75 contre 28) peut s'expliquer par une sensibilité des outils moléculaires généralement plus élevée permettant ainsi de détecter le parasite même s'il est très peu présent dans l'échantillon.

Quelques échantillons positifs en appositions n'ont pas été retrouvés positifs en PCR pour la détection de *B. ostreae*. Ces échantillons sont les suivants:
36 c, 36 b, 60 c, 66 b et 115 c.
Le 36 c possède une mauvaise densité optique (DO) et la concentration en ADN est peut-être restée trop élevée.
Le 36 b ne présente pas de réel problème avec une DO et une concentration en ADN correcte.
Le 60 c à une DO moyenne et une concentration en ADN un peu forte.
Le 115 c est celui alliant les meilleures DO et concentration en ADN.
Ces échantillons ne sont pas apparus positifs en PCR pour la détection de Bonamia, malgré des résultats de DO et de concentration en ADN pas forcément mauvais.
Ils ont tous été observés faiblement positif (+) à leur lecture en appositions. Le très faible nombre de parasites dans les échantillons pourrait expliquer que les résultats soient négatifs en PCR.

Toutefois, pour connaître la concordance entre les résultats obtenus en PCR pour la détection du parasite du genre Bonamia et les lectures d'appositions, une étude comparative a été réalisée.
Cette étude révèle que sur 20 individus déclarés positifs en appositions, 17 l'ont été également par la méthode de PCR, soit une concordance des résultats de 85 %.

4.2.3 Comparaison par rapport à des données antérieures :

La bonamiose est une maladie bien étudiée depuis les années 80. Si l'on se réfère aux séries temporelles acquises par le réseau de surveillance REPAMO, il semblerait que la fréquence de détection du parasite évolue de façon cyclique sur plusieurs années, notamment en fonction du taux de renouvellement de l'huître plate (à un fort captage est associé un fort taux d'infection).
La fréquence de détection du parasite *Bonamia ostreae* dans notre étude a été comparée avec les données acquises antérieurement sur le même secteur (Quiberon), pour des animaux de captage naturel et de même âge (2 - 3 ans). Les données sont issues de lecture d'appositions.
Voici les valeurs obtenues :
Pour l'année 1998, le taux d'infection sur les différents lots analysés était assez faible, avec des valeurs oscillant de 0 à 12%.
Pour 1999, légère augmentation avec des résultats variants de 6 à 18%.
Pour l'année 2000, il n'y a pas eu d'analyse sur ce type de lot.
Pour 2001, amplitude très importante des résultats allant de 20 jusqu'à 70% d'individus infectés.
Pour 2002, taux de parasitisme affichant une nette diminution et s'échelonnant de 16 à 40%.

En ce qui concerne le lot analysé, le taux d'infection du à *Bonamia ostreae* était de 9.5% (20/211) en appositions sur les individus testés en PCR pour la détection de Bonamia, ce qui est assez faible et qui traduirait la poursuite de la forte baisse amorcée en 2002.

4.2.4 Problèmes rencontrés:

Pour plusieurs échantillons, l'observation sous lumière UV du gel d'électrophorèse, laissait apparaître un signal quasi imperceptible. Pour palier à cela, l'augmentation du nombre de 30 cycles à 35 cycles a été testée. Par ce moyen, l'obtention d'un signal d'intensité plus forte était attendue. Malheureusement, cette solution s'est avérée peu concluante.
De plus, il semblerait que le passage à 35 cycles ai favorisé dans nos analyses l'apparition de «contaminations», qui se présentent sous la forme de témoins négatifs qui apparaissent positifs, ou d'échantillons positifs qui en réalité ne le sont pas.

L'observation des résultats d'électrophorèse laissait penser que les amorces à vérifier étaient présentes en excédant dans le mélange réactionnel. Une gamme de dilution (au 1/5, 1/10, 1/50 et 1/100) a été testée sur les amorces spécifiques Bo-Boas, sur un témoin positif de façon à retenir la concentration la plus intéressante. Les résultats les plus probants ont été obtenus avec les amorces diluées au 1/5 (Figure 11).

