

Rapport de Stage (mars – juillet 1998)

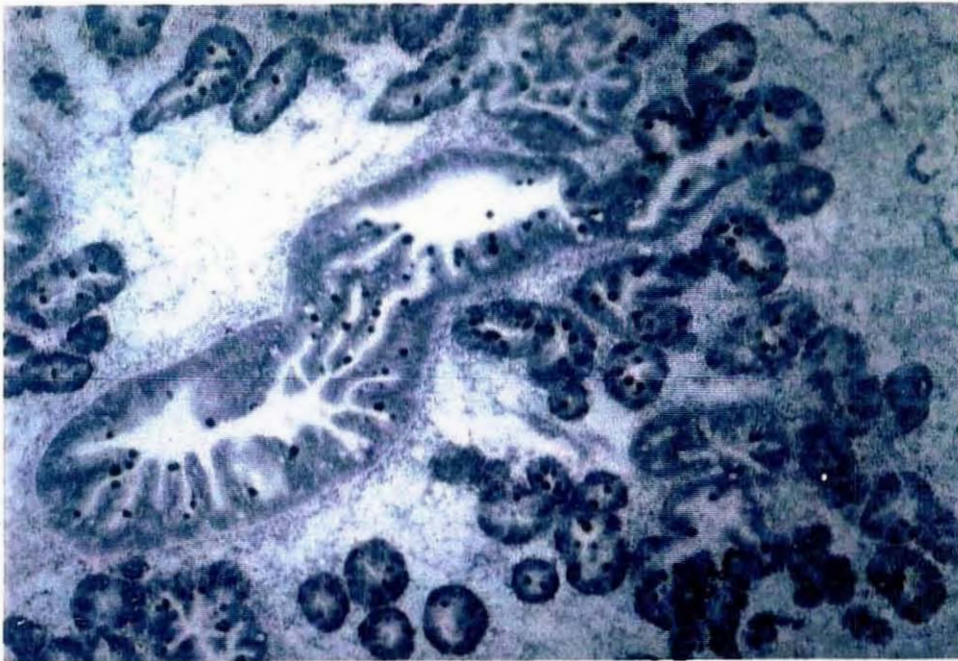
Suivi de la dynamique du parasite *Marteilia refringens* dans trois populations d'huîtres plates, *Ostrea edulis*.

Mémoire soutenu en vue de l'obtention de l'attestation d'option
« **Aquaculture, Pathologie aquacole et Environnement** »

par

Antoine Barnaud

Le 13 octobre 1998



Laboratoire de Génétique et Pathologie
B.P. 133 – 17390 La Tremblade

RESUME

Marteilia refringens est un Protozoaire parasite de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis*, à l'origine de mortalités bloquant l'élevage de cette espèce depuis 1968. Appartenant au phylum Paramyxea, il est caractérisé par un développement endogène complexe sous formes de clivages internes successifs dans une cellule primaire aboutissant à une structure de cellules emboîtées. Le seul moyen de contrôle de la marteiliose est une gestion du risque de contamination. Dans ce cadre, la connaissance du cycle parasitaire de *M. refringens* est primordiale. Notre étude a consisté à placer dans un biotope où fonctionne le cycle de *Marteila refringens*, une claire ostréicole, des huîtres plates infectées depuis un an et deux ans avec des jeunes huîtres saines qui ont été infectées au cours de l'étude, et à comparer la dynamique du parasite dans chacune des populations. Plusieurs paramètres ont été étudiés : la prévalence, l'intensité parasitaire (en différenciant plusieurs stades de maturité) et une étude des stades de développement du parasite. Ce suivi a été réalisé en histologie et complété en hybridation *in situ* dans certains cas. Cette étude a permis de décrire la cinétique de l'infection des huîtres saines et de montrer qu'elle intervenait deux mois après la libération des premières spores par les huîtres infectées. De plus, si une multiplication interne a été démontrée, des phases du cycle décrites par certains auteurs n'ont pas été observées. Enfin, des formes de *M. refringens* ont été mises en évidence dans l'espèce *Cereus pedunculatus*, sans que cet hôte apparaisse fonctionnel toutefois. Ce modèle d'infection semi-expérimental a montré qu'il constituait un système de reproduction quasiment contrôlé de la marteiliose et représente un atout majeur pour l'étude du cycle biologique de *M. refringens*.

REMERCIEMENTS

J'ai effectué ce stage de 5 mois au laboratoire IFREMER de Génétique et Pathologie de la Tremblade.

Je tiens à remercier avant tout Messieurs A. Gérard et J.P. Flassch pour leur accueil au sein du laboratoire.

Un immense merci à l'inoubliable « Marteilina Team » que je regrette déjà :

Monsieur Franck Berthe, mon maître de stage, pour son enthousiasme, grâce à qui j'ai pu mettre un pied dans la recherche... et l'autre sur une planche.

Mademoiselle Frédérique Le Roux, biologiste moléculaire passionnée, pour ses cours particuliers, son punch, et son témoignage sur la sporogonie in-mouline.

Monsieur Monsieur Pierre-Guy Sauriau, océanologue biologiste au CNRS, pour les classes vertes et son secret de la chasse aux Orchestia.

