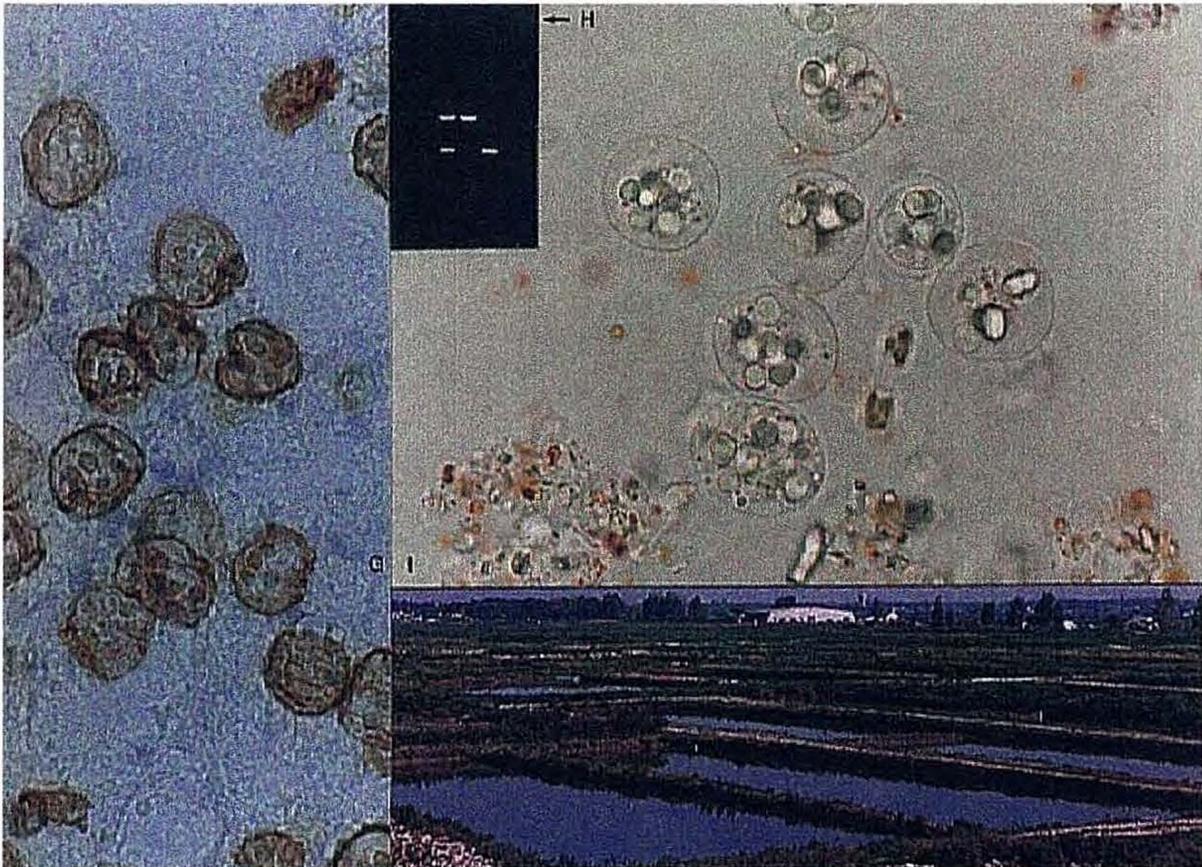


**Implication d'hôtes benthopélagiques dans le cycle de
Marteilia refringens parasite de l'huître plate *Ostrea edulis*:
mise en place d'outils de détection et de validation de sa présence
chez des hôtes potentiels**



par

Corinne AUDEMARD

CREMA l'Houmeau & IFREMER GAP, La Tremblade

**Implication d'hôtes benthopélagiques dans le cycle de *Marteilia refringens*
parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* :
mise en place d'outils de détection et de validation
de sa présence chez des hôtes potentiels.**

Résumé

L'huître plate, *Ostrea edulis* a subi depuis les années 1970 deux graves épizooties provoquées par les parasites protozoaires, *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*. Si, pour le premier de ces parasites, des huîtres plates tolérantes ont pu être sélectionnées, la marteiliose ne peut être contrôlée que par une gestion du risque de contamination. Dans ce cadre, la connaissance du cycle parasitaire de *Marteilia refringens* est primordiale. Les travaux réalisés à ce sujet ont permis de poser l'hypothèse d'un cycle hétéroxène. Au cours de notre étude la recherche du parasite a été effectuée sur des espèces du zooplancton, de la méiofaune et de la macrofaune prélevées au sein d'un biotope sélectif, les claires ostréicoles. Le parasite a été recherché par la technique de polymérisation en chaîne (PCR) au sein des différentes espèces de ces groupes. La détection en PCR du parasite au sein d'une espèce de la macrofaune *Cereus pedunculatus* (Cnidaires, Actiniaires) a été confirmée par différentes techniques (Southern blot, séquençage, hybridation *in situ* et histologie). Cette espèce pourrait constituer un hôte potentiel de *Marteilia refringens*. Cette étude ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude du cycle parasitaire de *Marteilia refringens*.

Ce travail a été réalisé de février à juin 1998
sous la direction conjointe de

SAURIAU P.G.
CREMA l'Houmeau, BP 5, 17137 L'Houmeau

&

BERTHE F.
IFREMER, Laboratoire de Genetique et Pathologie
BP 133, 17390 La Tremblade, France

Remerciements

Je remercie M. Héral, A. Gérard et J. P. Flassch pour m'avoir accueilli au sein du CREMA L'Houmeau et du centre IFREMER GAP de la Tremblade.

Au cours de cette étude il était nécessaire que j'aborde plusieurs domaines de la biologie. Pour ce faire j'ai pu bénéficier des compétences de chercheurs d'horizons très divers, formant ce que je pourrais appeler, l'équipe Marteilia. Ce sont ces personnes que je tiens avant tout à remercier.

Je remercie Monsieur Pierre-Guy Sauriau, océanologue biologiste au CNRS, et directeur de ce stage, pour ses conseils, sa disponibilité et son soutien constant, du début jusqu'à l'extrême fin de ce stage.

A Monsieur Franck Berthe, spécialiste incontestable de Marteilia, pour ses connaissances et son optimisme. Quoiqu'il arrive par la suite, merci d'y avoir cru et d'y croire encore...

Je tiens aussi à remercier Frédérique Le Roux, biologiste moléculaire qui m'a appris tout ce que je sais de l'ADN. Merci pour ta patience et tes conseils.

A Monsieur Benoît Sautour qui m'a permis de découvrir un autre monde de la miniature, celui du zooplancton. Je tiens à le remercier pour son accueil à la station de Wimereux et sa précieuse aide dans la détermination des espèces de copépodes.

Je n'oublie pas Antoine Barnaud, autre stagiaire embarqué au sein de l'équipe Marteilia. Merci pour ton aide mais, surtout, merci pour ta bonne humeur.

Je tiens à adresser mes remerciements à Messieurs Philippe Blachier et Yvan Zanette du CREA ainsi qu'à l'ensemble des techniciens pour leur aide et l'intérêt qu'ils ont montré pour cette étude.

Enfin, merci aux stagiaires, thésards des laboratoires du CREMA et d'IFREMER la Tremblade.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION.....	2
II. GENERALITES	4
1. Sporogenèse de <i>Marteilia refringens</i> chez <i>Ostrea edulis</i>	4
2. Taxonomie.....	7
2.1. Les espèces du genre <i>Marteilia</i>	7
2.2. Le phylum Paramyxea	8
3. Cycle parasitaire de <i>Marteilia refringens</i>	9
3.1. Cycle annuel	9
3.2. Hypothèse d'un cycle hétéroxène	10
III. MATERIEL ET METHODES	11
1. Site d'étude : choix des claires ostréicoles.....	11
2. Compartiment benthopélagique.....	13
2.1. Zooplancton.....	13
2.2. Méiofaune.....	13
2.3. Macrofaune.....	14
3. Paramètres physiques.....	14
4. Stratégie d'échantillonnage.....	14
2.1. Etude exploratoire de 1997.....	14
2.2. Etude systématique de 1998	14
5. Outils de détection du parasite.....	15
5.1. Amplification par la polymérisation en chaîne (PCR)	15
5.1.1. Extraction de l'ADN.....	15
5.1.2. Principe de la PCR.....	16
5.1.3. Témoins utilisés	18
5.1.4. Amorces utilisées.....	18
5.2. Southern blot.....	19
5.2.1. Principe.....	19
5.2.2. Méthodes	20
5.3. Hybridation <i>in situ</i> et histologie.....	21
5.3.1. Principe.....	21
5.3.2. Méthode.....	21
IV. RESULTATS	23
1. Inventaire faunistique	23
1.1. Zooplancton	23
1.2. Méiofaune.....	24
1.3. Macrofaune	24
2. Paramètres physiques.....	25
3. Détection de <i>Marteilia refringens</i> par PCR	25
3.1. Zooplancton	25
3.2. Méiofaune.....	26
3.3. Macrofaune.....	27
4. Etude d'un cas : l'anémone <i>Cereus pedunculatus</i>	28
4.1. Détections de <i>Marteilia refringens</i>	28
4.1.1. Détection chez les anémones des sédiments	29
4.1.2. Détection chez les anémones fixées sur les huîtres parasitées	29
4.1.3. Détection chez les anémones maintenues en aquarium.....	29
4.2. Validation de la détection de <i>Marteilia refringens</i> chez <i>Cereus pedunculatus</i>	29
4.2.1. Spécificité de la réaction PCR : Southern blot avec sonde MARS	29
4.2.2. Spécificité du fragment amplifié : séquençage du fragment amplifié	31
4.2.3. Localisation tissulaire de <i>Marteilia refringens</i> : hybridation <i>in situ</i> et histologie.....	31
V. DISCUSSION.....	33
Diversité de la faune des claires ostréicoles de l'île d'Oléron	33
Détection de <i>Marteilia refringens</i> et difficultés méthodologiques.....	34
Statut de l'espèce <i>Cereus pedunculatus</i>	36
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	38
BIBLIOGRAPHIE.....	39

I. INTRODUCTION

Au cours des trente dernières années, deux graves épizooties provoquées par des protozoaires parasites ont considérablement affecté la production française d'huîtres plates *Ostrea edulis* (Linné, 1758). Le premier de ces agents pathogènes, *Marteilia refringens* décrit par Grizel *et al.* (1974), est responsable de la maladie des Abers ou marteiliose apparue en 1967 dans un petit estuaire du nord de la Bretagne, l'aber Wrach (Alderman, 1979). Ce parasite affecte la glande digestive de l'huître plate et provoque des mortalités dramatiques au sein des élevages. Son extension sur le littoral français, favorisée par les transferts commerciaux de ces mollusques, se fit rapidement dans la plupart des centres ostréicoles, du nord de la Bretagne à Arcachon (Comps, 1970; Herrbach, 1971; Grizel et Tigé, 1977). En 1979, l'apparition de *Bonamia ostreae*, parasite des hémocytes d'*Ostrea edulis*, a accentué la chute de la production d'huîtres plates françaises qui, actuellement, ne représente plus que 1 500 tonnes environ contre 15 000 tonnes en 1960 (Héral *et al.*, 1989).

L'histoire de l'ostréiculture française reflète la fragilité de cette production vis-à-vis des agents pathogènes. L'implantation d'espèces allochtones telle que l'huître creuse du pacifique, *Crassostrea gigas*, est apparue comme la seule alternative pour maintenir une production ostréicole suffisante et ceci malgré les risques écologiques liés à de telles introductions. En effet, la lutte contre les maladies infectieuses des bivalves marins rencontre plusieurs difficultés liées, en premier lieu, aux particularités des cultures en milieu ouvert. L'utilisation de substances anti-infectieuses déversées dans l'eau n'est pas envisageable car elle nécessiterait la mise en œuvre de volumes très importants dont les risques pour l'environnement ne peuvent être négligés. D'autre part, il n'est pas possible de protéger ces animaux, en stimulant la production d'anticorps protecteurs, par la vaccination du fait de l'absence de lymphocytes (cellules synthétisant les anticorps). En conséquence, les seules solutions envisageables actuellement sont la sélection génétique d'animaux tolérants ou résistants à ces agents pathogènes et la gestion du risque de contamination.

De récentes études de génétique ont permis de sélectionner des huîtres plates *Ostrea edulis* tolérantes au parasite *Bonamia ostreae* (Baud *et al.*, 1997). Cependant, ce type de résultat n'a pu être obtenu pour *Marteilia refringens*, ce qui limite la lutte contre la marteiliose à la gestion du risque de contamination. Dans ce contexte, la connaissance du cycle parasitaire de *Marteilia refringens* est primordiale. Il faut cependant noter qu'en référence aux exemples de cycle parasitaire exposés par Combes (1995), la description complète d'un cycle parasitaire est une tâche complexe.

Les travaux réalisés à ce sujet, concernant *Marteilia refringens*, privilégient les hypothèses d'un ou de plusieurs hôtes, et / ou l'existence d'une phase libre du parasite plutôt qu'une transmission horizontale directe de la parasitose (Balouet, 1979; Balouet *et al.*, 1979; Grizel, 1985; Lester, 1986; Berthe *et al.*, 1998). Cependant, il ne s'agit pour l'instant que d'hypothèses.

Ce travail a pour but de confirmer l'existence d'un ou de plusieurs hôtes potentiels dans le cycle de *Marteilia refringens* par la recherche systématique du parasite dans la faune associée aux huîtres plates. L'approche nouvelle de ce travail réside en :

- L'utilisation d'un biotope sélectif vis-à-vis des biocénoses marines.

Dans la zone endémique de *Marteilia refringens*, il a été vérifié préalablement à cette étude que le cycle parasitaire restait fonctionnel pour des huîtres cultivées en claires ostréicoles. Ces bassins, traditionnellement utilisés pour l'élevage et l'affinage des huîtres, sont soumis à de larges variations thermiques et halines. Par conséquent, la richesse spécifique des claires est dix fois plus faible que sur estran comme indiqué en baie de Marennes-Oléron par de Montaudouin et Sauriau (1998).

- L'utilisation d'outils de biologie moléculaire pour détecter *Marteilia refringens*.

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

La recherche de *Marteilia refringens* est effectuée au sein de la faune des claires ostréicoles. La détection de l'ADN du parasite est réalisée grâce à la technique de polymérisation en chaîne (PCR), méthode très sensible et rapide qui permet l'amplification spécifique d'un fragment du génome recherché. Les techniques du Southern Blot et de séquençage de l'ADN ont ensuite permis de confirmer la spécificité du fragment amplifié. Il restait enfin à déterminer le statut de l'espèce ou des espèces concernées par une détection positive du parasite. Celui-ci peut en effet n'être que simplement ingéré ou bien être réellement localisé dans les structures tissulaires de l'hôte. Pour ce faire, dans une première approche, deux techniques complémentaires ont été utilisées, l'hybridation *in situ* et l'histologie.

Cette étude consiste en la recherche de *Marteilia refringens* chez des hôtes potentiels. Elle fait intervenir la systématique de la faune, leur écologie et l'utilisation d'outils appartenant aux domaines de la biologie moléculaire et de l'histologie.

II. GENERALITES

Marteilia refringens est un protozoaire parasite extracellulaire de l'huître plate *Ostrea edulis*. Ce parasite est principalement observé dans la glande digestive et plus rarement au niveau des branchies (Comps, 1970). Il interfère avec l'absorption de la nourriture et provoque une destruction des tissus des diverticules digestifs de l'hôte. Lorsque le parasite est arrivé à maturité, il est libéré dans la lumière du tractus digestif (Alderman, 1979).