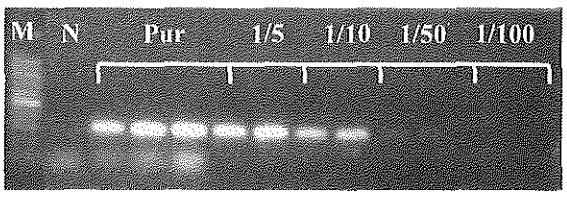


Figure 10. Résultats obtenus pour les dilutions des amorces Bo-Boas. M : marqueur de poids moléculaire. N : témoin négatif.

Par ailleurs, des contaminations ont été observées pour certaines des analyses réalisées et rendaient les données ininterprétables.
Pour palier à cela, plusieurs solutions ont été entreprises:
* changement de salle pour le dépôt des échantillons dans les tubes de PCR correspondants; la pièce précédemment utilisée présentant peut-être une contamination au niveau des surfaces ou de l'air ambiant.
* changement complet des réactifs utilisés pour la préparation de la PCR.

Un portoir neuf et une nouvelle boîte de cône à filtre ont également été utilisés pour limiter le risque de contamination.
Après ces différentes mesures, une amélioration notable des résultats de PCR a été observée.

Enfin, le dernier problème fut l'apparition de multiples bandes qui se manifestaient sous la forme de bandes surnuméraires à des tailles non attendues (nombre variable) qui se superposaient les unes aux autres (Figure 12).

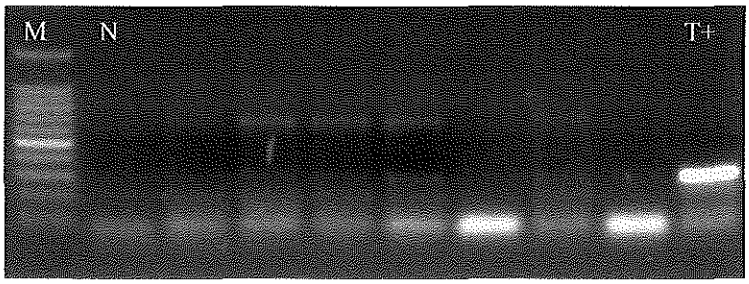


Figure 12. Photo représentant le phénomène de « multiples Bandes ». M : marqueur de taille 100 pb. N : témoin négatif. T+ : témoin positif.

Ces produits peuvent s'expliquer par un accrochage non-spécifique des amorces Bo-Boas.

V. CONCLUSIONS-PERSPECTIVES:

Le travail effectué pendant ce stage s'inscrit dans le cadre d'une validation de méthode de PCR pour la détection de l'agent pathogène et parasite intracellulaire *Bonamia ostreae* chez l'huître plate française *Ostrea edulis*.
Le lot d'huîtres à analyser, soit les trois cent onze huîtres plates adultes (2-3 ans) en provenance de Quiberon (Bretagne, Morbihan) et issus de captage naturel, a pu être testé dans sa totalité en PCR universelle.
En revanche, les différents contre-temps causés par les problèmes de contaminations et les divers ajustements (notamment les dilutions), ont engendré un retard qui n'a pas permis d'analyser le lot dans son ensemble en PCR pour la détection du parasite *Bonamia ostreae*.
Toutefois, deux cent onze individus ont été traités et nous ont permis de tirer quelques conclusions intéressantes. Ces premiers résultats révèlent un taux d'infection du lot analysé de 9.5% en appositions et 25.6% en PCR pour la détection de *Bonamia ostreae*. La PCR semble donc plus sensible que les appositions. A noter également, une tendance à des taux de parasitose plus élevés dans les prélèvements de branchies que dans les cœurs; avec respectivement des taux d'infections de 21.8% et 13.7% en PCR et équivalent en appositions avec 50% et 50%.
La méthode de PCR étant plus sensible que celle des appositions de tissus, cette observation traduirait le fait qu'il s'agisse peut-être d'une infection récente.
Dans le cadre de la validation de la méthode, les résultats accumulés permettent de répondre à de nombreuses questions (concentration des amorces, concentration en ADN des échantillons de cœur et branchies, nombre de cycle d'amplification…).
Toutes ces réponses ont contribué à faire progresser le projet de validation de cette méthode de PCR.

Par la suite, pour finaliser la validation de méthode qui a été entreprise, les mêmes analyses devront être réalisées sur un plus grand nombre d'échantillons. Les résultats ainsi acquis permettront de calculer la sensibilité et spécificité diagnostiques de la méthode. Par ailleurs, la comparaison des résultats obtenus pour les cœurs et pour les branchies en fonction de la technique utilisée permettra de choisir de façon plus pertinente les tissus à analyser, voire à mieux comprendre l'évolution du parasite dans son hôte.