Et bien sûr Mademoiselle Corinne Audemard, « Mémère Eau-de-mare », stagiaire DEA puis thésarde, pour ces multiples émotions marteiliennes, pour ces après-midis dans la vase et pour les pâtes aux olives.

Et puis merci aux autres conseillers « à toutes heures » :

Mademoiselle Anne Thebault, grâce à qui Stats ou Squat ont été vite résolus.

Madame Nathalie Cochenec, pour ses conseils, ses doutes et le recul qu'elle a pu me donner sur ce sujet.

Monsieur Bruno Chollet, pour m'avoir fait une place et m'avoir patiemment enseigné l'art du découpage et du coloriage.

Sans oublier les autres stagiaires, chercheurs, techniciens, thésards, secrétaire, comptable ou bibliothécaire qui ont pu m'aider durant ces quelques mois.

SOMMAIRE

LISTE DES ILLUSTRATIONS	5
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	6
I. INTRODUCTION	7
II GENERALITES.....	10
1. SPOROGENÈSE DE <i>MARTEILIA REFRINGENS</i> CHEZ <i>OSTREA EDULIS</i> (FIGURE 1).....	10
2. TAXONOMIE.....	11
2.1 <i>Le phylum Paramyxea</i>	11
2.2 <i>Les espèces du genre Marteilia</i>	12
3. CYCLE PARASITAIRE DE <i>MARTEILIA REFRINGENS</i>	13
3.1 <i>Cycle de développement dans l'hôte (figures 2 et 3)</i>	13
3.2 <i>Cycle annuel et facteurs environnementaux</i>	13
3.3 <i>Hypothèse d'un cycle hétéroxène</i>	14
III MATERIEL ET METHODES.....	17
1. LE SITE D'ÉTUDE : LA CLAIRE OSTRÉICOLE.....	17
2. PARAMÈTRES PHYSIQUES.....	17
3. STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE.....	17
3.1 <i>Ostrea edulis</i>	17
3.2 <i>Cereus pedunculatus</i>	18
4. LES POPULATIONS D' <i>OSTREA EDULIS</i> ÉTUDIÉES.....	19
4.1 <i>Populations infectées et saine</i>	19
4.2 <i>Autres huîtres plates et mollusques divers</i>	19
5. TECHNIQUES D'ANALYSE.....	19
5.1 <i>Méthodes histologiques</i>	20
5.1.1 Principe.....	20
5.1.2 Méthode.....	20
a. Fixation des tissus.....	20
b. Déshydratation, imprégnation et inclusion des échantillons.....	20
c. Confection des coupes.....	20
d. Coloration topographique à l'hémalun-éosine et montage des lames.....	21
5.2 <i>Hybridation in situ</i>	21
5.2.1 Principe.....	21
5.2.2 Méthode.....	22
a. Préparation des sondes.....	22
b. Préparation des lames.....	22
c. Préhybridation et hybridation.....	22
d. Détection.....	23
e. Contre-coloration, montage et lecture.....	23
5.2.3 <i>Contrôle des manipulations : les témoins</i>	23

5.3 Lectures en microscopie photonique	24
5.3.1 Histologie	24
5.3.2 Hybridation <i>in situ</i>	24
5.4 Quantification des différents stades de <i>M. refringens</i> dans les populations (n) et (n-1)	25
5.5 Photo et numérisation.....	26
6. PRÉLÈVEMENT ET OBSERVATION DE FÈCES D' <i>O. EDULIS</i>	26
6.1 Prélèvement	26
6.2 Traitement des fèces	27
IV RESULTATS ET DISCUSSION.....	28
1. RÉSULTATS	28
1.1 Etude de la cinétique de <i>M. refringens</i> dans les 3 populations d' <i>O. edulis</i>	28
1.1.1 Etude de la prévalence (figure 4)	28
1.1.2 Etude de l'intensité parasitaire moyenne chez les (n) et les (n-1) (en parasites/champ).....	28
a. Intensité parasitaire moyenne totale (figure 6).....	28
b. Intensité parasitaire moyenne stade par stade (figure 7).....	28
1.2 Etude du cycle de développement du parasite dans <i>O. edulis</i> (photos).....	29
1.2.1 Chronologie et description du développement de <i>Marteilia</i>	29
a. Population (n-1)	29
b. Population (n-2)	31
1.2.2 Etude des fèces (fig. 13).....	32
1.3 Recherche d'hôtes intermédiaires par la présence du parasite dans d'autres espèces	32
1.3.1 Etude de mollusques autres que les huîtres plates étudiées.....	32
1.3.2 Cas de <i>Cereus pedunculatus</i> (anémones).....	33
a. Détection par PCR.....	33
b. Détection en hybridation <i>in situ</i> et histologie (fig. 16 et 17)	33
1.4 température (figure 18)	34
2. DISCUSSION	43
2.1 Nos résultats	43
Prévalence.....	43
Intensité parasitaire.....	44
Etude qualitative	46
Cycle de développement.....	47
<i>Cereus pedunculatus</i>	48
Relation température/infestation.....	49
2.2 Intérêts et limites des techniques et méthodes utilisées.....	49
Site d'étude et populations étudiées	50
La stratégie d'échantillonnage.....	50
Outils de détection de <i>Marteilia refringens</i>	51
V CONCLUSION ET PERSPECTIVES	54
BIBLIOGRAPHIE.....	55