1. Sporogenèse de *Marteilia refringens* chez *Ostrea edulis*

Chez l'huître plate, le parasite *Marteilia refringens* subit une évolution qui aboutit à la formation de spores (figure 1 d'après Lubat (1990) et figure 2) :

- Le stade initial est constitué par une cellule souche ou cellule primaire (Grizel *et al.*, 1974) dont le cytoplasme renferme des inclusions paracrystallines, des formations vacuolaires et des haplosporosomes (Perkins, 1976). Cette cellule est en contact étroit avec les membranes cellulaires de l'hôte par l'intermédiaire de microvillosités (Grizel *et al.*, 1974).

- Les cellules secondaires résultent d'une différenciation du cytoplasme autour des noyaux issus de la division endogène du noyau de la cellule primaire (figure 2a). Ces cellules se caractérisent par un noyau comportant un nucléole volumineux, ainsi que par des inclusions cytoplasmiques denses aux électrons. La cellule primaire contenant jusqu'à huit cellules secondaires est assimilée à un pseudoplasmode et peut atteindre 30 µm de diamètre. La cellule secondaire (de 10 à 15 µm de diamètre) devient le pansporoblaste et quatre cellules tertiaires sont formées par bourgeonnement endogène (Desportes et Ginsburger-Vogel, 1977) (figure 2b).

- Les cellules tertiaires donnent des spores contenant trois sporoplasmes issus de divisions endogènes. Le sporoplasme le plus externe assimilé à une cellule primaire, comporte également des haplosporosomes (Perkins, 1976). Les spores atteignent à maturité 4 µm de diamètre.

La paroi des cellules primaires (ou sporanges) se rompt libérant les pansporoblastes (Herrbach, 1971, Grizel, 1975) que l'on peut observer dans les fèces (figure 2c).

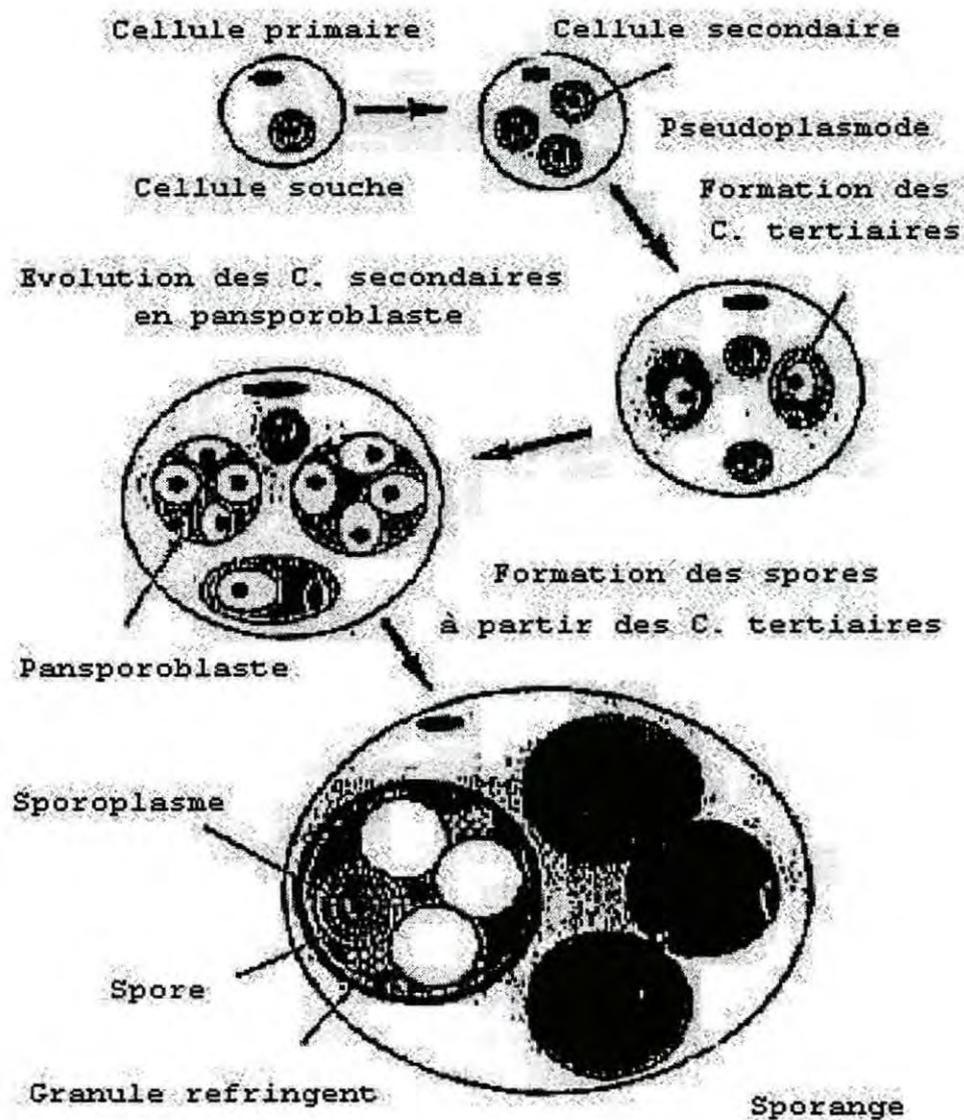


Figure 1 : Schéma du processus de sporogénèse de *Marteilia refringens* chez *Ostrea edulis* (Lubat, 1990)

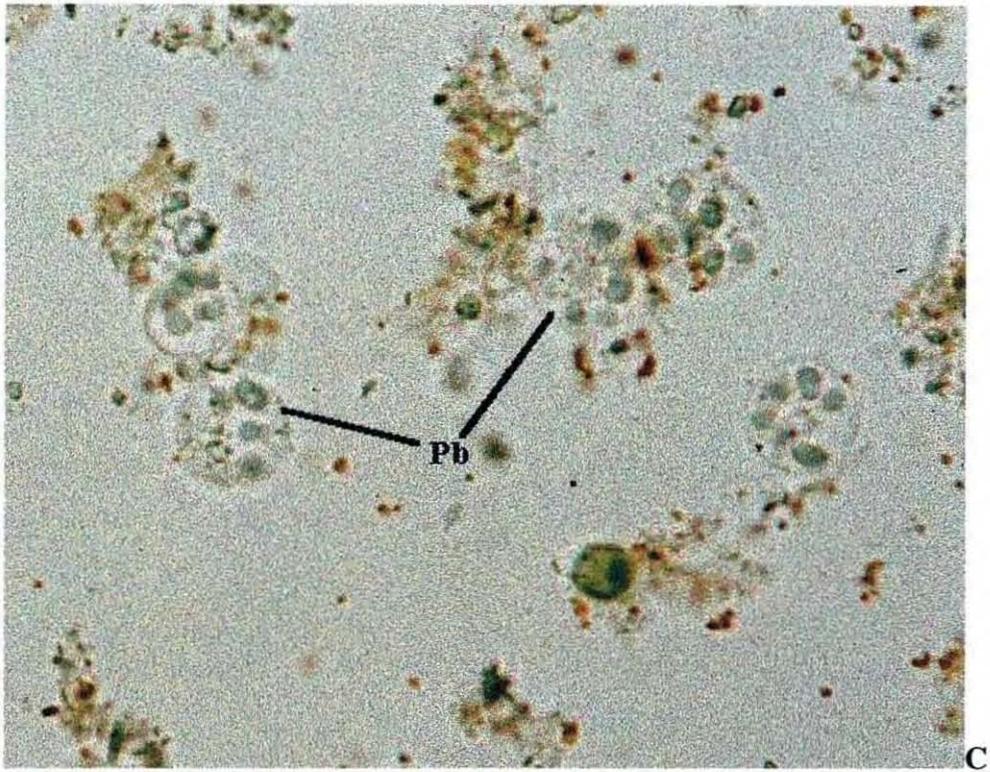
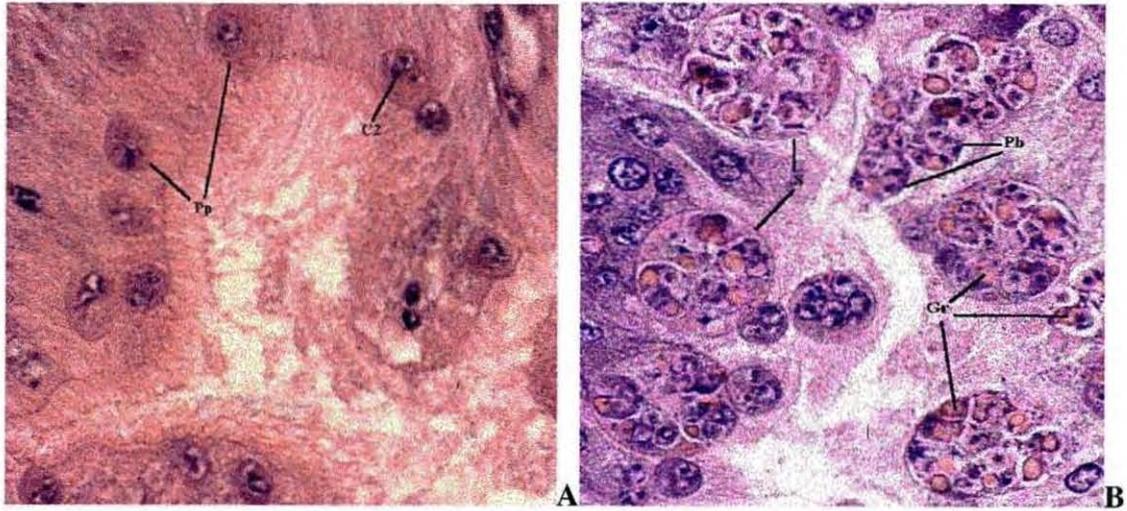


Figure 2 : Différents stades de développement de *Marteilia refringens* observés chez *Ostrea edulis*. (Coloration hémalum éosine, X 1000)

- a) Cellules primaires ou pseudoplasmodies (Pp) contenant une ou plusieurs cellules secondaires (C2) situées dans les canaux de la glande digestive
- b) Cellules de *Marteilia refringens* au stade sporange (S) contenant des granules réfringents (Gr) et pansporoblastes (Pb) dont certains sont libérés dans la lumière des diverticules de la glande digestive
- c) Observation des pansporoblastes (Pb) dans les fecès d'*Ostrea edulis* parasitées par *Marteilia refringens*

2. Taxonomie

La taxonomie des parasites du genre *Marteilia* a subit depuis leur découverte des modifications successives. Son rapprochement initial avec des phylums préexistants tels que les Haplosporidies et les Myxosporidies est resté insatisfaisant. Ceci a récemment valu la proposition de créer un nouveau phylum regroupant ce type de parasites, les Paramyxea (Desportes et Perkins, 1990).

Au sein du genre *Marteilia*, plusieurs espèces ont été décrites selon des critères ultrastructuraux et en fonction du, ou des, hôtes chez lesquels ces parasites ont été observés. Cependant, les critères ultrastructuraux s'avèrent parfois insuffisants pour distinguer deux espèces comme par exemple *Marteilia refringens* et *Marteilia maurini*. L'identification des différentes espèces de ce genre nécessite donc de prendre en compte d'autres critères d'identification. L'obtention de la séquence du gène codant pour la petite sous unité ribosomale de ces parasites pourrait constituer un moyen de préciser le degré de divergence de ces différentes espèces et pourrait permettre de préciser la position phylogénique des Paramyxea. Cet aspect fait partie des objectifs du programme européen de recherche MARS, *Marteilia Refringens Studies*.

2.1. Les espèces du genre *Marteilia*

- *Marteilia refringens* parasite l'huître plate *Ostrea edulis*. Cette espèce a aussi été observée chez d'autres bivalves marins mais jusqu'à présent seule *Ostrea edulis* a été affectée de façon dramatique par ce pathogène. Dans le cadre de la relance de la production d'huîtres plates, des essais d'implantation d'espèces allochtones ont été réalisés. Il a ainsi été montré qu'*Ostrea angasi* (Bougrier *et al.*, 1986) et *Ostrea chilensis* (Grizel *et al.*, 1983) étaient sensibles à ce parasite limitant l'implantation de ces mollusques sur nos côtes (Robert *et al.*, 1991). *Marteilia refringens* parasite les moules *Mytilus edulis* (Tigé et Rabouin, 1976) et *Mytilus galloprovincialis* mais sans engendrer des mortalités telles que celles observées chez *Ostrea edulis* (Figueras *et al.*, 1991 ; Villalba *et al.*, 1993; Fuentes *et al.*, 1995; Robledo et Figueras, 1995). En ce qui concerne l'huître creuse *Crassostrea gigas*, les pseudoplasmodies mis en évidence par Cahour (1979) n'évolueraient pas vers des sporanges (Balouet *et al.*, 1979) et l'espèce peut être considérée comme un cul de sac parasitaire.

- *Marteilia maurini* a été décrite chez *Mytilus galloprovincialis* (Comps *et al.*, 1982) et *Mytilus edulis* (Auffret et Poder, 1985). De par ses critères ultrastructuraux, elle est difficilement différenciable de *Marteilia refringens*.

- *Marteilia christenseni* a été décrite chez la scrobiculaire *Scrobicularia plana* par Comps (1985).

- *Marteilia lengehi* a été décrite chez des huîtres *Saccostrea cucullata* du Golfe Persique (Comps, 1976).

- *Marteilia* sp. a été observée en Europe, chez les palourdes *Tapes decussatus*, *Tapes rhomboïdes* et *Tapes pullastra* (Auffret et Poder, 1987; Villalba *et al.*, 1993), la coque *Cerastoderma edule* (Comps *et al.*, 1975), *Modiolus modiolus* (Auffret et Poder, 1985) et *Crassostrea virginica* (Renault *et al.*, 1995).

- *Marteilia sydneyi* (Perkins et Wolf, 1976) est une espèce parasite de *Saccostrea commercialis* sur la côte sud-est de l'Australie. Elle a des effets pathogènes dramatiques sur la production de cette huître de la même manière que *Marteilia refringens* chez *Ostrea edulis*.

2.2. Le phylum Paramyxea

Le genre *Marteilia* et en particulier l'espèce *Marteilia refringens* observée chez des animaux moribonds, fut tout d'abord classée parmi les champignons primitifs marins, et plus particulièrement dans l'ordre des Chytridiales (Herrbach, 1971).

De par la présence d'haplosporosomes dans la cellule primaire et dans le sporoplasme externe, Comps (1970) puis Perkins (1976) ont proposé de classer ce genre parmi les Haplosporidies. Sprague (1979) crée le phylum des Ascetospora regroupant des protozoaires parasites comme les Haplosporidies ainsi que les organismes nouvellement décrits appartenant aux genres *Marteilia* et *Paramarteilia*, parasite du crustacé *Orchestia gammarellus* (Ginsburger-Vogel *et al.*, 1976). Ce phylum était divisé en deux classes; les Stellatosporea et les Paramyxea. Les organismes appartenant à la classe des Stellatosporea étaient caractérisés par la présence d'haplosporosomes et de spores comprenant un ou plusieurs sporoplasmes. Les genres *Marteilia* et *Paramarteilia* étaient placés dans la famille des Martelliidae, ordre des Occlusporida. Un autre ordre, les Balanosporida comportait les haplosporidies typiques. La classe des Paramyxea comprenait une espèce *Paramyxa paradoxa* (Chatton, 1911) parasite des larves de l'annélide *Poecilochaetus serpens*.