BIBLIOGRAPHIE

BACHERE, E., 1982. Bonamia ostreae (PICHOT et coll., 1980) parasite de l'huître plate : comparaison de deux méthodes de diagnostic. Cons. int. Explor. Mer, 28 : 1-10.

BACHERE, E., DURAND, J. et TIGE, G., 1982. Bonamia ostreae (PICHOT et coll., 1980) parasite de l'huître plate : comparaison de deux méthodes de diagnostic. Cons. int. Explor. Mer, 28 : 1-10.

BAUD, J.P., GERARD, A. and NACIRI-GRAVEN, Y., 1997. Comparative growth and mothality of *Bonamia ostreae*-resistant and wild oyster *Ostrea edulis* in an intensive system. Mar. Biol. 130 : 71-79.

BEDIER, E., COCHENNEC-LAUREAU, N., LANGLADE, A., KOPP, J., GOYARD, E., et GERARD, A. 2001. Recovery of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.) : new development. EAS, August 4-7, 2001, Trondheim, Norway.

CARNEGIE R., BARBER B.J., CULLOTY S.C., FIGUERAS A.J. & DISTEL D.L. 2000. Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. *Dis. Aquat. Org.*, 42, 199–206.

COCHENNEC, N., 1997. La Bonamiose : caractérisation du parasite *Bonamia ostreae* et étude de ses interactions avec l'hôte, l'huître plate *Ostrea edulis*. Mémoire Ecole Pratique des Hautes Etudes. Sciences de la Vie et de la Terre. Montpellier, 173 pp.

COCHENNEC, N., 2001. *Bonamia ostreae*, parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis* : sa position taxonomique parmi les parasites du groupe des «microcell», analyses des interactions hôte/parasite chez plusieurs populations d'huîtres plates. Thèse Doctorat d'Etat en Biologie Moléculaire, Université de La Rochelle, 211 pp.

COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F. & A. GERARD, 2000. Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J. Invertebr. Pathol.* 76 : 26-32.

COMPS, M 1970b. Observation sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (Ostrea edulis L.) dans le bassin de Marennes. Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 34(3) : 317-326

COMPS, M., 1983. Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des Mollusques bivalves marins. Thèse Doctorat d'Etat en Sciences Naturelles, Université de Montpellier, 128 pp.

COMPS, M. et DUTHOIT, J.L. 1976. Infection virale associée à la «maladie des branchies» de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. C.R. Acad. Sc., D, 283 : 1595-1596.

COMPS, M., TIGE, G., and GRIZEL, H., 1980. Etude ultrastructural d'un protiste de l'huître *Ostrea edulis* L. C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 290 : 383-384.

CULLOTY, S.C. and MULCAHY M.F., 1992. An evaluation of anaesthetics for *Ostrea edulis* L. 4th internat. Colloq. Marine Aquaculture; 17-21 Sept., Vigo (Pontevedra), Spain.

FARLEY, C.A., WOLF, P.H., and ELSTON, R., 1988. A lont-term study of «microcell» disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g.n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp.n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp.n.). *Fishery Bulletin* 86:581-593.

GRIZEL, H., 1985. Etude des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse Doctorat d'Etat en Sciences Naturelles, Université de Montpellier, 145 pp.

GRIZEL, H., and HERAL, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. J. Cons. Int. Explor. Mer, 47, 339-403.

GRIZEL, H., COMPS, M., BONAMI, J.R., COUSSERANS, F., DUTHOIT, J.L., LE PENNEC, M.A., 1974. Recherche de l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis*, Linné. Bull. Inst. Pêches. Marit., 240, 7-30.

HERRBACH, B. 1971. Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 35(1) : 79-87.

HERVIO, D., 1992. Contribution à l'étude de *Bonamia ostreae* (Ascetospora), protozoaire parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* (Bivalvia), et à l'analyse des interactions hôte-parasite. Thèse de 3ème cycle en Biologie fondamentale et appliquée (Spécialité : Protistologie), Université de Clermont-Ferrand, 170 pp.