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1 :** Sporogénèse de *Marteilia refringens* (Lubat, 1990)
- Figure 2 :** Schéma du cycle de développement présumé de *Marteilia refringens* (Grizel *et al.*, 1974)
- Figure 3 :** Schéma du cycle de développement de *Marteilia refringens* d'après les données de Franc (1980)
- Figure 4 :** Evolutions comparées des prévalences (%) de *Marteilia refringens* dans les populations d'*O. edulis* (n) et (n-1)
- Figure 5 :** Courbe théorique d'infection d'une population d'huîtres plates par *M. refringens* pendant les trois premières années d'infection (prévalence en fonction du temps)
- Figure 6 :** Evolutions comparées du nombre total de parasites moyen par champ microscopique (*1000) dans les populations d'*O. edulis* (n) et (n-1)
- Figure 7 :** Evolutions comparées du nombre de parasites *Marteilia refringens* (par champ microscopique *1000) dans les populations (n) et (n-1) d'*O. edulis* en distinguant les stades jeunes (J), les stades mûrs (M) et les pansporoblastes (P)
- Figure 8 :** Premiers stades de *Marteilia refringens* observés situés dans l'épithélium stomacal d'une huître plate *Ostrea edulis* (n) à peine infestée (Coloration hémalum éosine, X 1000)
- Figure 9 :** Cellules primaires contenant plusieurs cellules secondaires et quelques cellules tertiaires situées dans un diverticule de la glande digestive d'*Ostrea edulis* (Coloration hémalum éosine, X 1000)
- Figure 10 :** Stades mûrs ou « sporanges » et pansporoblastes libres respectivement dans l'épithélium et la lumière d'un diverticule de la glande digestive d'*Ostrea edulis* (Coloration hémalum éosine, X 1000)
- Figure 11 :** Libération massive de pansporoblastes dans la lumière d'un canal de la glande digestive d'*Ostrea edulis* (Coloration hémalum éosine, X 1000)
- Figure 12 :** Libération massive de pansporoblastes « éclatés » (cellules tertiaires et granules réfringents) dans la lumière intestinale d'*Ostrea edulis* (Coloration hémalum éosine, X 1000)
- Figure 13 :** Présence de pansporoblastes entiers dans les fèces d'*Ostrea edulis* (Coloration hémalum éosine, X 1000)
- Figure 14 :** Détection de formes de *Marteilia refringens* en hybridation *in situ* dans la glande digestive d'*Ostrea edulis* (Contre-coloration au vert lumière 1%, X 400)
- Figure 15 :** Détection de formes de *Marteilia refringens* en hybridation *in situ* dans les palpes d'*Ostrea edulis* (Contre-coloration au vert lumière 1%, X 200)
- Figure 16 :** Détection de formes de *Marteilia refringens* en hybridation *in situ* dans un tentacule de *Cereus pedunculatus* (Contre-coloration au vert lumière 1%, X 1000)
- Figure 17 :** Détection de formes de *Marteilia refringens* en histologie dans un tentacule de *Cereus pedunculatus* (Coloration hémalum éosine, X 1000) (Coupe sériée de la figure 16)
- Figure 18 :** Cycle thermique de l'eau de la claire du 17/02/98 au 18/09/98
- Figure 19 :** Nouvelle hypothèse du cycle de *Marteilia refringens* d'après nos observations
- Figure 20 :** Evolution de la mortalité et de la température en fonction du temps (Berthe *et al.*, 1998).
- Figure 21 :** Evolution du taux d'infection et de la température en fonction du temps (Berthe *et al.*, 1998).
- Figure 22 :** Schémas de la structure et du fonctionnement des diverticules de la glande digestive des bivalves (Grassé, 1960).

LISTE DES ABBREVIATIONS

OIE : Office International des Epizooties

MARS : *Marteilia refringens* Studies

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

PCR : Polymerase Chain Reaction

IFREMER : Institut Français pour la Recherche et l'exploitation de la Mer

CREAA : Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole

DIG : Digoxygénine

J : stades jeunes

M : stades mûrs

P : pansporoblastes

(n-2) : population d'huîtres plates infestée par *M. refringens* depuis 2 ans

(n-1) : population d'huîtres plates infestées par *M. refringens* depuis 1 an

(n) : population d'huîtres plates saines

HIS : Hybridation *in situ*

SSC : Solution de NaCl (0.3M) et Citrate de Sodium (3M) à pH 7.

I. INTRODUCTION

Marteilia refringens (Grizel *et al.*, 1974; Perkins, 1976), protozoaire parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis* (Linné, 1758), est l'un des agents responsables de l'effondrement de cette production, en France au cours de ces 30 dernières années.

En 1967, la maladie des Abers ou marteiliose a fait ainsi son apparition sous la forme de mortalités anormales dans l'estuaire de l'Aber Wrach dans le Finistère (Herrbach, 1971; Alderman, 1979). Puis, elle sévit rapidement sur la côte atlantique française du nord de la Bretagne jusqu'au bassin d'Arcachon (Comps, 1970; Grizel et Tigé, 1973), l'intensité des transferts commerciaux favorisant son extension. Ce nouveau parasite affecte la glande digestive de l'huître plate, provoquant des mortalités dramatiques au sein des élevages ostréicoles.