Néanmoins, *Marteilia*, *Paramarteilia* et *Paramyxa*, de par leurs structures pluricellulaires et la formation de cellules emboîtées au cours de la sporogénèse (Desportes,

1981; Desportes et Lom, 1981) furent par la suite rassemblés dans la classe des Paramyxea. Cette classe fut divisée en deux ordres, l'ordre des Marteiliidae comportant les genres *Marteilia* et *Paramarteilia* et l'ordre des Paramyxida avec le genre *Paramyxa*. En conséquence, il semblait à ces auteurs plus judicieux de rapprocher ces genres du phylum des Myxosporidies plutôt que des Haplosporidies.

Actuellement, étant donné l'importance de ces parasites dans le milieu marin, la plus récente proposition est de rehausser la classe des Paramyxea au rang de phylum (Desportes et Perkins, 1990).

Phylum PARAMYXEA (Levine *in* Sprague, 1979)

Classe Marteiliidea (Desportes et Ginsburger-Vogel, 1977)

Marteilia (parasites de bivalves marins)

Paramarteilia (parasite de crustacés)

Marteilioides (parasités de bivalves marins)

Classe Paramyxidea (Chatton, 1911)

Paramyxa (parasite d'annélide polychaete)

3. Cycle parasitaire de *Marteilia refringens*

3.1. Cycle annuel

La marteiliose est une maladie saisonnière pour laquelle une nette augmentation des taux d'infestations sont observés pendant l'été. Ainsi, d'après les observations de Grizel (1985), dans le cas d'huîtres plates de Bretagne, le taux de parasitisme est au plus bas en mars et avril, c'est à dire après les deux mois généralement les plus froids de l'année. Il augmente à partir de mai lorsque les températures atteignent les 12 °C, atteint sa valeur maximale de juin à août pour diminuer jusqu'au mois de décembre. Concernant les stades cellulaires du parasite, les jeunes plasmodes sont présents toute l'année alors que les formes sporales disparaissent au cours de l'hiver. Les formes les plus jeunes correspondraient à une infestation chronique durant toute l'année alors que les stades cellulaires plus complexes dépendraient d'un cycle saisonnier et seraient responsable de la dispersion du parasite dans le milieu (Balouet, 1979; Grizel, 1985).

La contamination d'huîtres saines ne s'effectue qu'au cours des mois d'été lorsque le seuil thermique de 17 °C est atteint (Grizel, 1985). Balouet *et al.* (1979) ont aussi montré que

l'infestation se produit durant les mois de juillet et août (en rade de Brest) quelle que soit la durée d'immersion en zone contaminée. Après cette période, des huîtres saines placées en zone contaminée restent indemnes. Des variations saisonnières et géographiques peuvent induire des variations concernant la durée et la période de cette fenêtre d'infestation, cependant la température semble un facteur primordial dans la transmission de la parasitose.

Les facteurs environnementaux tels que la salinité et le renouvellement des eaux semblent être des paramètres nettement moins déterminant que la température pour *Marteilia refringens*. Il est à noter, cependant, que la parasitose a été rarement observée dans des eaux franchement océaniques (Grizel, 1985) et que le cycle semble perturbé dans l'étang de Thau (Comps, 1979). En ce qui concerne le renouvellement des eaux, jusqu'à présent, aucune relation claire n'a pu être mise en évidence mais il est cependant possible qu'un fort renouvellement implique une "dilution" du parasite dans le milieu, défavorisant ainsi la transmission de la parasitose (Grizel, 1985).

Malgré l'influence des facteurs environnementaux, et notamment de la température sur le cycle parasitaire de *Marteilia refringens*, ceux-ci ne permettent pas à eux seuls d'expliquer l'existence de zones fortement infectées ou au contraire protégées (Balouet *et al.*, 1979). L'intervention d'un autre facteur, tel que la présence d'un hôte ou d'hôtes dans le cycle du parasite, est considérée comme l'une des explications possibles.

3.2. Hypothèse d'un cycle hétéroxène

Suite aux essais de transmission de la marteiliose en milieu naturel ayant mis en évidence le cycle saisonnier de *Marteilia refringens* et la période d'infestation (Balouet, 1979; Balouet *et al.*, 1979; Grizel, 1985), des essais de transmission ont été réalisés en milieu expérimental. Diverses méthodes ont été utilisées : cohabitation d'huîtres plates, de moules (Berthe *et al.*, 1998), injections de suspensions de spores (Balouet *et al.*, 1979; Grizel, 1985; Berthe *et al.*, 1998), transplantation de glande digestive de *Saccostrea commercialis* infectées (Lester, 1986 ; Berthe *et al.*, 1998), utilisation de glande digestive en tant que nourriture pour des hôtes potentiels (Van Banning, 1979), mise en présence de mollusques sains avec du sédiment provenant d'un site infesté (Berthe *et al.*, 1998). Quel que soit le protocole expérimental mis en place, il n'a jamais permis d'infecter des animaux sains. Il en découle l'hypothèse relative à l'existence d'un ou de plusieurs hôtes dans le cycle du parasite (cycle hétéroxène).

L'intervention d'un hôte pourrait aussi expliquer l'absence de transmission de la parasitose en certains sites. Ainsi en 1979, des huîtres plates de Bretagne, infectées par *Marteilia refringens*, puis exportées en Hollande ne subirent aucune mortalité importante. De plus, aucune contamination des huîtres plates saines présentes en ce site ne fut relevée et ce malgré des températures, salinités et facteurs culturels similaires à ceux de Bretagne (Van Banning, 1979).

L'utilisation de l'histologie pour identifier *Marteilia refringens* chez des hôtes potentiels tels que des Annélides (*Spirorbis* sp., *Polydora* sp., *Pomatoceros triqueter*), le mollusque gastéropode *Crepidula fornicata*, des crustacés (*Galathea squamifera*, *Portunus puber*, *Carcinus maenas*) ainsi que des études ultrastructurales sur des échantillons de zooplancton n'ont pas permis de mettre en évidence d'éventuels hôtes (Balouet *et al.*, 1979).

L'hypothèse d'un cycle hétéroxène repose donc sur les résultats de nombreuses études expérimentales. Néanmoins, Grizel (1985) propose une autre explication à ces résultats suggérant que le parasite pourrait nécessiter une période de maturation dans le sédiment avant d'acquies sa forme infestante. Ceci reste une hypothèse et actuellement rien ne démontre la capacité des spores à survivre dans le sédiment pendant une période prolongée (Roubal *et al.*, 1989). D'autre part, il est possible que les conditions expérimentales ne reproduisent pas les stimuli nécessaires à la transmission du parasite (Berthe *et al.*, 1998). Enfin, ce type de résultats expérimentaux ne permet pas d'écarter la possibilité d'une phase libre de *Marteilia refringens* (Berthe *et al.*, 1998).

III. MATERIEL ET METHODES

1. Site d'étude : choix des claires ostréicoles

Dans le cadre de la recherche du parasite *Marteilia refringens* au sein de la faune marine d'une zone endémique, l'une des principales limites rencontrées provient du nombre trop important d'espèces à analyser. Ainsi, une telle étude exhaustive devient impossible à conduire sur estran. A l'opposé, les claires ostréicoles situées en zone endémique constituent un modèle simplifié où la biodiversité est dix fois plus faible que sur estran (de Montaudouin et Sauriau, 1998). Cette caractéristique rend cette étude réalisable.

Les claires ostréicoles, situées au sud-est de l'île d'Oléron (figure 3) dans les marais expérimentaux du CREA (Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole)

sont des bassins artificiels de faible profondeur (environ 1 m) traditionnellement utilisés à des fins ostréicoles pour l'affinage des huîtres.

Au cours de cette étude, deux claires (1 et 2) situées côte à côte et alimentées en eau par le même chenal (chenal d'Ors) ont été utilisées. Des travaux antérieurs concernant le parasite *Marteilia refringens* réalisés au sein de ces claires, ont en effet, permis de vérifier la transmission de la marteiliose ce qui permet de considérer ces claires comme un système unique. Le renouvellement de l'eau est contrôlé par un système d'écluses et n'est possible qu'à partir d'un coefficient d'environ 80. Les claires sont soumises en alternance à deux situations; lorsque les coefficients de marée sont supérieurs à 80 pendant environ une semaine, l'eau des claires est renouvelée pour partie à chaque marée haute. La semaine suivante, coefficients inférieurs à 80, les claires fonctionnent en système fermé, ce qui peut créer des conditions environnementales encore plus sélectives pour la faune littorale.

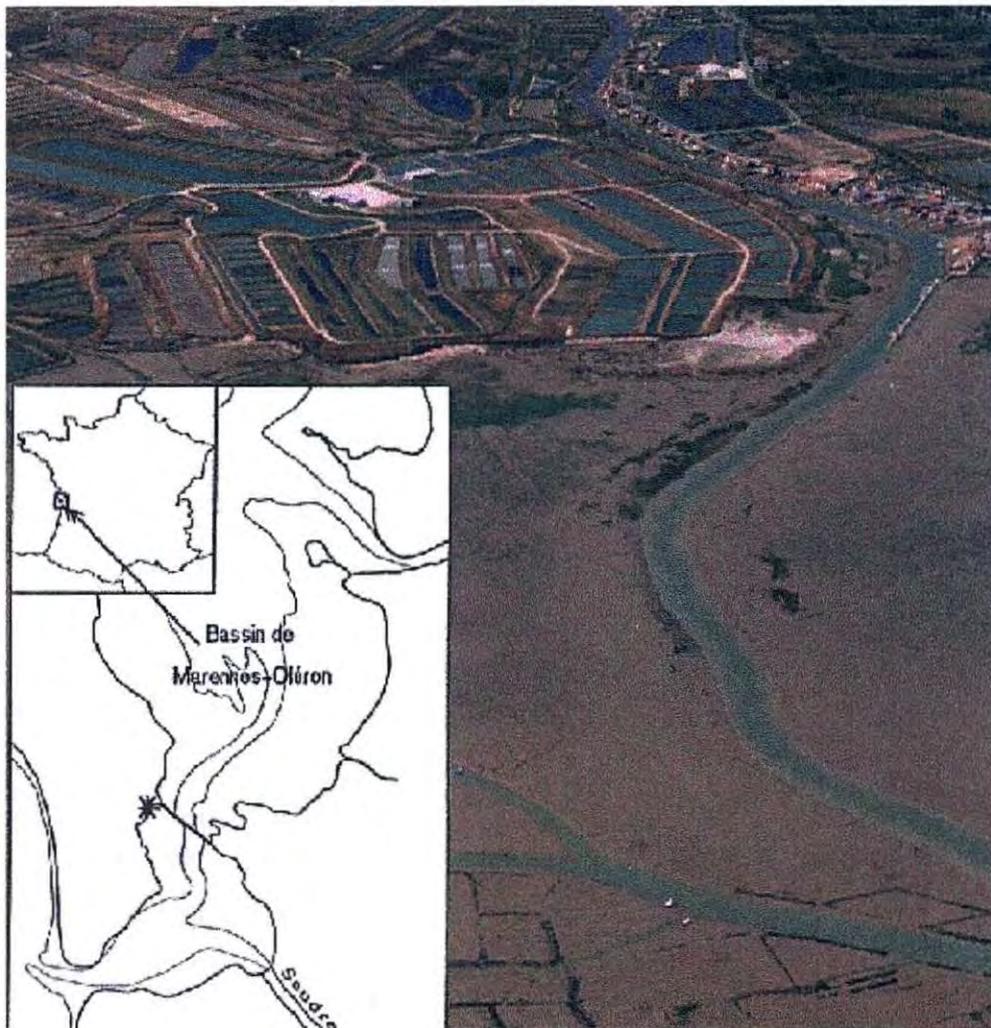


Figure 3 : Site d'échantillonnage en claires ostréicoles, marais du CREA Oléron (*). Photo société Sphair, Toulouse, juillet 1995.

- Claire 1 : site des prélèvements de zooplancton et de la méiofaune effectués à partir du 17 février 1998. Le cycle de développement de *Marteilia refringens* chez *Ostrea edulis* ainsi que la cinétique d'infestation d'huîtres saines ont fait l'objet d'une étude parallèle (Barnaud, résultats non publiés). Ainsi à la mi février 1998, trois populations d'huîtres plates *Ostrea edulis* réparties dans des poches ostréicoles ont été disposées :

- 1) Huîtres plates infectées par *Marteilia refringens* depuis deux ans (n-2),
- 2) Huîtres plates infectées par *Marteilia refringens* depuis un an (n-1),
- 3) Huîtres plates saines (n).

- Claire 2 : site d'échantillonnage exhaustif de la macrofaune effectué à partir du 24 février 1998. La transmission de la parasitose dans cette claire a été contrôlée sur 30 huîtres plates saines déposées en février 1998.

2. Compartiment benthopélagique

2.1. Zooplancton

Le filet à plancton utilisé d'une longueur d'environ 5 m est relié à un appareil créant un courant d'eau qui pénètre dans le filet. Le tissu filtrant possède un vide de maille de 100 μm permettant de retenir la majeure partie des planctontes (Sautour, 1991). Ce dispositif fonctionne pendant environ 4 heures afin de collecter un maximum d'individus. Le matériel filtré, concentré dans un collecteur est récupéré sur un tamis de 100 μm puis immédiatement stocké dans de l'alcool absolu à 99 %. Le tri est effectué au laboratoire, sous loupe binoculaire. Les planctontes sont groupés par espèce, par genre ou par famille selon la difficulté d'identification.

Un effort particulier a été fourni pour trier les espèces du zooplancton étant donné l'obtention d'un résultat préliminaire positif obtenu à partir de planctontes non triés prélevés en septembre 1997 (Collins, Berthe et Sauriau. données non publiées).

2.2. Méiofaune

Les prélèvements sont réalisés grâce à une benne Eckman permettant de prélever du sédiment immergé sur une profondeur d'environ 10 cm et une surface de 400 cm^2 . La méiofaune étant essentiellement réparti dans les deux premiers centimètres de sédiment, seule cette couche est prélevée jusqu'à obtention d'environ un litre de sédiment de façon à obtenir

une grande quantité d'individus. Le tri de la méiofaune vivante s'effectue, après un premier tamisage sur 100 μm , grâce à la technique de Riera (1995) et permet de séparer les nématodes du reste de la méiofaune.

2.3. Macrofaune

La faune vagile ou pélagique est collectée grâce à un filet de 5 mm de vide de maille filtrant l'eau de la claire 2 lors de sa vidange. Le reste de la macrofaune est prélevé soit par carottage soit à vu, puis tamisée sur maille carrée de 1 mm. Au laboratoire, les espèces sont séparées, le nombre d'individus par espèce comptabilisé puis immédiatement congelés à une température de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Paramètres physiques

La température de l'eau des claires a été mesurée en continu (avec un pas de 15 min) grâce à une sonde étanche de marque Onset. La sonde a été placée en milieu de la claire 1 à 20 cm de distance du sédiment. La salinité était mesurée une fois par semaine au moment des prélèvements de zooplancton et de la méiofaune.

4. Stratégie d'échantillonnage

2.1. Etude exploratoire de 1997

De mai à octobre 1997, c'est-à-dire pendant la période de transmission du parasite *Marteilia refringens*, la macrofaune des claires ostréicoles a été échantillonnée de façon mensuelle avec un effort particulier sur les crustacés et les annélides. Ce choix reposait sur le fait que certaines espèces de ces phylums peuvent être parasitées par des parasites appartenant au même phylum que *Marteilia refringens* (*Paramyxa paradoxa* et des *Paramarteilia orchestiae*). Quelques prélèvements de méiofaune et de zooplancton ont aussi été réalisés.