MARTIN, A.G., GERARD, A., COCHENNEC, N. and LANGLADE, A., 1993. Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae* : assessment of the resistance of a first selected generation. European Aquaculture Society, Special Publication, Ghent, Belgium, 18 : 545-554.

MIALHE, E., BACHERE, E., CHAGOT, D., and GRIZEL, H., 1988a. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot and coll., 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. Aquaculture, 71 : 293-299.

MONTES, J., ANADON, R., and AZEVEDO, C., 1994. A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J. Invertebr. Pathol.* 1-6.

NACIRI, Y., 1994. Sélection des mollusques : Bilan et nouvelles perspectives concernant la croissance, la qualité et les résistances aux maladies. Bordeaux Aquaculture, 54-61.

NACIRI-GRAVEN, Y., HAURE, J., GERARD, A. and BAUD, P., 1999. Comparative growth of *Bonamia ostreae* resistant and wild flat oyster *Ostrea edulis* in an intensive system : II second year of the experiment. Aquaculture 171 : 195-208.

NACIRI-GRAVEN, Y., MARTIN, A.G., BAUD, J.P., RENAULT, T, and GERARD, A., 1998. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 224 : 91-107.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000. Diagnostic manual for aquatic animal diseases. Third edition, 2000.Edt OIE, Rue de Prony, 75 017 Paris.

O'NEILL, G., CULLOTY, S. and MULCAHY, M., 1998. The effectiveness of two routine diagnostic techniques for the detection of the protozoan parasite Bonamia ostreae (Pichot et al., 1980.

PERKINS, F.O., 1979. Cell structure of shellfish pathogens and hyperparasites in the genera *Minchinia*, *Urosporidium*, *Haplosporidium*, and *Marteilia* – taxonomic implications.Mar.Fish Rev. 41(Jan.-Feb.) : 25-37.

PICHOT, Y., COMPS, M., GRIZEL, H. et RABOUIN M.A., 1980. Recherches sur *Bonamia ostreae*, gen. n. sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43 : 131-140.

TIGE, G., GRIZEL, H. et COMPS, M., 1980. Données sur le nouveau parasite de l'huître plate. Situation épidémiologique. – Cons. Inter. Explor. Mer, Spec. Sess. Copenhague 1980, N° 39, 7 p.

ZABALETA, A. and BARBER, B.J., 1996. Prevalence, intensity and detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* L : in the Damaniscotta River area, Maine. J. Shellfish Res. 15 : 395-400.

RESUME :

Bonamia ostreae, l'agent de la bonamiose, est un parasite intracellulaire ayant pour cible les hémocytes (cellules du système de défense) de l'huître plate *Ostrea edulis*. Il induit chez son hôte des lésions branchiales, telles que des perforations ou des indentations pouvant aller jusqu'à la mort du mollusque. Le travail réalisé au cours de ce stage s'inscrivait dans une démarche de validation de méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction) pour la détection de ce parasite. Les analyses ont porté sur un lot de trois cent onze huîtres plates *Ostrea edulis* adultes (2-3 ans), issus de captage naturel et provenant de Quiberon (Bretagne). Pour chaque individu, une extraction d'ADN a été réalisée sur un échantillon de cœur et de branchies. Afin de déterminer si l'ADN extrait n'a pas été dégradé et serait à même d'être amplifié, chaque échantillon a été analysé en PCR universelle utilisant des amorces Cs1-Cas1 (s'hybrident à l'ADN codant l'ARNr de la petite sous-unité ribosomale).
211 individus présentant des résultats positifs en PCR universelle ont été analysés en PCR pour la détection de parasite du genre *Bonamia* en utilisant les amorces Bo-Boas. 25.6% de ces individus présentent des résultats positifs pour le cœur et/ou les branchies. La fréquence de détection du parasite dans les échantillons de cœur et de branchies est respectivement de 13.7% et 21.8%. Pour ces mêmes individus, la lecture d'appositions de cœur et de branchies révèle une parasitose de 9.5%, avec autant d'échantillons de cœur et de branchies positifs. Un plus grand nombre d'individus a été retrouvé positif en PCR qu'en apposition, car cette technique est plus sensible. De plus, comparés aux données antérieures, les résultats en apposition du lot analysé dans le cadre de ce stage (9.5%) sont faibles.

Mots-clés :

Bonamia ostreae, agent pathogène, bonamiose, hémocytes, huître plate, *Ostrea edulis*, PCR, validation.