En 1979, l'apparition de *Bonamia ostreae*, parasite hémocytaire d'*Ostrea edulis*, précipite la chute de la production d'huîtres plates françaises qui, aujourd'hui, ne représente plus que 1500 tonnes / an contre 15000 tonnes en 1960 (Héral *et al.*, 1989).

Ces deux maladies ont été classées dans la liste II de la Directive 91/67/CE et figurent dans la liste des maladies à déclaration obligatoire du Code Sanitaire International pour les Animaux Aquatiques de l'OIE.

L'ostréiculture est un élevage très fragile et subit régulièrement de graves épizooties difficiles à combattre. La lutte anti-infectieuse chez les bivalves marins rencontre des difficultés particulières, limitant les possibilités d'intervention.

- D'une part, c'est une culture en milieu ouvert, ce qui rend difficilement envisageable le traitement par des substances anti-infectieuses sans risque pour l'environnement et pour des raisons évidentes d'efficacité et de coût, étant donné les volumes de produits nécessaires.
- D'autre part, le système immunitaire des bivalves semble dépourvu de cellules de type lymphocytaire, cellules directement impliquées chez les vertébrés dans les réponses spécifiques vis-à-vis d'un agent extérieur, et qui peuvent être stimulées au moyen de la vaccination, ôtant tout espoir de protection immunitaire.

Par conséquent, les moyens de lutte se réduisent actuellement à la sélection génétique d'animaux résistants ou tolérants à ces maladies ainsi qu'à la gestion du risque de contamination.

Si de récentes études de génétique ont permis de sélectionner des huîtres tolérantes à *Bonamia ostreae* (Baud *et al.*, 1997), aucun résultat n'a encore été obtenu pour *Marteilia refringens*. Reste la gestion du risque, empirique et restreinte au choix du lieu d'élevage; ainsi l'endémie ne dépasse pas le nord de la Bretagne et la marteiliose ne semble pas affecter les huîtres plates élevées en eau profonde. Enfin, les transferts d'animaux sont réglementés en Europe (Directive 91/67) par une zonation du littoral et un classement en zones infectées et indemnes.

Aujourd'hui, la compréhension du cycle du parasite est une priorité dans un objectif de gestion du risque de la Martéiliose. Or malgré les nombreuses études et hypothèses réalisées à ce sujet, de larges lacunes subsistent. Ainsi le mode de transmission de *Marteilia refringens* reste inconnu. La tendance actuelle suppose l'existence d'un cycle complexe, employant un ou plusieurs hôtes intermédiaires, et/ou l'existence d'une phase libre du parasite plutôt qu'une transmission horizontale directe (Berthe et al., 1998). Des cycles ont ainsi été proposés (Grizel, 1985), décrivant différents stades d'un développement complexe dans l'huître avec toutefois des incertitudes sur le rôle des stades observés dans la multiplication et la dissémination du parasite.

Jusqu'à ces dernières années, l'étude des maladies chez les bivalves marins reposait sur l'histologie, parfois couplée à la microscopie électronique. Toutefois, le manque de spécificité et de sensibilité de cette technique a été un des facteurs limitants de l'étude du cycle de *Marteilia refringens*. L'arrivée de nouveaux outils de diagnostic basés notamment sur l'immunologie et plus récemment la biologie moléculaire, a apporté des espoirs considérables.

Notre étude entre dans le cadre du projet de recherche MARS (*Marteilia refringens* Studies), projet européen visant doublement à étudier la taxonomie et le cycle de *Marteilia* spp..

Elle a comme principaux objectifs de décrire chez l'huître le déroulement du cycle parasitaire d'un point de vue quantitatif et qualitatif, et en particulier les étapes de maturation du parasite, de sa multiplication dans l'hôte, de sa transmission, et enfin de l'infestation des individus sains. Elle a également pour but de suivre les formes de *Marteilia refringens* éventuellement mises en évidence dans d'autres espèces et d'étudier la compatibilité avec le cycle observé chez *Ostrea edulis*.

Elle consiste à placer dans un biotope où fonctionne le cycle de *M. refringens*, des huîtres plates infectées depuis 1 an et 2 ans avec des jeunes huîtres saines qui seront logiquement infectées dans la saison, et à comparer la cinétique de *Marteilia refringens* dans chacune des populations.

Cette étude a été menée parallèlement à une autre étude de recherche systématique du parasite dans la faune associée aux huîtres plates à l'aide également d'outils de biologie moléculaire (Audemard, 1998). Ces deux études ont eu pour cadre des claires ostréicoles de l'île d'Oléron, située en zone endémique et où il a été préalablement vérifié que le cycle était fonctionnel.

Le suivi et la comparaison de la dynamique du parasite dans ces différentes populations passent par l'étude de plusieurs paramètres. L'infestation sera définie comme la prolifération du parasite dans l'hôte (notion quantitative) et l'infection comme le fait d'être parasité (notion qualitative).

- La prévalence de la maladie c'est à dire sa fréquence dans la population (ou degré d'infection), quelque soit le degré d'infestation des individus.
- L'intensité parasitaire, c'est à dire le degré d'infestation d'un individu, total (tous stades confondus) ou stade par stade.

- L'étude qualitative des stades parasitaires observés et de leur développement dans les tissus de l'hôte (morphologie, taille, emplacement, répartition...).