2.2. Etude systématique de 1998

De façon à mieux cerner la présence potentielle de *Marteilia refringens* dans les autres compartiments benthopélagiques des claires ostréicoles, l'étude de 1998 a pris en compte à la

fois la macrofaune (avec une recherche plus systématique des espèces présentes) mais aussi le zooplancton et la méiofaune.

Le pas d'échantillonnage est adapté au cycle de vie des espèces, il est a priori mensuel pour la macrofaune, hebdomadaire pour le zooplancton et la méiofaune.

La taille de chaque échantillon est fixée à 30 individus. C'est évidemment un compromis, entre la nécessité d'échantillonner un grand nombre d'individus en relation avec de faibles taux de prévalence de la maladie (un échantillon de 30 individus par espèces permet de mettre en évidence un individu infecté à un taux de prévalence de 10% dans une population d'au moins 1,000,000 d'individus) et la nécessité de limiter au minimum le temps passé et le coût des analyses. Cependant, l'échantillonnage ne permet pas toujours d'obtenir 30 individus par espèce. De même, le tri spécifique de chaque espèce peut s'avérer difficile. Ainsi, les individus ont parfois été groupés par genre voire par ordre taxonomique.

5. Outils de détection du parasite

Nous disposons au laboratoire IFREMER de la Tremblade de deux outils de détection de l'ADN de *Marteilia refringens* : le premier, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), technique extrêmement sensible qui nous permet d'effectuer rapidement une première recherche du parasite au sein d'un grand nombre d'échantillons et, le second, l'hybridation *in situ*, technique qui permet ensuite de distinguer un cas de parasitose d'un cas de simple ingestion du parasite chez les individus où *Marteilia refringens* a été détecté.

5.1. Amplification par la polymérisation en chaîne (PCR)

5.1.1. Extraction de l'ADN

a. Principe

L'ADN cellulaire total est extrait par la méthode utilisant la protéinase K (dégradation des protéines), le SDS (détergent qui lyse des membranes) et le phénol chloroforme/alcool isoamylique 24/1 (pour extraire l'ADN).

b. Protocole

- Lyse cellulaire

1 ml de solution d'extraction (100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 0.5 % SDS, 0.2 mg/ml Protéinase K) est ajouté à environ 100 mg de tissus (environ 30 individus pour le zooplancton ou de la méiofaune et un mélange de tissus broyés pour la macrofaune). Le mélange est incubé au moins 3 heures à 50 °C.

- Extraction de l'ADN

Le lysat est centrifugé pendant 5 mn à 10 000 g pour éliminer les gros débris. Après récupération du surnageant, un volume (V) de phénol et un volume de chloroforme/alcool isoamylique 24/1 sont ajoutés. Le mélange final est agité et soumis à une centrifugation pendant 10 mn à 10 000 g. La phase aqueuse contenant l'ADN est prélevée puis transférée dans un nouveau tube. L'ADN est précipité pendant au moins une demi-heure à - 20 °C après addition de 1/10 ème de volume d'acétate de Na 3 M, pH 5.4 et 2.5 V l'éthanol absolu. Les tubes sont centrifugés. Le culot d'ADN est alors rincé par de l'éthanol 70 % puis lyophilisé. L'ADN est dissout dans 50 µl de tampon TE (10 mM Tris pH 7.4 et 1 mM EDTA pH 8) puis stocké à 4 °C.

- Contrôle de l'ADN extrait

La qualité et la quantité d'ADN sont analysées par électrophorèse en gel d'Agarose. Pour cela 10 µl d'ADN sont mélangés à 2 µl de tampon de dépôt des ADN puis ce mélange est déposé dans un gel d'Agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium (agent intercalant de l'ADN) qui permet de visualiser l'ADN aux UV. La migration s'effectue dans du tampon TAE 1 X pendant 1 heure à 100 volts. La quantité des différents extraits d'ADN sont alors approximativement normalisés.

5.1.2. Principe de la PCR

La PCR est une technique de biologie moléculaire très sensible permettant l'amplification *in vitro* de fragments d'ADN. Son principe repose sur l'action de manière répétitive d'une ADN polymérase qui copie la séquence d'ADN à amplifier (figure 4). Il s'agit d'une réaction cyclique comprenant trois étapes :

- 1- Dénaturation du double brin d'ADN
- 2- Assemblage d'amorces qui sont des oligonucléotides de synthèse simples brins (environ 20 paires de bases). Ils sont complémentaires l'un et l'autre à chacun des brins et encadrent la séquence à amplifier

3- Elongation des amorces par la Taq polymérase qui provient de la bactérie *Thermus aquaticus* qui a la propriété d'être thermorésistante et donc de ne pas être dégradée au cours de la dénaturation de l'ADN.

a. Conditions expérimentales

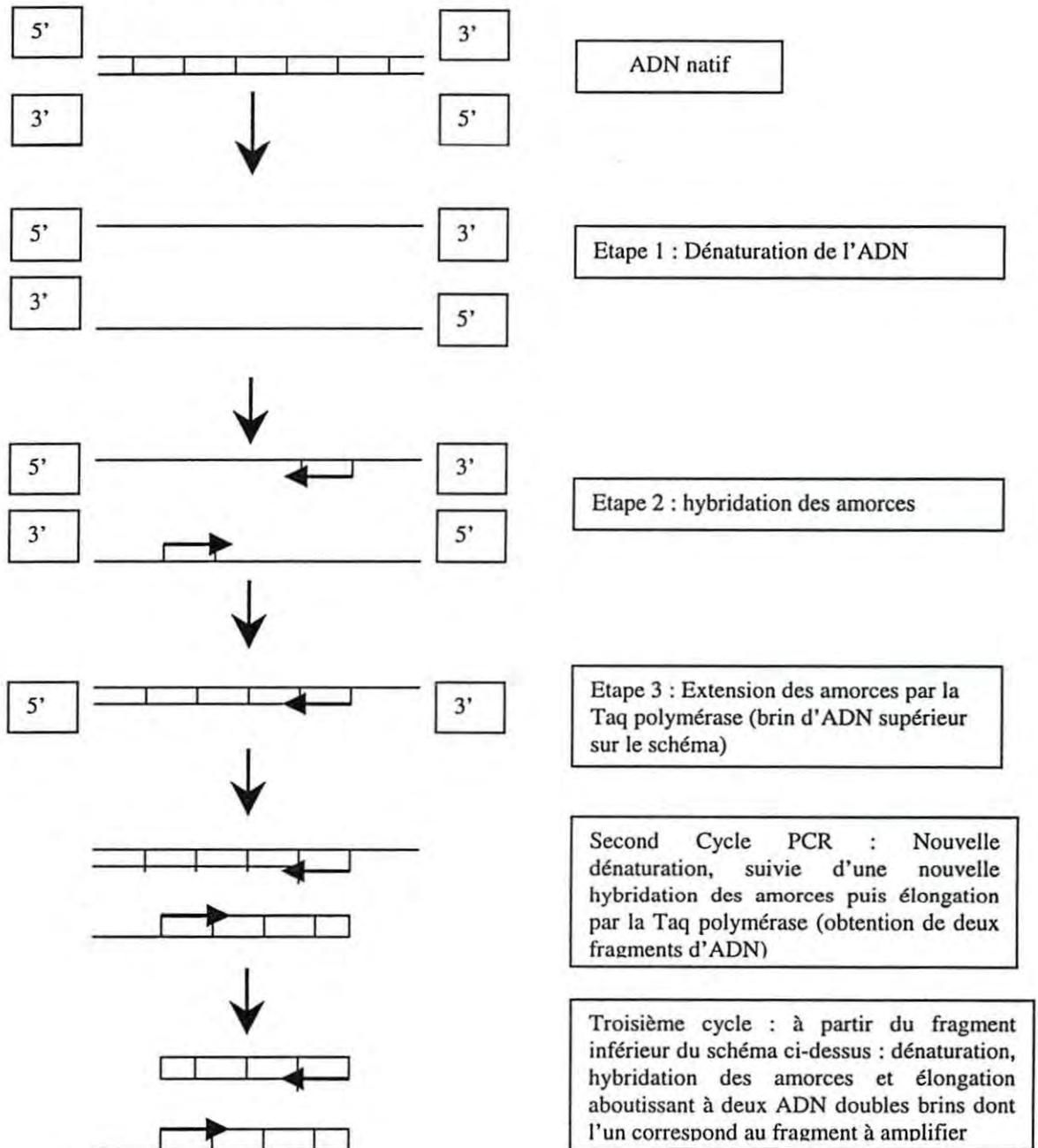


Figure 4 : Principe de la PCR

L'amplification est réalisée sur un volume de 50 µl contenant environ 100 ng d'ADN, du tampon Taq 1X, 2.5 mM de chlorure de magnésium, 0.2 mM de nucléotides libres (ATP, GTP, CTP, TTP), le couple d'amorce (5' et 3' à 1 µM) et 2 unités de Taq polymérase.

Après une dénaturation de 3 mn à 94 °C, le mélange est soumis à 30 cycles de 1 mn à 94 °C (dénaturation), 1 mn à 55 °C (assemblages des amorces) et 1 mn à 72 °C (élongation), puis la réaction se termine par une élongation de 10 mn à 72 °C.

10 µl du volume réactionnel sont mélangés à 2 µl de tampon de dépôt, puis sont déposés sur un gel d'agarose à 1 %, TAE 1X. Après la migration des produits d'amplification dans une solution de TAE 1X, ils sont révélés grâce au bromure d'éthidium sous UV.

5.1.3. Témoins utilisés

Témoins négatifs : le premier témoin négatif ne contient pas d'ADN, il est remplacé par de l'eau. Le second témoin négatif contient de l'ADN extrait de branchies d'huîtres plates *Ostrea edulis* non parasitées par *Marteilia refringens*.

Témoin positif : l'ADN utilisé provient de la glande digestive d'huîtres plates contaminées par *Marteilia refringens*.

5.1.4. Amorces utilisées

Le gène codant pour la petite sous-unité ribosomale de *Marteilia refringens* a été séquencé et comparé aux gènes 18S d'une cinquantaine d'espèces. Il a ainsi été mis en évidence des régions conservées ou universelles entre ces différentes espèces et le parasite et des régions extrêmement spécifiques de *Marteilia refringens*.

Les amorces disponibles pour les PCR ont été choisies soit dans les zones conservées (amorces consensus CS1, CS2 et CAS1) soit dans les zones très spécifiques du parasite (amorces spécifiques : SS2, SAS2, SAS1). Le premier type d'amorces doit théoriquement permettre l'amplification d'un fragment du génome quelle que soit l'espèce considérée. Il sert donc de contrôle interne de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Nous avons utilisé en particulier les amorces consensus CS1, CAS1 et les amorces spécifiques SS2, SAS2 lors de nos analyses PCR.

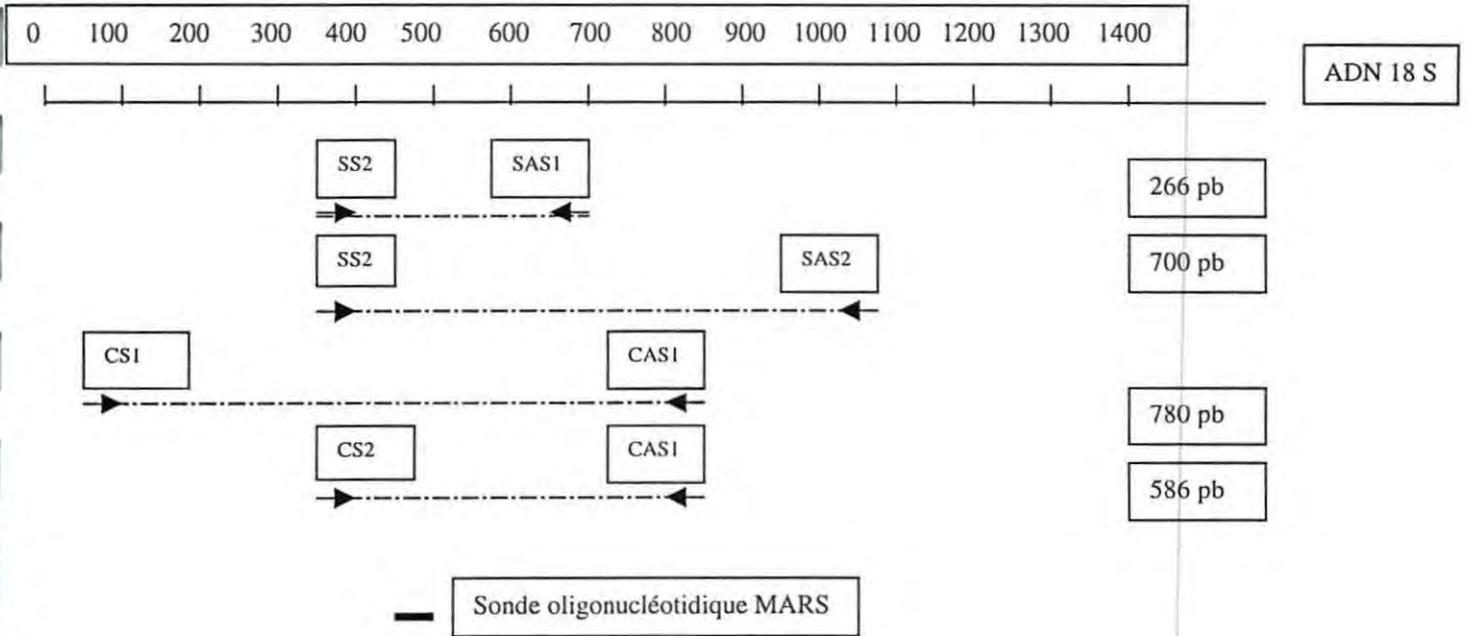


Figure 5 : Position des amorces et de la sonde MARS utilisée en Southern blot sur le fragment 18S de l'ADN de *Marteilia refringens*. SS : Spécifique Sens, SAS : Spécifique Anti-Sens, CS : Consensus Sens, CAS : Consensus Anti-Sens, pb paires de bases.

5.2. Southern blot

5.2.1. Principe

La PCR utilisée comme premier outil de détection de *Marteilia refringens* est une méthode très sensible basée sur la reconnaissance de séquences par un couple d'oligonucléotides. L'un des biais de cette méthode provient du fait que ces oligonucléotides peuvent plus ou moins s'hybrider en d'autres sites du génome. Il est alors possible d'amplifier un fragment de manière non spécifique. L'un des contrôles possibles est la taille du fragment amplifié. Cependant, ce critère peut ne pas être suffisant pour savoir si le produit d'amplification est réellement spécifique, il faut déterminer la spécificité de l'ADN situé entre les deux couples d'amorces. Parmi les méthodes qui permettent de valider la spécificité de ce fragment amplifié, il est possible d'effectuer une digestion du fragment par différentes enzymes (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) ou un Southern Blot, méthode qui a été utilisée dans cette étude.

Dans cette technique, les fragments d'ADN amplifiés au cours de la PCR sont transférés sur une membrane de nylon qui est alors incubée dans un mélange d'hybridation contenant une sonde oligonucléotidique (sonde nommée MARS, figure 5) marquée par radio-isotope. La séquence de cette sonde correspond à une partie interne du fragment amplifié au cours d'une PCR réalisée avec des amorces spécifiques. Il y aura hybridation si le fragment amplifié est effectivement spécifique de *Marteilia refringens*. La visualisation de cette hybridation se fera par autoradiographie.