La technique de routine utilisée est l'histologie (coupes de tissus, coloration et observation en microscopie photonique) suffisante pour le diagnostic de la marteiliose et l'étude du développement du parasite dans l'hôte. L'autre technique utilisée est l'hybridation *in situ*, technique de biologie moléculaire basée sur la détection de l'ADN du parasite sur coupe histologique à l'aide d'une sonde d'acide nucléique spécifique. Elle intervient dans la mise en évidence du parasite dans l'huître pour localiser tous les stades lorsque l'histologie n'est plus suffisante (stades infestants), ou dans un hôte potentiel, après avoir détecté sa présence par la technique de PCR (étude parallèle).

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 de la bouche, des palpes et 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). Il peut conduire à la mort de l'animal (Grizel *et al.*, 1974).

1. Sporogénèse de *Marteilia refringens* chez *Ostrea edulis* (figure 1)

Chez l'huître plate, le parasite *Marteilia refringens* subit une évolution complexe endogène qui aboutit à la formation de spores (figure...) . Ce type de structure et de sporogénèse sont caractéristiques du phylum des Paramyxia auquel appartiennent *Marteilia* spp.

- Le stade initial est constitué par une cellule souche ou **cellule primaire** (Grizel *et al.*, 1974), encore nommée plasmode par Perkins (1976), 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. 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 (Perkins, 1976) et peut atteindre 30 μm de diamètre. La cellule secondaire (de 10 à 15 μm de diamètre) devient le pansporoblaste (Desportes et Ginsburger-Vogel, 1977a) où quatre cellules tertiaires sont formées par bourgeonnement endogène
- Les **cellules tertiaires** ou spores primordia spores (Perkins, 1976) deviennent alors des spores contenant trois sporoplasmes uninucléés, emboîtés, issus de divisions endogènes. Le sporoplasme le plus externe peut être assimilé à une cellule primaire car il comporte également des haplosporosomes (Perkins, 1976). Les spores atteignent à maturité 4 μm de diamètre. Parallèlement à ces transformations, apparaissent des inclusions protéiques amorphes (Grizel *et al.*, 1974) dans le cytoplasme des cellules secondaires. Sur apposition cellulaire, ces inclusions ou granules très réfringents permettent une reconnaissance aisée des formes évoluées du parasite (Herrbach, 1971). Puis la paroi des cellules primaires (ou sporanges) se rompt libérant les pansporoblastes (Herrbach, 1971; Grizel, 1974) dans la lumière du tractus digestif vers le milieu extérieur.

2. Taxonomie

La taxonomie des parasites du genre *Marteilia* a subi depuis leur découverte des modifications successives.

2.1 Le phylum Paramyxia

Le genre *Marteilia* et en particulier l'espèce *Martelia 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).

Etant donné 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 Asctospora regroupant des protozoaires parasites comme les Haplosporidies ainsi que les organismes nouvellement décrits appartenant aux genres *Martelia* et *Paramartelia*, parasite du Crustacé *Orchestia gamarellus* (Ginsburger Vogel et al., 1976).

Ce phylum était divisé en deux classes: les Stellatosporea et les Paramyxia. 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 *Paramartelia* étaient placés dans la famille des Marteliidae, ordre des Occlusporida. Un autre ordre, les Balanosporida comportait les haplosporidies typiques. La classe des Paramyxia comprenait une espèce *Paramyxa paradoxa* (Chatton, 1911) parasite des larves de l'annélide *Poecilochaetus serpens*.

Néanmoins, *Marteilia*, *Paramartelia* et *Paramyxa*, proches 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 Paramyxia. Cette classe fut divisée en deux ordres, l'ordre des Marteliidae comportant les genres *Martelia* et *Paramartelia* 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 le nombre d'espèces de ces parasites, la dernière proposition a été de réhausser la classe des Paramyxia au rang de phylum (Desportes et Perkins, 1990).

Phylum Paramyxia (Levine in Sprague, 1980)

Classe Marteliidea (Desportes et Ginsburger-Vogel, 1977)

Marteilia (parasite de bivalves marins)

Paramartelia (parasite de Crustacés)

Marteloides (parasite de bivalves marins)

Classe Paramyxidea (Chatton, 1911)

Paramyxa (parasite d' annélide polychète)

2.2 Les espèces du genre *Marteilia*

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 *Martelia refringens* et *Martelia maurini*. L'identification des différentes espèces de ce genre nécessite donc de prendre en compte d'autres critères d'identification. Ainsi, 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.