5.2.2. Méthodes

- Migration analytique

Les produits PCR à tester sont déposés sur un gel d'agarose 1 %. La migration s'effectue jusqu'au 2/3 du gel.

- Transfert alcalin du gel

Le gel est incubé pendant 30 mn dans une solution de 0.4 N NaOH qui permet la dénaturation de l'ADN (séparation du double brin en simples brins). Le transfert sur la membrane de nylon s'effectue par capillarité pendant une nuit en tampon 0.4 N NaOH. L'ADN est fixé de manière irréversible sur la membrane par 2 heures d'exposition à 80 °C.

- Marquage de la sonde

Le marquage de la sonde oligonucléotidique MARS (30 pb complémentaires d'une région spécifique de *Marteilia refringens*) est réalisé grâce à la polynucléotide kinase dont le rôle est d'ajouter un dATP $\delta^{33}P$ en l'extrémité 5'. 10 pmol de sonde sont incubés une demi-heure à 37 °C avec le tampon de l'enzyme 1X (50 mM Tris pH 7.6, 10 mM chlorure de magnésium, 5 mM DDT, 0.5 mM Spermidine HCl, 0.1 mM EDTA), 10 unités de polynucléotides kinases et 5 μ l de dATP $\delta^{33}P$.

- Hybridation

La membrane de nylon est préhybridée au moins 1 heure à 60 °C dans un mélange SSC 5 X, Denhart 5 X, SDS 0.5 % et 100 μ g/ml d'ADN sperme de saumon soniqué et dénaturé. La sonde marquée est ensuite rajoutée au milieu de préhybridation et l'hybridation a lieu pendant une nuit à 60 °C. La membrane est successivement lavée par des bains de stringence croissante : avec du SSC 2X (2 lavages de 5 mn, température ambiante), puis du SSC 2X et SDS 0.1 % (2 lavages de 15 mn à 60 °C) et enfin avec du SSC 0.5X et SDS 0.1 % (1 lavage de 10 mn à 60 °C). La membrane est exposée en autoradiographie pendant une nuit.

5.3. Hybridation *in situ* et histologie

5.3.1. Principe

L'intérêt principal de l'hybridation *in situ* est de détecter ou localiser dans une cellule ou tissus la présence d'un fragment d'ADN déterminé. Après un premier tri des espèces positives en PCR, cette technique nous permet de distinguer une parasitose d'une ingestion. L'histologie permet ensuite de visualiser en microscopie photonique les structures cellulaires et tissulaires ayant été hybridées au cours de l'hybridation *in situ*.

5.3.2. Méthode

- Préparation de la sonde

La sonde qui permet de détecter *Marteilia refringens* en hybridation *in situ* est obtenue en incorporant des nucléotides modifiés Digoxigénine-dUTP lors de la PCR réalisée avec les amorces spécifiques SS2-SAS1. La sonde peut alors être détectée par une réaction immunologique faisant intervenir un anticorps anti-digoxigénine couplé à une phosphatase alcaline. Une réaction colorimétrique se produit lorsqu'on ajoute le substrat de cette enzyme ce qui permet de détecter la zone de l'hybridation.

- Préparation des lames

Les tissus sont fixés au Davidson ce qui permet de les conserver et de les maintenir dans un état aussi proche que possible de leur morphologie.

Ils sont ensuite déshydratés par des bains successifs d'éthanol 95 % puis d'éthanol absolu. L'alcool est éliminé par un bain de xylène qui facilite aussi l'imprégnation ultérieure des tissus par la paraffine liquide à 60 °C. Après refroidissement de la paraffine sur plaque réfrigérée, les coupes histologiques de 2 µm d'épaisseur sont réalisées sur des lames histologiques silanisées (dans le cas de l'hybridation *in situ* afin de renforcer l'interaction entre les tissus et la lame). L'ensemble est incubé à 60 °C pour faire adhérer les coupes sur la lame.

Dans un premier temps, un déparaffinage est effectué par deux bains de 5 mn dans du xylène puis deux bains de 5 mn en éthanol absolu. Les tissus sont ensuite séchés.

Pour chaque lame, 200 µl d'une solution de protéinase K à 100 µg/ml dans du tampon (50 mM Tris pH 7.4, 10 mM EDTA pH 8, 10 mM NaCl) sont déposés sur les tissus. Les lames sont alors incubées pendant une demi-heure à 37 °C. Les tissus sont déshydratés 1 mn dans de l'éthanol 95 % puis 1 mn dans de l'éthanol absolu et enfin séchés à l'air.

- Hybridation

500 µl de tampon d'hybridation (formamide 50 %, sulfate Dextran 10 %, SSC 4 X, 0.25 mg/ml t ARN de levures, Denhart 1 X) sont déposés sur chaque lame avant une

incubation d'au moins une heure à 42 °C. Le tampon d'hybridation est alors enlevé et une fenêtre d'incubation est installée sur la lame. 1 µl de sonde marquée à la digoxigénine est ajouté à 50 µl de milieu d'hybridation puis la fenêtre est fermée avec une lamelle.

Les ADN des tissus et de la sonde sont dénaturés par une exposition de 5 mn à 95 °C. L'ensemble est refroidit sur lit de glace pendant 5 mn avant d'être incubé pendant une nuit à 42 °C. Les tissus sont lavés par du SSC 2 X (2 bains de 5 mn à température ambiante), puis en SSC 0.4 X (1 mn à 42 °C).

- Détection

Le kit de détection de la digoxigénine (Boehringer) fait intervenir la méthode décrite suivante. Les lames sont équilibrées dans le tampon DIG 1 (0.1M acide malique, 0.15 M NaCl; pH 7.5), puis les tissus sont recouverts de tampon DIG 2 (1 % " blocking reagent " dans DIG 1). Cette étape de saturation est effectuée pendant 30 mn à température ambiante.

Après un rinçage dans le tampon DIG 1, 100 µl par lame de tampon DIG 2 dilué au 500 ème sont déposés sur la coupe. L'ensemble est incubé pendant une heure à température ambiante. Les lames sont lavées par deux bains successifs d'une minute dans le tampon DIG 1. L'équilibration des lames se fait par un bain de 5 mn dans le tampon DIG 3 (0.1M Tris pH 8, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl₂; pH 9.5).

50 µl par lame de la solution de révélation (20 µl de NBT/BCIP dans 20 ml de tampon DIG 3) sont déposés sur les tissus. La coloration apparaît après 10 à 24 heures d'incubation. La réaction est alors arrêtée par un lavage en tampon DIG 4 (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH8). Les coupes sont observées au microscope photonique.

- Examen histologique des tissus

Cette étape a pour objet d'identifier les structures cellulaires et tissulaires positives en *hybridation in situ*. Les coupes sont préparées de la même façon que pour l'hybridation *in situ* jusqu'à l'étape de déparaffinage. La coloration fait intervenir l'hémalum-éosine. L'hémalum permet de colorer les structures nucléaires ou basophiles en bleu à violet foncé, les ergastoplasmes sont bleus et les cytoplasmes prennent une teinte grise. La coloration des autres structures en rose est réalisée par un colorant acide, l'éosine. Cette technique ne permet qu'une différenciation limitée des structures. Toutefois, elle permet d'observer les tissus au microscope photonique et de noter les éventuelles anomalies dans les structures tissulaires et cellulaires.

IV. RESULTATS

1. Inventaire faunistique

1.1. Zooplancton

Les copépodes constituent le taxon majoritaire au sein des prélèvements de zooplancton. Parmi les Calanoïdes, les genres *Acartia*, *Eurythemora* et *Centropages* ont été triés (Tableau 1). Trois espèces d'Harpacticoïdes ont pu être triées, *Euterpina acutifrons*, *Canuella perplexa* et *Harpacticus littoralis*.

Tableau 1 : taxons échantillonnés dans la colonne d'eau en février, mars et avril 1998. Les nombres notés indiquent le nombre d'individus triés pour les analyses de détection. P : l'espèce est présente mais pas quantifiée.

Taxa	Genre	17.02.98	10.03.98	29.04.98	
Crustacé	Copépode calanoïde spp.	0	30	45	
Crustacé	Copépode calanoïde sp1	40	0	0	
Crustacé	Copépode calanoïde sp2	40	0	0	
Crustacé	Copépode calanoïde	<i>Acartia</i> sp.	40	30	55
Crustacé	Copépode calanoïde	<i>Eurythemora</i> sp.	40	21	0
Crustacé	Copépode calanoïde	<i>Centropages</i> sp.	0	6	0
Crustacé	Copépode cyclopoïde spp	70	70	P	
Crustacé	Copépode harpacticoïde spp	160	17	50	
Crustacé	Copépode harpacticoïde	<i>Canuella perplexa</i>	70	60	0
Crustacé	Copépode harpacticoïde	<i>Euterpina acutifrons</i>	50	6	30
Crustacé	Copépode harpacticoïde	<i>Harpacticus littoralis</i>	0	0	0
Annélide	Larve	19	34	P	
Crustacé	Larve Zoé	15	8	P	
Crustacé	Ostracodes	37	30	P	
	Chaetognathes	0	0	17	
mollusque	Larves	0	5	P	
Poisson	Larves	0	0	16	

Malgré le caractère essentiellement qualitatif de cette étude, il a pu être noté une évolution saisonnière des peuplements zooplanctoniques. D'une manière générale, les copépodes représentent le groupe dominant, mais, à partir de la fin mars, une augmentation quantitative importante de ce taxon ainsi que des espèces du méroplancton a pu être notée.

Parmi ces espèces temporairement présentes au sein du zooplancton, il a été observé la présence de larves de crustacés, d'annélides ainsi que de poissons.

1.2. Méiofaune

Les individus se répartissent au sein du groupe des Nématodes, des Copépodes Harpacticoïdes, des Ostracodes et des Foraminifères. Ils ont été analysés d'une manière globale, sans tri préalable.

1.3. Macrofaune

Une trentaine d'espèces a pu être répertoriée tant en 1997 qu'au cours de notre étude de 1998 (Tableau 2).

Tableau 2 : taxons échantillonnés dans les sédiments ou la colonne d'eau en 1997 et 1998. Les nombres indiquent le nombre d'individus trié pour les analyses de détection. P : présence.

				1997	1997	1997	1998	1998	1998	1998
Taxa	Genre	Espèce		05.05	02.06	23.07	24.02	31.03	29.04	28.05
Annelide	Polychaete	<i>Hediste (nereis) diversicolor</i>		60	P	30	37	30	30	15
Cnidaire	Actinaire	<i>Cereus pedunculatus</i>		21	8	P	50	22	?	60
Crustacé	Amphipode	<i>Gammarus insensibilis</i>		18	29	88	30	3	4	18
Crustacé	Amphipode	<i>Melita palmata</i>		0	0	0	0	0	0	26
Crustacé	Amphipode	<i>Microdeutopus gryllotalpa</i>		P	36	52	0	0	40	70
Crustacé	Amphipode	<i>Orchestia gammarella</i>		0	0	0	0	0	0	37
Crustacé	Décapode	<i>Crangon crangon</i>		0	0	0	0	30	1	0
Crustacé	Décapode	<i>Palaemonetes varians</i>		0	15	0	37	30	30	30
Crustacé	Décapode	<i>Palaemon serratus</i>		0	0	0	28	20	19	2
Crustacé	Décapode	<i>Carcinus maenas</i>		8	P	P	10	19	7	2
Crustacé	Décapode	<i>Pachygrapsus marmoratus</i>		0	0	0	0	0	2	1
Crustacé	Isopode	<i>Idotea chelipes</i>		1	1	0	0	1	0	5
Crustacé	Mysidacé	<i>Praunus flexuosus</i>		0	26	0	23	0	0	0
Poisson		<i>Anguilla anguilla</i>		0	0	0	0	4	0	0
Poisson		<i>Blennius sp</i>		0	0	0	0	0	5	0
Poisson		<i>Gobius minutus</i>		0	0	0	0	30	0	0
Poisson		<i>Pomatoschistus microps</i>		0	P	P	40	0	30	15
Insecte	Larve			0	0	0	4	0	0	0
Insecte		<i>Chironomus salinarius</i>		0	P	0	0	0	0	0
Mollusque	Bivalve	<i>Abra ovata subrostrata</i>		30	15	50	6	24	30	30
Mollusque	Bivalve	<i>Cerastoderma sp.</i>		0	0	2	0	0	0	0
Mollusque	Bivalve	<i>Chlamys varia</i>		0	0	0	0	0	2	0
Mollusque	Bivalve	<i>Crassostrea gigas</i>		0	0	0	0	P	0	0
Mollusque	Bivalve	<i>Mercenaria mercenaria</i>		0	0	0	0	10	0	0
Mollusque	Bivalve	<i>Venerupis decusatus</i>		0	0	0	0	0	0	1
Mollusque	Gastéropode	<i>Hydrobia ulvae</i>		P	P	P	80	35	20	20
Mollusque	Opisthobranche	<i>Haminaea idatis</i>		27	P	P	0	0	0	6
Mollusque	Opisthobranche	<i>Doris verrucosa</i>		0	1	0	0	0	0	1
Nemerte				0	0	0	0	5	9	3
Nemerte		<i>Lineus viridis</i>		P	0	4	0	0	0	0
Procordes	Ascidie	<i>Molgula sp.</i>	spp	0	0	?	3	1	6	48

2. Paramètres physiques

Sur la période d'étude du 17 février au 25 mai 1998, les salinités ont varié de 28 à 33 ppm. Le cycle thermique se caractérise par 4 phases ascendantes successives entrecoupées de phases descendantes (figure 6). Par régression linéaire simple entre le temps et les températures moyennes horaires, quatre tendances positives significatives de 0,21, 0,39, 1,28 et 1,17°C/jour sont mises en évidence.

Le seuil thermique des 17°C est franchi une première fois pendant quelques jours du 20 au 25 avril puis de façon continue (de jour comme de nuit) à partir du 7 mai 1998. La chute des températures est nette à partir du 15 mai. Cependant, elles restent au-dessus des 17°C.

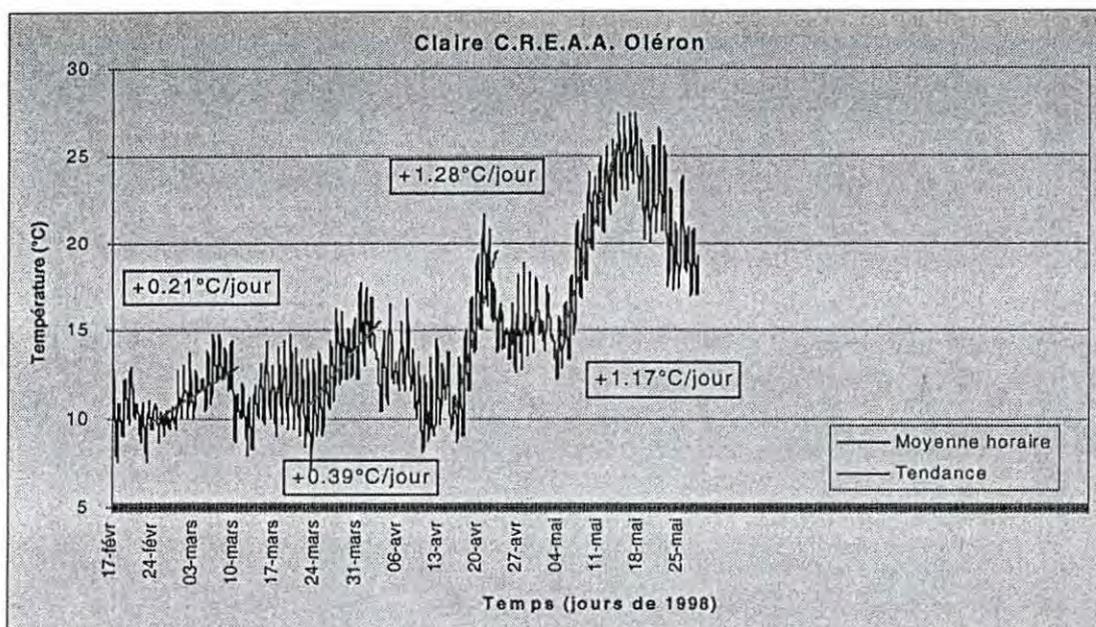


Figure 6 : Cycle thermique des eaux de la claire 1 du 17 février au 25 mai 1998.