- *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* semble réellement affectée par ce pathogène. Dans le cadre de la relance de la production d'huîtres plates, des essais d'implantations d'espèces allochtones ont été réalisés. Il a ainsi été démontré qu'*Ostrea angasi* (Bougrier *et al.*, 1986) et *Ostrea chilensis* (Grizel *et al.*, 1982) étaient sensibles à ce parasite limitant l'implantation de ces mollusques sur nos côtes (Robert *et al.*, 1991). De plus *M. refringens* a été retrouvé sur *C. virginica* dans des conditions analogues (Renault *et al.*, 1995). *Marteilia refringens* parasite les moules *Mytilus edulis* (Tigé et Rabouin, 1976) et *Mytilus galloprovincialis* mais sans engendrer de mortalités notoires telles que celles observées chez *Ostrea edulis* (Figeras *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 en sporanges (Balouet *et al.*, 1979) et l'espèce peut être considérée comme un cul-de-sac parasitaire.
- *Marteilia maurini* a été décrit chez *Mytilus galloprovincialis* (Comps *et al.*, 1982) et *Mytilus edulis* (Auffret et Poder, 1983). Ses caractères ultrastructuraux rendent cette espèce difficilement différenciable de *Marteilia refringens*.
- *Marteilia christensini* a été décrit chez le scrobiculaire *Scrobicularia plana* (Comps, 1985).
- *Marteilia lengahi* a été décrit chez des huîtres *Saccostrea cucullata* du Golfe Persique (Comps, 1976) et d'Australie (Hiné, 1996)
- *Marteilia* sp. a été observé 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).
- *Marteilia sydneyi* (Perkins et Wolf, 1976) est une espèce parasite de *Saccostrea commercialis* sur la côte sud-est de l'Australie. Elle a les mêmes effets pathogènes que *M. refringens* chez *Ostrea edulis*.

3. Cycle parasitaire de *Marteilia refringens*

3.1 Cycle de développement dans l'huître (figures 2 et 3)

Les premières observations de *M. refringens* ont montré l'existence d'un lien entre les stades successifs du parasite et leur localisation dans l'huître (Comps, 1970; Herrbach, 1971; Grizel et Tigé, 1974).

Les premiers stades du parasite (cellules primaires à secondaires) sont décrits essentiellement dans l'épithélium cilié de l'estomac, toutefois ces jeunes stades peuvent également être observés dans le reste de la glande digestive et plus rarement dans les branchies (Comps, 1970). La prolifération des stades jeunes dans les diverticules digestifs précède le développement des stades suivants qui conduiront à la formation de sporanges avec des granules réfringents et des spores (Perkins, 1976).

Deux hypothèses ont été avancées par Franc (1980) (figure 3) et Grizel (1985) qui considèrent que le cycle d'évolution de *Marteilia refringens* comporte deux phases (figures....) prenant place dans la glande digestive. Une première phase dite de « schizogonie », sous la forme d'une multiplication de cellules secondaires puis de leur libération dans l'hôte favorisant l'invasion de celui-ci; suivie d'une deuxième phase dite « sporogonique » par Grizel et « sexuée » par Franc, caractérisée par une différenciation cellulaire en « lignées » distinctes aboutissant à une « conjugaison » et une « sporulation ».

Les deux hypothèses divergent lors de la seconde phase. Franc (1980) place les « spores de dissémination » (pansporoblastes) après la conjugaison tandis que Grizel (1985) les place avant la conjugaison (dans la lignée secondaire décrite par Franc). Le devenir de ces spores dans le milieu extérieur n'est pas élucidé et l'hypothèse d'un cycle comportant un ou plusieurs hôtes intermédiaires a été avancée dès les premières études (Grizel et Tigé, 1973; Balouet, 1979).

3.2 Cycle annuel et facteurs environnementaux

La marteiliose est une maladie saisonnière caractérisée par un taux d'infection très élevé en été et en automne. D'après les observations de Grizel (1985), dans le cas d'huîtres plates de Bretagne, le taux de parasitisme est minimal en mars et avril, soit après les deux mois les plus froids de l'année et augmente à partir de mai, ce qui correspond à une température de l'eau de 12°C. Ce taux est maximal de juin à août puis diminue jusqu'en décembre. Quant aux stades observés, les jeunes stades sont présents toute l'année tandis que les formes sporales disparaissent en hiver. Les formes jeunes correspondraient à une infestation chronique toute l'année alors que les stades plus complexes obéiraient à un cycle saisonnier et seraient responsables de la dispersion du parasite dans le milieu (Balouet, 1979; Grizel, 1985).

La contamination d'huîtres saines n'est possible qu'à partir du seuil thermique de 17°C c'est à dire pendant les mois d'été (Grizel, 1985). Balouet et al. (1979) ont aussi montré que l'infestation se produit en juillet et août en rade de Brest quelle que soit la durée d'immersion en zone contaminée, observation également établie par Tigé et al. (1979). Après cette période, des huîtres saines placées en zone contaminée restent indemnes. Des variations

saisonniers et géographiques peuvent décaler cette fenêtre temporelle d'infection mais la température semble le facteur primordial dans la transmission de la parasitose.

Les facteurs environnementaux tels que la salinité et le renouvellement du milieu, notamment par les marées, semblent être des paramètres nettement moins déterminants que la température. Il est à noter que la marteiliose 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, aucune relation claire n'a pu, jusqu'à présent, 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 *Marteilia* (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 indemnes (Balouet et al., 1979). L'intervention d'un autre facteur, tel que la présence d'un ou plusieurs hôtes dans le cycle, est considérée comme l'une des explications possibles.

3.3 Hypothèse d'un cycle hétéroxène

Suite aux essais de transmission de la marteiliose en milieu naturel ayant mis en évidence un cycle saisonnier et une période d'infection limitée (Balouet, 1979; Balouet et al., 1979; Grizel, 1985), des essais de transmission expérimentale ont été réalisés. Diverses méthodes ont été utilisées : cohabitation d'huîtres plates, de moules, injections de suspensions de spores (Balouet et al., 1979; Grizel, 1985; Berthe et al., 1998), transplantation de glande digestive infectée (Lester, 1986; Berthe et al., 1998), utilisation de glande digestive pour nourrir des hôtes intermédiaires 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 mis en place, il n'a jamais été permis d'infecter expérimentalement des animaux sains. Il en découle l'hypothèse relative à l'existence d'un ou plusieurs hôtes intermédiaires dans le cycle du parasite (cycle hétéroxène).