3. Détection de *Marteilia refringens* par PCR

3.1. Zooplancton

La recherche de *Marteilia refringens* a été effectuée soit à partir des planctontes non triés (Tableau 3) soit après tri par groupes ou espèces (Tableau 4). Lorsque aucun tri n'est réalisé, les PCR consensus sont négatives ainsi que les PCR spécifiques (Tableau 3). Au contraire après le tri des planctontes (Tableau 4), tous les résultats des PCR consensus sont positifs mais restent négatifs en PCR spécifiques.

L'obtention d'un résultat positif en PCR consensus permet d'attester de la fiabilité des résultats obtenus en PCR spécifique. Le fait d'obtenir des résultats négatifs en PCR spécifique indique l'absence de *Marteilia refringens* au sein des espèces analysées.

Tableau 3 : résultats des analyses de détection de *Marteilia refringens* au sein du zooplancton global.

	Date	PCR consensus	PCR spécifique
Zooplancton	22.02.98	-	-
Zooplancton	03.03.98	-	-
Zooplancton	17.03.98	-	-
Zooplancton	24.03.98	-	-
Zooplancton	31.03.98	-	-
Zooplancton	07.04.98	-	-
Zooplancton	22.04.98	-	-

Tableau 4 : résultats des analyses de détection de *Marteilia refringens* au sein du zooplancton trié par taxon. PCR consensus (PCR cons.), PCR spécifique (PCR spéc.), nombre d'individus analysés (N).

Taxa	Genre Espèce	17.02.98			10.03.98			29.04.98		
		N	PCR Cons.	PCR spéc.	N	PCR cons.	PCR spéc.	N	PCR cons.	PCR spéc.
Crustacé	Copépode calanoïde spp	0			0			45	+	-
Crustacé	Copépode calanoïde sp1	40	+	-	0	+	-	0		
Crustacé	Copépode calanoïde sp2	40	+	-	0	+	-	0		
Crustacé	Copépode calanoïde									
	<i>Acartia</i> sp.	40	+	-	30	+	-	55	+	-
Crustacé	Copépode calanoïde									
	<i>Eurythemora</i> sp	40	+	-	21	+	-	0		
Crustacé	Copépode cyclopoïde spp	70	+	-	70	+	-			
Crustacé	Copépode harpacticoïde	160	+	-	0	+	-	50	+	-
Crustacé	Copépode harpacticoïde									
	<i>Canuella perplexa</i>	70	+	-	60	+	-	0		
Crustacé	Copépode harpacticoïde									
	<i>Euterpina acutifrons</i>	50	+	-	6	+	-	30	+	-
Annélide	Larve	19	+	-	0	+	-	0		
Crustacé	Larve Zoé	15	+	-	8	+	-	0		
Crustacé	Ostracodes	37	+	-	30	+	-	0		

3.2. Méiofaune

Pour chacun des deux prélèvements analysés, les résultats sont positifs en PCR consensus et négatifs en PCR spécifique. Aucune détection de *Marteilia refringens* n'a donc été faite sur ces prélèvements.

Tableau 5 : résultats des analyses de détection de *Marteilia refringens* au sein de la méiofaune.

	Date de prélèvement	Résultat PCR consensus	Résultat PCR spécifique
Méiofaune	7.04.98	+	-
Méiofaune	14.04.98	+	-

3.3. Macrofaune

Nous avons à notre disposition un matériel biologique datant de 1997 pour refaire les analyses avec nos nouveaux outils, soit à partir des ADN déjà extraits au cours d'une précédente étude, soit à partir des espèces non analysées et conservées à -20°C . Nous avons choisit d'analyser en priorité les échantillons de 1997 pas encore traités (Tableau 6). En effet, les échantillons des mois de février, mars et avril 1998 correspondent à une période où le parasite n'est pas encore libéré ou commence juste à être libéré dans le milieu par les huîtres plates.

Cinq espèces prélevées en 1997 ont été analysées en 1998; les cnidaires actinaires *Cereus pedunculatus*, les crustacés décapodes *Palaemonetes varians* et *Carcinus maenas*, le mollusque bivalve *Abra segmentum* (*A. ovata*), le mollusque opisthobranche *Haminaea idatis*.

Tableau 6 : résultats des analyses de détection de *Marteilia refringens* au sein de la macrofaune échantillonnée au cours des mois de mai et juin 1997 analysés par PCR consensus (PCR cons.) et PCR spécifique (PCR spéc).

Taxa	Genre	Espèce	N	PCR Cons	PCR Spéf
Cnidaire	Actinaire	<i>Cereus pedunculatus</i>	37	21+	2+
Crustacé	Décapode	<i>Carcinus maenas</i>	8	-	-
Crustacé	Décapode	<i>Palaemonetes varians</i>	30	-	-
Mollusque	Bivalve	<i>Abra segmentum</i>	30	2+	-
Mollusque	Opisthobranche	<i>Haminaea idatis</i>	17	-	-

- Cas du Cnidaire *Cereus pedunculatus*

Parmi les 18 anémones *Cereus pedunculatus* du 05.05.97, seuls 13 individus présentent des résultats positifs en PCR consensus. L'analyse par PCR spécifique permet de mettre en évidence 2 résultats positifs.

Des 19 anémones du 02.06.97, seules 8 ont présenté des résultats positifs en PCR consensus. En revanche, aucun résultat n'est positif en PCR spécifique.

- Cas des crustacés *Carcinus maenas* et *Palaemonetes varians*

Sur 8 extraits d'ADN du crabe *Carcinus maenas*, aucun n'a permis d'obtenir des résultats positifs en PCR consensus. De la même façon, pour le crustacé décapode *Palaemonetes varians*, aucune amplification n'a pu être obtenue au cours de la PCR réalisée avec les amorces consensus sur 30 individus.

- Cas des mollusques *Abra segmentum* et *Haminaea idatis*

Pour le mollusque bivalve *Abra segmentum*, seuls deux ADN ont pu être amplifié sur 30 individus analysés au cours de la PCR réalisée avec des amorces consensus. Toutes les PCR spécifiques sont négatives. En ce qui concerne *Haminaea idatis*, tous les résultats de la PCR consensus sont négatifs sur 17 individus analysés. Toutes les PCR spécifiques sont négatives.

4. Etude d'un cas : l'anémone *Cereus pedunculatus*

Après l'obtention de premiers résultats positifs en PCR spécifique, il s'agissait d'établir une stratégie pour confirmer et valider ces résultats.

4.1. Détections de *Marteilia refringens*

Dans le but de confirmer les résultats obtenus à partir des échantillons de *Cereus pedunculatus* de mai 1997, la recherche du parasite a été focalisée sur cette espèce au cours de l'étude de 1998. Les anémones de 1998 provenaient des claires ostréicoles en distinguant :

- 1- Celles prélevées dans le sédiment à proximité des huîtres (une dizaine de mètre de distance),
- 2- Celles prélevées directement sur les huîtres plates parasitées,
- 3- Celles prélevées directement sur les huîtres parasitées mais maintenues expérimentalement en aquarium au laboratoire à une température de 20°C. Ces aquariums contenaient des huîtres plates parasitées depuis le 03.04.98. L'observation de leurs fèces a permis de confirmer la libération du parasite dans les aquariums. Ainsi les anémones *Cereus pedunculatus* présentes se situaient dans un milieu confiné à fortes probabilités de transmission du parasite *Marteilia refringens*. Ces anémones ont été analysées le 24.04.98.

4.1.1. Détection chez les anémones des sédiments

Des 90 anémones prélevées mensuellement de février à avril 1998 (30 par mois), nous avons obtenus 79 résultats positifs en PCR consensus. Sur ces 79 analyses, aucune n'a donné un résultat positif en PCR spécifique. Pour ces anémones, dans cette période, le parasite *Marteilia refringens* n'a pas été détecté.

4.1.2. Détection chez les anémones fixées sur les huîtres parasitées

Des 30 anémones prélevées le 7 mai 1998 sur des huîtres parasitées, 30 ont donné un résultat positif en PCR consensus et toutes ont donné un résultat négatif en PCR réalisée avec des amorces spécifiques.

Par contre, le même type de prélèvement effectué le 20 mai 1998 sur 30 anémones a mis en évidence 28 résultats positifs en PCR consensus et 22 résultats positifs en PCR spécifique.

4.1.3. Détection chez les anémones maintenues en aquarium

Sur 10 anémones analysées, toutes donnent un résultat positif en PCR consensus et 8 ont été positives après la PCR réalisée avec les amorces spécifiques (SS2-SAS2).

Face à ces résultats positifs, il s'agit de confirmer si les analyses PCR ont effectivement permis de détecter des fragments du génome de *Marteilia refringens*, puis de localiser le parasite dans les structures cellulaires des anémones.

4.2. Validation de la détection de *Marteilia refringens* chez *Cereus pedunculatus*

4.2.1. Spécificité de la réaction PCR : Southern blot avec sonde MARS

Cette technique a été réalisée à partir de fragments amplifiés au cours de deux PCR spécifiques ainsi qu'à partir des fragments amplifiés au cours de deux PCR (figure 7). Chacun de ces types de PCR a été effectué sur des extraits d'ADN provenant d'une des anémones positives de mai 1997 et d'une anémone positive de l'aquarium, ainsi que sur des contrôles négatifs (eau et extrait d'ADN de branchies d'huîtres saines) et le contrôle positif (extrait d'ADN de glande digestive parasitée).

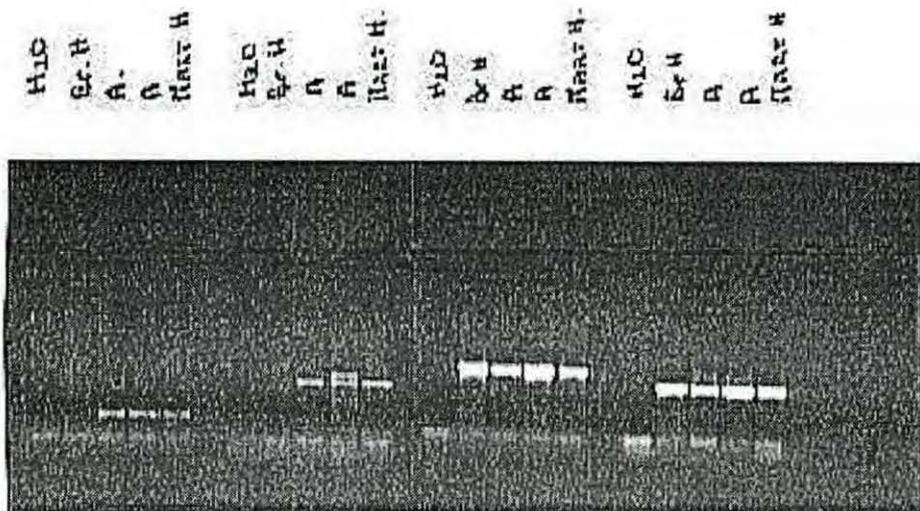


Figure 7 : Résultats des PCR réalisées avec 4 couples d'amorces, deux spécifiques (SS2-SAS2 et SS2-SAS1) et deux consensus (CS1-CAS1 et CS2-CAS2). Pour chacune des 4 PCR apparaissent dans l'ordre : contrôle négatif (H₂O), ADN extrait de branchies d'*Ostrea edulis* non contaminée (BrH), ADN extraits d'une anémone *Cereus pedunculatus* de mai 1997 (A), ADN extrait d'une anémone positive prélevée en aquarium (A) et ADN extrait de glande digestive d'*Ostrea edulis* contaminée (MARTH).

Les résultats du Southern blot (figure 8) montrent que la sonde MARS a pu s'hybrider sur les fragments amplifiés au cours des deux PCR spécifiques provenant des deux anémones analysées (A97 et A98) et du contrôle positif Mr (ADN extrait de glande digestive d'huître plate parasitée). La sonde MARS ne s'hybride pas sur les contrôles négatifs Br (ADN extrait de branchie d'huître plate non parasitée) et Eau (absence d'ADN). Elle s'hybride de façon variable avec les fragments résultants de la PCR consensus réalisées à partir d'ADN de *Marteilia* et d'animaux parasités (partie droite de la figure 8).

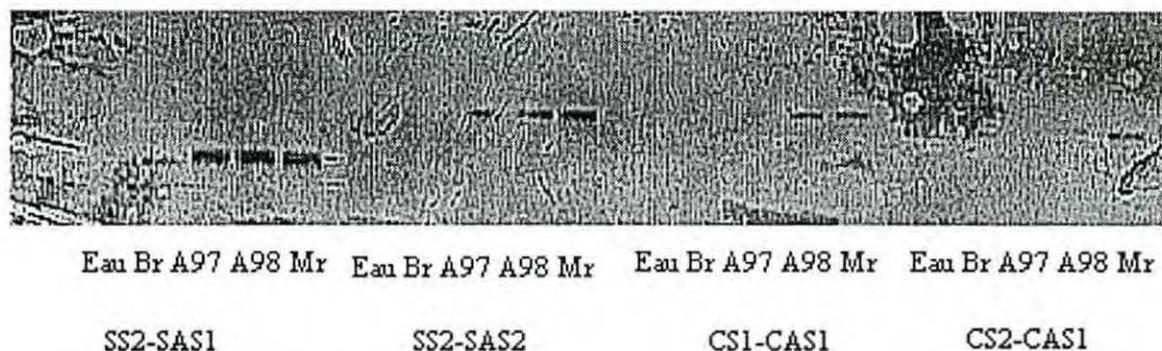


Figure 8 : Résultats du Southern blot

4.2.2. Spécificité du fragment amplifié : séquençage du fragment amplifié

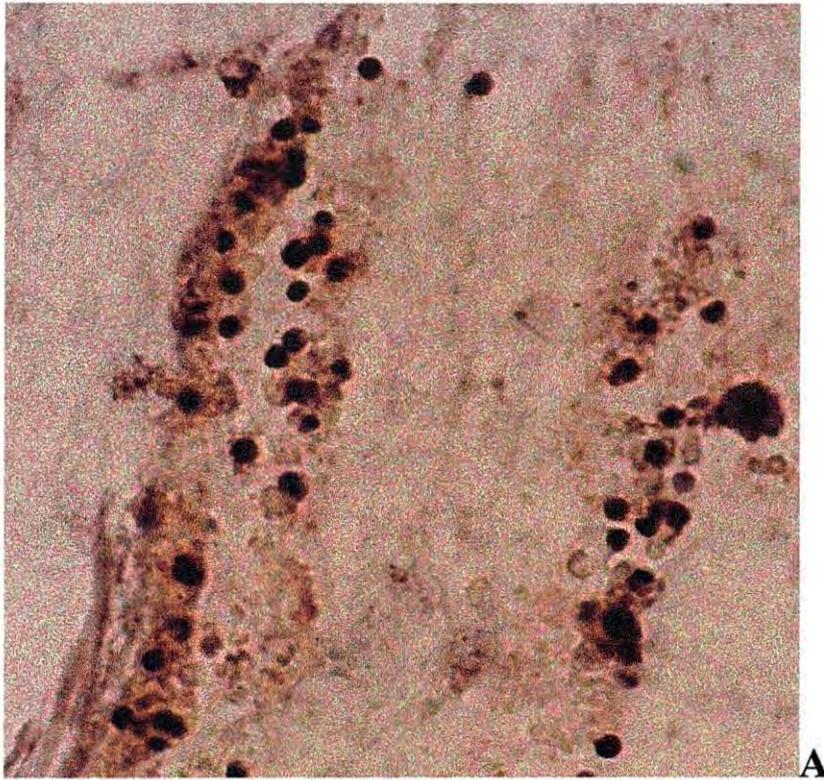
Les séquences d'ADN des fragments amplifiés chez l'anémone positive de mai 1997 et chez l'anémone positive de l'aquarium sont semblables à la séquence de *Marteilia refringens* (figure 9). Ces séquences ont été réalisées par F. Le Roux (résultats non publiés).