L'intervention d'un hôte pourrait également expliquer l'absence de transmission de la maladie en certains sites. Ainsi, en 1979, des huîtres plates de Bretagne, infectées par *M. refringens*, puis exportées aux Pays-Bas n'ont subi aucune mortalité importante. De plus, aucune contamination des huîtres saines présentes sur le site ne fut relevée malgré des conditions de température, salinité et d'élevage similaires à la Bretagne (Van Banning, 1979).

Des études histologique pour identifier *M. 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 abouti.

L'hypothèse d'un cycle hétéroxène repose donc sur les résultats négatifs de nombreuses études expérimentales. Néanmoins, ce type de résultats expérimentaux ne permet pas d'écarter la possibilité d'une phase libre de *Marteilia refringens*. 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. Mais actuellement, rien ne démontre la capacité des spores à survivre dans le sédiment pendant une période prolongée (Roubal et *al.*, 1989); cependant les observations faites au laboratoire IFREMER GAP de Ronce-les-bains sont contradictoires (Berthe, communiqué personnel). Enfin, il est possible que les conditions expérimentales ne reproduisent pas les stimuli nécessaires à la transmission du parasite (Berthe et *al.*, 1998).

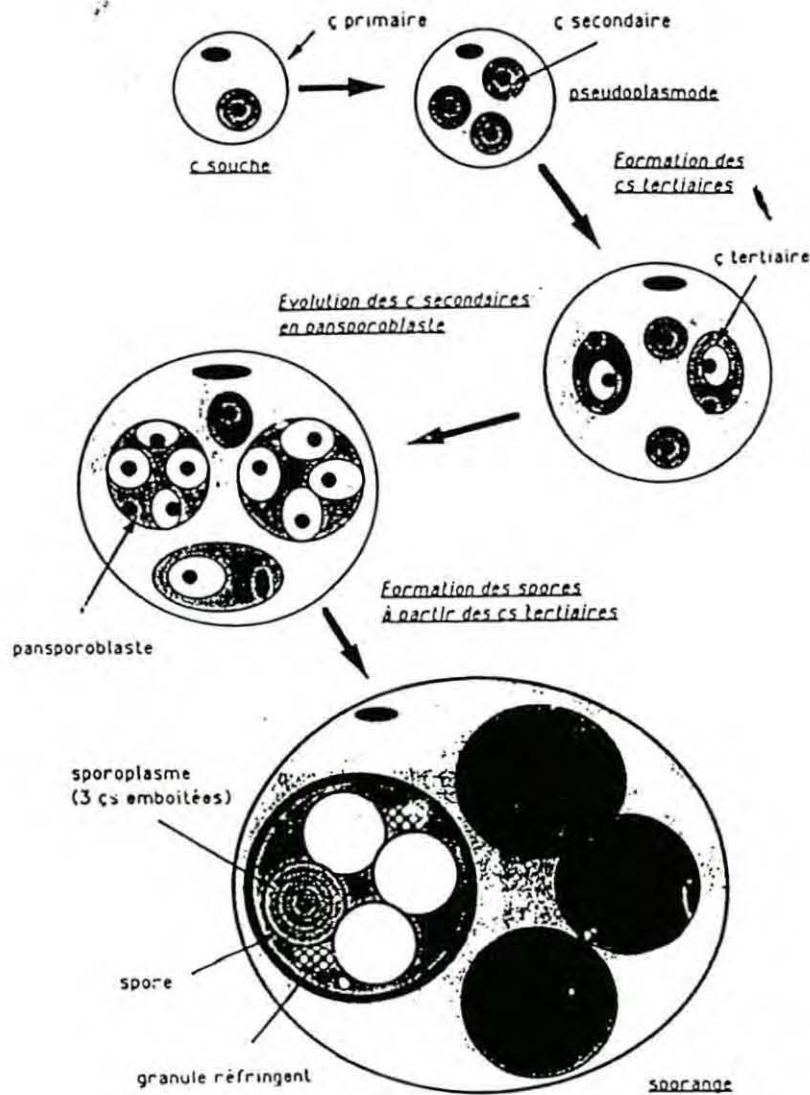


Figure1: Sporogénèse de *Marteilia refringens* (Lubat, 1990)