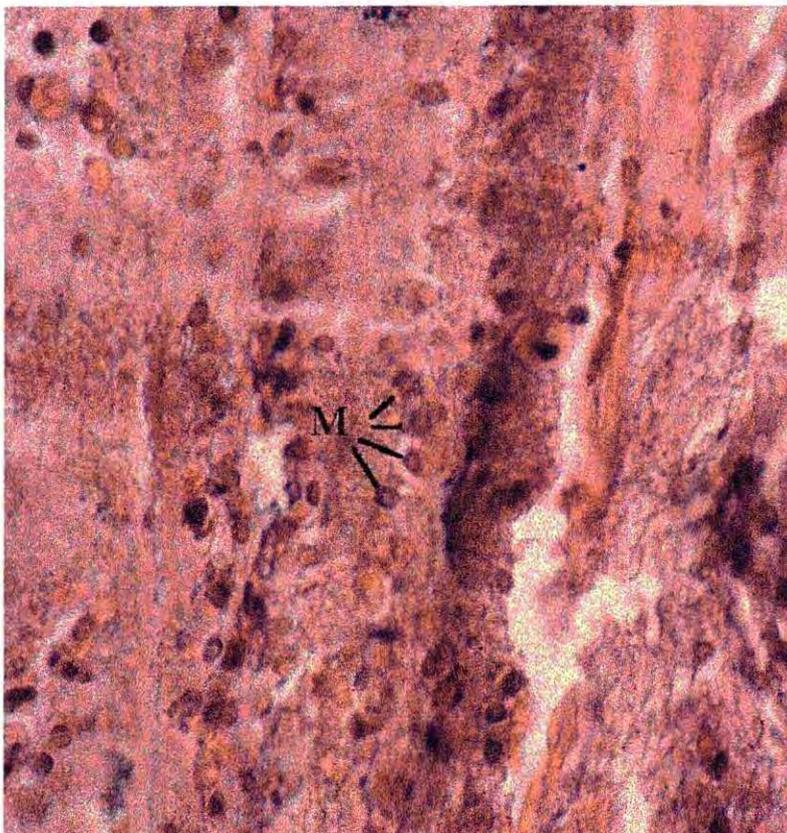
Figure 9 : Séquençage du fragment amplifié par la PCR spécifique SS2-SAS1 chez *Cereus pedunculatus* (individu de mai et individu de l'aquarium) ainsi que le contrôle, séquence de *Marteilia refringens*

4.2.3. Localisation tissulaire de *Marteilia refringens* : hybridation *in situ* et histologie

La figure 10 montre les résultats obtenus après hybridation *in situ* (A) et histologie (B). L'hybridation *in situ* met en évidence un accrochage de la sonde marquée à la digoxigénine différent du bruit de fond, ce qui signifie qu'il ne s'agit pas d'une réaction croisée (la sonde s'hybride sur des noyaux n'appartenant pas à *Cereus pedunculatus*). L'histologie permet de visualiser des petites cellules à cytoplasme très basophile et pouvant évoquer des cellules de *Marteilia refringens*.



A



B

Figure 10 : Hybridation *in situ* (A) et histologie (B) des tissus de *Cereus pedunculatus* (coloration hémalum éosine, X 1000). A : Noyaux marqués par la sonde *Marteilia refringens*. B : Observation en histologie de petites cellules (M) comportant un cytoplasme très basophile

V. DISCUSSION

Diversité de la faune des claires ostréicoles de l'île d'Oléron

Les claires ostréicoles d'Oléron présentent l'avantage de ne comporter qu'un nombre réduit d'espèces par rapport à la zone intertidale charentaise. Ainsi, seulement trente-deux espèces de la macrofaune déjà répertoriées par Reymond (1991) dans les marais Oléronais, ont pu être échantillonnées. D'après cet auteur, les taxa dominants sont l'actinie *Cereus pedunculatus*, l'annélide *Hediste (Nereis) diversicolor*, les mollusques *Abra segmentum* (*A. ovata*), *Haminaea idatis* et les crustacés *Microdeutopus grillotalpa* et *Gammarus insensibilis*, ce fait a été vérifié au cours de cette étude malgré son caractère qualitatif.

La faible diversité faunistique des claires ostréicoles est une caractéristique déjà notée par de Montaudouin et Sauriau (1998). Elle est aussi vérifiée pour les espèces du zooplancton et de la méiofaune. Les claires d'Oléron constituent des milieux comparables aux lagunes aménagées de Certes (bassin d'Arcachon) où le nombre d'espèces du zooplancton est cinq fois plus faible que dans le Golfe de Gascogne (Castel et Courties, 1982). Selon la typologie établie par Sautour (1991) en baie de Marennes-Oléron, un gradient décroissant de richesse spécifique s'établit des zones océaniques vers les zones néritiques puis internes à la baie. Les claires ostréicoles de par leurs caractéristiques hydrobiologiques (euryhalinité et eurythermie), hébergent des peuplements zooplanctoniques encore moins diversifiés que ceux des eaux internes de la baie. De plus, stockant des volumes restreints d'eau de mer dont le renouvellement est limité, elles présentent l'avantage de n'être pas composées de plusieurs peuplements liés à différentes masses d'eau, comme c'est le cas pour l'ensemble du bassin de Marennes-Oléron (Sautour et Castel, 1993). En ce qui concerne la méiofaune, une comparaison du peuplement des claires avec ceux des vases intertidales de Charente, où plus de quarante espèces de copépodes benthiques ont été répertoriées (Bodin, 1970, 1971, 1972), met en évidence un peuplement appauvri (Castel, 1984). Ainsi, le confinement des claires ostréicoles limite la diversité spécifique des compartiments benthopélagiques. Ce sont aussi des biotopes d'une grande facilité d'accès pour l'échantillonnage. Cette double caractéristique, alliée au fait que le cycle de *Marteilia refringens* y soit fonctionnel, justifie pleinement le choix de cet écosystème dans le cadre de la recherche d'hôtes de *Marteilia refringens*. Le fait que le cycle du parasite soit fonctionnel en claire ostréicole permet aussi de faire deux hypothèses relatives aux hôtes potentiels du cycle du parasite :

- Soit, la totalité des espèces impliquées dans le cycle de *Marteilia refringens* peut être prélevée dans le biotope "claire".
- Soit, seule une partie des hôtes potentiels est présente dans ce biotope.

Sous chacune de ces deux hypothèses, les connaissances acquises sur l'écologie et la répartition géographique des espèces pour lesquelles la détection de *Marteilia refringens* est validée, permettront de mieux comprendre comment le cycle du parasite peut se réaliser, ou au contraire, être bloqué dans d'autres écosystèmes.

Bien entendu, ces deux hypothèses n'excluent pas l'hypothèse d'une phase libre qui jusqu'à présent n'a pas été expérimentalement contredite (Berthe *et al.*, 1998).

Détection de *Marteilia refringens* et difficultés méthodologiques

Pour certaines espèces de la macrofaune, aucune amplification n'a pu être obtenue lors de l'analyse par la PCR. Un tel résultat négatif témoigne du mauvais fonctionnement de la réaction enzymatique. En effet, dans le cas d'une PCR consensus, les amorces utilisées sont communes à tous les êtres vivants. L'hybridation de ces amorces sur le génome est donc théoriquement possible quelle que soit l'espèce considérée. Si nous prenons en compte les particularités des espèces de la macrofaune pour lesquelles les PCR consensus étaient négatives, il est possible de différencier deux types d'espèces :

- un premier groupe est constitué de crustacés comportant une carapace, tels que les crabes *Carcinus maenas* et les crevettes *Palaemonetes varians*,
- un second groupe est caractérisé par la présence d'une coquille et comprend le bivalve *Abra segmentum* (*Abra ovata*) et le mollusque opisthobranche *Haminaea idatis*.

Carapace et coquille pourraient contenir des composés capables d'inhiber la Taq polymérase (Vaneechoutte et Van Eldere, 1997). Ainsi, une espèce de la macrofaune ne comportant ni carapace ni coquille, telle que *Cereus pedunculatus* permet d'obtenir sans difficultés l'amplification d'un fragment de son génome à l'aide d'amorce consensus.

L'obtention de résultats positifs en PCR consensus est primordiale dans cette étude. Elle constitue un contrôle qui permet d'attester du bon fonctionnement de l'analyse. Une PCR spécifique négative obtenue alors que la PCR consensus est négative, ne permet pas de se prononcer sur l'absence du parasite *Marteilia refringens* au sein de l'espèce considérée. Il n'est alors pas possible de savoir s'il s'agit d'un vrai négatif.

Le fait que la carapace et la coquille puissent provoquer un mauvais fonctionnement de la PCR nous a ultérieurement poussé à débarrasser les crustacés de leur carapace et les mollusques de leur coquille avant leur congélation.

Un mauvais fonctionnement de la PCR a aussi pu être mis en évidence lorsque des planctontes non triés étaient analysés. Dans ce cas, de la même façon que les espèces de la macrofaune à carapace ou à coquille, aucune amplification n'a pu être obtenue en PCR consensus. Ces résultats pourraient être à rapprocher des résultats obtenus avec les organismes de la macrofaune comportant une carapace. En effet, ces prélèvements comportent des espèces à carapace (mysidacés, copépodes) et à coquille (larves de mollusques, ostracodes) pouvant contenir un composé inhibiteur de la réaction enzymatique.

Néanmoins, après tri des planctontes en plusieurs groupes d'en moyenne cinquante individus, les PCR consensus ont été positives pour chacun des groupes y compris le groupe des copépodes. Il semble donc que dans le cas du zooplancton non trié, la présence de composés inhibant la réaction de polymérisation en chaîne ne puisse pas à elle seule expliquer les résultats négatifs obtenus avec les amorces universelles. Il est connu qu'une concentration trop importante en ADN peut induire l'inhibition de l'amplification, ce qui semble être l'explication la plus probable dans ce cas (Altwegg, 1995). En effet, nous avons pu remarquer qu'une dilution des extraits d'ADN des espèces du zooplancton permettait d'obtenir des résultats positifs en PCR consensus. Les résultats obtenus en PCR spécifique sont par conséquent considérés comme des vrais négatifs. Ainsi, les résultats des analyses du zooplancton des mois de février, mars et avril 1998 n'ont pas permis de renouveler le résultat positif obtenu en septembre 1997. Le suivi de ces populations pélagiques reste donc essentiel pour confirmer ou infirmer les résultats 1997.

En définitive, dans les cas des anémones *Cereus pedunculatus*, de la méiofaune et des groupes zooplanctoniques triés, la méthodologie utilisée a permis d'obtenir des résultats positifs en PCR consensus. Par conséquent, cela permet de s'assurer de la fiabilité des résultats obtenus en PCR spécifique.

Statut de l'espèce *Cereus pedunculatus*

La mise en évidence de *Marteilia refringens* au sein des tissus de cette espèce, grâce à la technique d'hybridation *in situ* constitue un résultat nouveau. La mise en évidence du parasite par l'histologie peut s'avérer très difficile voire impossible. De plus, ceci nécessite que les anémones analysées aient été prélevées pendant leur infestation. En effet, d'après nos résultats les anémones sont saines de février à avril et ne sont parasitées qu'à partir du mois de mai. Ainsi, malgré l'existence de nombreux travaux d'histologie réalisés sur *Cereus pedunculatus* (voir la revue de Doumenc et Van Praët, 1987) ou sur les parasites des Cnidaires (Lauckner, 1980) des cellules parasitaires apparentées au genre *Marteilia* n'ont jamais été décrites à ce jour chez les Cnidaires.

Jusqu'à présent, à l'exception de mollusques bivalves, *Marteilia refringens* n'avait pu être observé chez d'autres espèces animales (Balouet *et al.*, 1979; Grizel, 1985). L'enchaînement des étapes de détection puis de validation ont permis *in fine* d'observer le parasite au sein des tissus de l'hôte. Les cellules observées sont de petite taille et comportent un cytoplasme très basophile rappelant les cellules de *Marteilia refringens*. Seul ce type de cellule a pour l'instant pu être observé, il s'agit d'un résultat préliminaire qui devra être complété par d'autres observations.

Cereus pedunculatus (famille des Sagartidae) est une espèce commune des côtes européennes où elle est répandue en Manche, Méditerranée ainsi que sur le littoral Atlantique, de l'Ecosse à l'Afrique. Elle est observée sur tout type de substrat, roches ou vases du littoral et des marais maritimes (Reymond, 1991) de l'étage médiolittoral à l'isobathe -25 m (Manuel, 1981). Cette espèce est vivipare et se reproduit par développement de cellules sexuelles diploïdes sans méiose ni fécondation. Elle possède des dinoflagellés endosymbiotiques (Doumenc et Van Praet, 1987), *Symbiodinium* à l'intérieur des cellules endodermiques (Davy *et al.*, 1997).

Les résultats obtenus au cours de cette étude permettent de considérer *Cereus pedunculatus* comme un hôte potentiel de *Marteilia refringens*. Cette espèce est de plus observée dans des biotopes similaires à ceux d'*Ostrea edulis*. Cependant, sa large répartition géographique ne pourrait sans doute pas expliquer le « blocage » du cycle en certains sites (eaux littorales d'Europe du nord par exemple). Néanmoins, des travaux complémentaires restent à effectuer pour savoir si *Cereus pedunculatus* est un hôte fonctionnel.

Le résultat obtenu après séquençage d'une portion du gène codant pour la petite sous unité ribosomale amplifiée chez *Cereus pedunculatus* nécessite d'être confirmé par le séquençage total de ce gène. En effet, il est possible que le parasite mis en évidence au sein de cette espèce possède un gène 18S semblable à *Marteilia refringens* sur une petite portion de cette séquence mais différent en d'autres régions. En fonction du degré de divergence observé nous pourrions avoir à considérer que le parasite mis en évidence chez *Cereus pedunculatus* est une espèce différente de *Marteilia refringens*. Ainsi, des genres voisins de *Marteilia*, *Paramarteilia* (Desportes et Ginsburger-Vogel, 1977) et *Paramyxa* (Chatton, 1911) ont pu être observées chez des crustacés et des larves d'annélides. De ce fait, nous ne pouvons, pour le moment, exclure la possibilité d'être en présence d'une espèce différente de *Marteilia refringens* au sein de *Cereus pedunculatus*.

Des travaux complémentaires devront aussi être réalisés afin d'apporter des éléments de réponses relatifs au statut de *Cereus pedunculatus* vis à vis de *Marteilia refringens*. Trois cas peuvent en effet se présenter:

* Les formes cellulaires de *Marteilia refringens* peuvent ne pas évoluer chez *Cereus pedunculatus*. Cette espèce peut alors s'avérer être une impasse pour le parasite tel que cela se conçoit chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Comps, 1970) chez qui seules des formes jeunes du parasite ont été mises en évidence.

* *Cereus pedunculatus* peut intervenir au même titre qu'*Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* et d'autres bivalves. *Cereus pedunculatus* représenterait alors un hôte alternatif ne permettant pas la formation de stades cellulaires différents de ceux observés chez *Ostrea edulis*.

* Enfin, *Cereus pedunculatus* pourrait être un hôte fonctionnel pour *Marteilia refringens*. Dans ce cas, *Cereus pedunculatus* devrait comporter un stade ou des formes cellulaires différentes de celles déjà observées.

Pour répondre à ces questions, *Cereus pedunculatus* doit être suivi régulièrement et fréquemment du point de vue de la présence du parasite. Si une éventuelle évolution des formes cellulaires du parasite peut ainsi être mise en évidence, cela permettra de préciser si *Cereus pedunculatus* est une impasse pour *Marteilia refringens* ou bien si elle est un hôte alternatif ou fonctionnel. Si cette dernière hypothèse s'avère être vérifiée, des essais de transmission expérimentale de la parasitose compléteront les travaux précédents et permettront d'établir le sens de circulation entre *Ostrea edulis* et *Cereus pedunculatus*. D'après, nos résultats les anémones peuvent être infectées au cours du mois de mai c'est à dire lorsque *Marteilia refringens* est déjà libéré dans le milieu (Balouet *et al.*, 1979 ; Grizel, 1985).

Il semble donc probable que la transmission se produise de l'huître plate vers l'anémone, mais ceci n'exclue pas la possibilité d'intervention d'autres hôtes comme le laissent supposer les résultats de la pré-étude de 1997. En effet, *Cereus pedunculatus* peut se mouvoir d'un substrat à un autre (Reymond, 1991) mais ce type de déplacement reste occasionnel et de faible importance. Cette espèce présente donc plutôt les caractéristiques d'un organisme fixé. Or, la plupart des parasites nécessitent d'être dispersés dans le milieu environnant afin d'assurer leur survie. Un cycle parasitaire faisant intervenir des hôtes fixes tels que *Ostrea edulis* et *Cereus pedunculatus*, nécessiterait l'intervention d'un hôte mobile ou d'une phase libre, synonymes de mobilité (Combes, 1995).

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'approche développée dans cette étude a prouvé son intérêt. La recherche systématique du parasite au sein de la faune est réalisable dans la mesure où la faune des claires ostréicoles situées en zone endémique est peu diversifiée. D'autre part, l'utilisation d'outils moléculaires de détection du parasite constitue le second apport de cette approche. La complémentarité des techniques de biologie moléculaire et d'histologie a pu être démontrée lors de l'étude d'un hôte potentiel, le Cnidaire *Cereus pedunculatus*.

La mise en évidence de *Marteilia refringens* au sein de *Cereus pedunculatus* constitue un résultat nouveau. En effet, depuis les premières mortalités d'huîtres, le parasite *Marteilia refringens* n'avait été observé que chez les mollusques bivalves. *Cereus pedunculatus*, espèce de caractéristiques biologiques différentes des bivalves, constitue donc un hôte potentiel de *Marteilia refringens*.

La démarche associant un biotope simplifié et des outils de détection performants est donc parfaitement adaptée à la mise en évidence d'hôtes potentiels de *Marteilia refringens*. Le résultat obtenu à partir de l'espèce *Cereus pedunculatus* en constitue la démonstration. Cette approche constitue un apport majeur au sujet.

Toutefois l'utilisation de cette approche doit tenir compte des limites de techniques utilisées, notamment dans l'étape de PCR qui constitue une étape critique dans notre démarche.

Les résultats préliminaires obtenus pour *Cereus pedunculatus* nécessitent des travaux complémentaires, tout d'abord pour caractériser l'ensemble du gène amplifié puis pour mettre en évidence une éventuelle cinétique de l'évolution des formes cellulaires du parasite dans les tissus de *Cereus pedunculatus*.

BIBLIOGRAPHIE

- Alderman D. J. 1979. Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. Mar. Fish. Rev., 41 : 67-69.
- Altwegg M. 1995. General problems associated with diagnostic application methods. J. Microbial methods, 23 : 21-30.
- Auffret M. et M. Poder. 1985. Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les côtes de Bretagne nord. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 47 : 105-109.
- Auffret M. et M. Poder. 1987. Pathology of the main bivalve mollusc species from oyster rearing areas in Brittany (France). Aquaculture, 67 : 255-257.
- Balouet G. 1979. *Marteilia refringens* - Considerations of the life cycle and development of Aber disease in *Ostrea edulis*. Mar. Fish. Rev., 41 : 64-66.
- Balouet G., C. Chastel, A. Cahour, A. Quillard et M. Poder. 1979. Etude épidémiologique et pathologique de la maladie de l'huître plate en Bretagne. Bull. Inst. Pêches marit., 289 : 13-23.
- Baud J.P., A. Gérard Y., Naciri-Graven. 1997. Comparative growth and mortality of *Bonamia* resistant and wild flat oysters *Ostrea edulis* in an intensive system. First of experiment. Marine Biology, 130 (1) : 71-79.
- Berthe F., M. Pernas, M. Zerabib, P. Haffner, A. Thébault et A. J. Figueras. 1998. Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special considerations for its life cycle. Diseases of Aquatic Organisms (sous presse).
- Bodin Ph. 1970. Copépodes Harpacticoides marins des environs de la Rochelle. 1- Espèces de la vase intertidale de Chatellaillon. Tethys, 2 (2) : 385-436.
- Bodin Ph. 1971. Copépodes Harpacticoides marins des environs de la Rochelle. 3- Espèces de la zone intertidale de Fouras-Nord. Tethys, 3 (4) : 841-864.
- Bodin Ph. 1972. Copépodes Harpacticoides marins des environs de la Rochelle. IV- Espèces de la zone intertidale des Nauteries. Tethys, 4 (3) : 651-682.
- Bougrier S., G. Tigé, E. Bachere et H. Grizel. 1986. *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. Aquaculture, 58 : 151-154.
- Cahour A. 1979. *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. Mar. Fish. Rev., 41 : 19-20.

- Castel J. 1984. Structure et dynamique des peuplements de copépodes dans les écosystèmes eutrophes littoraux (côte atlantique). Thèse Doctorat d'Etat ès Sciences, Université Bordeaux 1 : 336 pp.
- Castel J. et C. Courties 1982. Composition and differential distribution of zooplankton in Arcachon Bay. *J. Plank. Res.*, 4 (3) : 417-433.
- Chatton E. 1911. Sur une Cnidosporidie sans cnidoblaste (*Paramyxa paradoxa* n. g., n. sp.). *Comptes rendus Académie des Sciences, Paris*, 152 : 631-633.
- Combes C. 1995. Interactions durables : écologie et évolution du parasitisme. Masson (Ed.), Paris : 524 pp.
- Comps M. 1970. Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le bassin de Marennes. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 34 : 317-326.
- Comps M. 1976. *Marteilia lengehi* n. sp., parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 40 : 347-349.
- Comps M. 1979. Etude du cycle de *Marteilia refringens* dans l'étang de Thau. *Cons. Int. Explor. Mer F* : 1-5.
- Comps M. 1985. Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp. n. parasite du lavignon *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pélécyopode). *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* 47 : 99-104.
- Comps M., H. Grizel, G. Tigé et J. L. Duthoit. 1975. Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule*. *C. R. Acad. Sc. Paris Série D.*, 281 : 179-181.
- Comps M., Y. Pichot et P. Papagianni. 1982. Recherche sur *Marteilia maurini* n. sp. parasite de la moule *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 45 : 211-214.
- Davy S.K., I.A.N. Lucas et J.R. Turner. 1997. Uptake and persistence of homologous and heterologous Zooxanthellae in the temperate sea anemone *Cereus pedunculatus* (Pennant). *Biol Bull.*, 192 : 208-216.
- de Montaudouin X. et P.G. Sauriau. 1998. Contribution to a synopsis of marine species diversity in the « Pertuis charentais Sea » : soft-bottom macrofauna of the Marennes-Oléron bay. *Cah. Biol. mar.* (sous presse).
- Desportes I. 1981. Etude ultrastructurale de la sporulation de *Paramyxa paradoxa* Chatton (Paramyxida) parasite de l'annélide polychète *Poecilochaetus serpens*. *Protistologica*, XVII : 365-386.

- Desportes I. et J. Lom. 1981. Affinités de *Paramyxa paradoxa* Chatton 1911, parasite de *Poecilochaetus serpens* (Annélide Polychète) avec les Marteiliidae Sprague, parasite d'huîtres et de crustacé *Orchestia gammarellus*. C. R. Acad. Sc. Paris Série III, 292 : 627-632.
- Desportes I. et T. Ginsburger-Vogel. 1977. Affinités du genre *Marteilia*, parasite d'huîtres (maladie des Abers) et du crustacé *Orchestia gammarellus* (Pallas), avec les Myxosporidies, Actinomyxidies et Paramyxidies. C. R. Acad. Sc. Paris Série D., 285 : 1111-1114.
- Desportes I., et F. O. Perkins. 1990. Phylum Paramyxea. Dans Handbook of Proctocista (Eds. Margulis, L., J. O. Corliss, M. Melkonian, D. J. Chapman) Jones and Bartlett Publishing Corporation, Boston : 30-35.
- Doumenc D.A. et M. Van Praët. 1987. Ordre des actiniaires, ordre des Ptychodactiniaires, ordre des Corallimorphaires. In : P.P. Grassé «Traité de zoologie, anatomie, systématique, biologie ». Tome III : Cnidaires, Anthozoaires, Masson (ed.), Paris : 257-401.
- Figueras A. J., C. F. Jardon et J. R. Caldas. 1991. Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) : preliminary results. Aquaculture, 99 : 17-33.
- Fuentes J., A. Villalba, C. Zapata et G. Alvarez. 1995. Effects of stock and culture environment on infections by *Marteilia refringens* and *Mytilicola intestinalis* in the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured in Galicia (NW Spain). Dis. Aquat. Org., 21 : 221-226.
- Ginsburger-Vogel, T., I. Desportes et C. Zerbib. 1976. Présence chez l'amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas) d'un protiste parasite; ses affinités avec *Marteilia refringens* agent de l'épizootie de l'huître plate. C. R. Acad. Sc. Paris Série D., 283 : 939-941.
- Grizel H. 1975. Développement et cycle du parasite responsable de l'épizootie de l'huître plate *Ostrea edulis* L. Haliotis, 5 : 61-67.
- 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 pp.
- Grizel H. et G. Tigé. 1977. Observations sur le cycle de *Marteilia refringens*. Haliotis, 8 : 327-330.

- Grizel H., M. Comps, D. Ragueneas, L. Leborgne, G. Tigé et A. G. Martin. 1983. Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les côtes de Bretagne. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 46 : 209-225.
- Grizel H., M. Comps, J. R. Bonami, F. Cousserans, J. L. Duthoit et M. A. Le Penneec. 1974. Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. Sci. Pêche. Bull. Inst. Pêches Marit., 240 : 7-29.
- Héral M., C. Bacher et J. M. Deslous-Paoli. 1989. La capacité biotique des bassins ostréicoles. L'homme et les ressources halieutiques. J. P. Troadec, IFREMER (ed.) : 225-259.
- Herrbach B. 1971. Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 35 : 79-87.
- Lauckner G. 1980. Diseases of Cnidaria. In : « Diseases of Marine Animals » O. Kinne (ed.), Volume I : 167-224.
- Lester R. J. G. 1986. Field and laboratory observations on the oyster parasite *Marteilia sydneyi*. In : « Parasite lives » M. Cremin, C. Dobson, D. E. Moorhouse (eds.), University of Queensland Press, Brisbane : 33-40.
- Lubat V. 1990. Approches biologiques et moléculaires dans l'étude des Myxosporidies, du PKX et des *Marteilia*. Impacts en aquaculture. Thèse Doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier : 118 pp.
- Manuel R. L. 1988. British Anthozoa. Synopses of British Fauna (New Series), Kermack D. M. et Barnes R. S. K. (eds.), 18 : 241 pp
- Perkins F. O. 1976. Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen, *Marteilia refringens* - Taxonomic implication. J. Protozool., 23 : 64-74.
- Perkins F. O. et P. H. Wolf. 1976. Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n.- Haplosporidan pathogen of Australian oysters. J. Parasitol., 62 : 528-538.
- Renault T., N. Cochenec et B. Chollet. 1995. Marteiliosis in American oysters *Crassostrea virginica* reared in France. Dis. aquat. Org., 23 : 161-164.
- Reymond H. 1991. Dynamique de la chaîne trophique benthique des marais maritimes en période estivale et son impact sur les productions aquacoles de carnivores : *Penaeus japonicus*, un modèle d'étude. Thèse Doctorat de l'Université de Paris VI : 257 pp.
- Riera P. 1995. Origine et devenir de la matière organique dans un écosystème estuarien à vocation conchylicole. Utilisation du traçage isotopique naturel. Thèse Doctorat Université de Bordeaux I : 214 pp.

- Robert R., M. Borel, Y. Pichot et G. Trut. 1991. Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquat. Living Resour.*, 4 : 265-274.
- Robledo J. A. F. et A. J. Figueras. 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. *J. Parasitol.*, 81 : 354-363.
- Roubal F. R., J. Masel et R. J. G. Lester. 1989. Studies on *Marteilia sydneyi*, agent of QX disease in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, with implications for its life cycle. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 40 : 155-167.
- Sautour B. 1991. Populations zooplanctoniques dans le bassin de Marennes-Oléron ; dynamique de population, nutrition et production des copépodes dominants. Thèse Doctorat, Université Bordeaux I : 283 pp.
- Sautour B. et J. Castel. 1993. Distribution of zooplankton populations in Marennes-Oléron Bay (France), structure and grazing impact of copepod communities. *Oceanologica acta*, 16 (3) : 279-290.
- Sprague V. 1979. Classification of the Haplosporidia. In : « Haplosporidian and Haplosporidian-Like Diseases in Shellfish » Perkins F. O.(ed.), *Mar. Fish. Rev.*, 41 : 25-37.
- Tigé G. et M. A. Rabouin. 1976. Etude d'un lot de moules transférées dans un centre touché par l'épizootie affectant l'huître plate. *Cons. Int. Explor. Mer K* : 1-10.
- Van Banning P. 1979. Haplosporidian diseases of imported oysters *Ostrea edulis*, in Dutch Estuaries. In : « Haplosporidian and Haplosporidian-Like Diseases in Shellfish » Perkins F. O. (ed.), *Mar. Fish. Rev.*, 41 : 8-18.
- Vaneechoutte M. et J. van Eldere. 1997. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J. Med. Microbiol.*, 46 : 188-194.
- Villalba A., S. G. Mourelle, M. C. López, M. J. Carballal et C. Azevedo. 1993. Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW. Spain). I. Etiology, phases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Dis. Aquat. Org.*, 16 : 61-72.