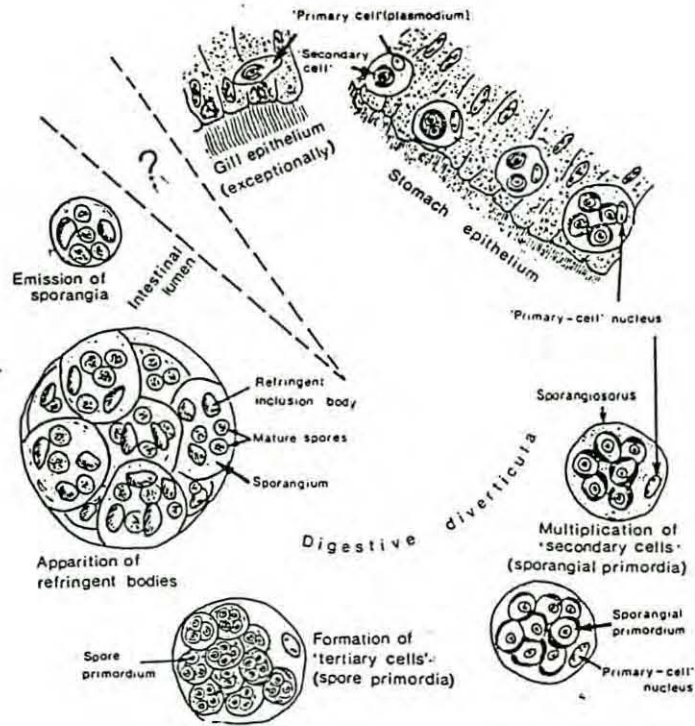


Figure 2 : Schéma du cycle de développement présumé de *Marteilia refringens* (Grizel et al., 1974)

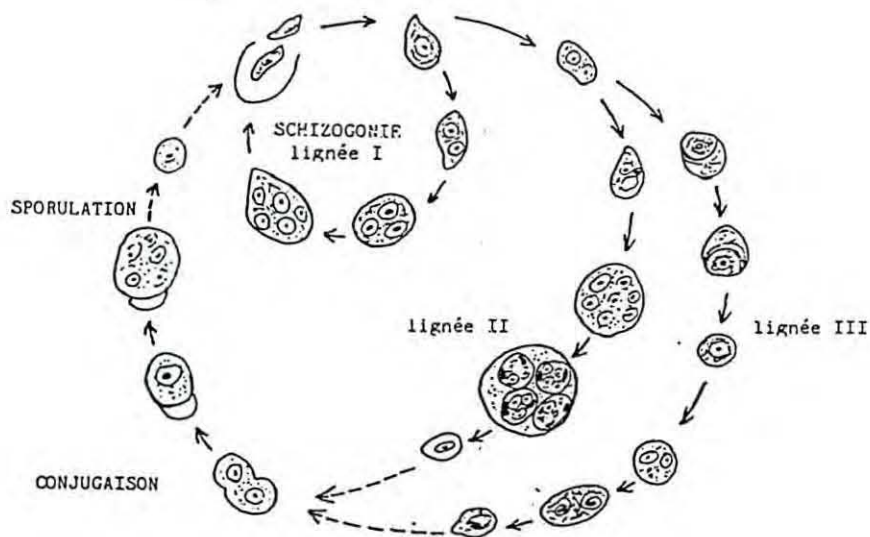


Figure 3 : Schéma du cycle de développement de *Marteilia refringens* d'après les données de Franc (1980)

1. Le site d'étude : la claire ostréicole

Les claires ostréicoles sont des bassins à fond naturel d'environ 1m de profondeur, alimentés en eau par des chenaux et traditionnellement utilisées pour l'affinage des huîtres. Les huîtres ont été placées dans une même claire située au sud-est de l'île d'Oléron (figure) dans les marais expérimentaux du CREAA (Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole). Alimentée par le chenal d'Ors, le renouvellement de l'eau est contrôlé par un système d'écluses et n'est possible qu'à partir d'un coefficient de 80 environ. Elle ne sera jamais vidangée complètement afin de conserver un maximum de zooplancton, échantillonné pour l'étude des hôtes potentiels.

Elle est située en zone endémique et des travaux antérieurs ont permis de vérifier le caractère fonctionnel de la maladie dans ce système. Par ailleurs, alors que la recherche de *Marteilia refringens* sur estran est compliquée par le nombre important d'espèces à analyser, le système claire constitue un modèle simplifié de ce dernier puisque la biodiversité y est dix fois plus faible (de Montaudouin et Sauriau, 1998), ce qui rend possible un screening exhaustif des espèces présentes. Enfin, un tel site d'étude facilite l'accès aux animaux et le suivi des variations du milieu.

La faune de la claire peut se diviser en trois sous-compartiments : le zooplancton, la méiofaune (dans le sédiment) et la macrofaune. Dans le cadre de l'étude parallèlement menée sur la recherche d'hôtes intermédiaires potentiels (Audemard, 1998), la totalité des espèces présentes dans la claire ont été prélevées chaque mois. Nous sommes intervenus en histologie et hybridation *in situ* dès qu'un échantillon répondait positivement en PCR afin de mettre en évidence d'éventuels stades parasitaires dans l'hôte suspecté.

2. Paramètres physiques

La température de l'eau des claires a été mesurée en continu (avec un pas de 15 mn) à l'aide d'une sonde étanche de marque Onset placée au milieu de la claire à 20 cm du sédiment.

3. Stratégie d'échantillonnage

3.1 *Ostrea edulis*

Il a fallu trouver un compromis entre la précision voulue, la faisabilité de l'étude (en coût et en temps de traitement des échantillons) et une bonne adéquation avec le suivi des autres espèces de la claire afin de pouvoir mettre en parallèle, la cinétique d'infestation des

différentes populations. Il fallait également que l'étude dure de février à juillet, période durant laquelle le parasite est transmis.

- ⇒ La taille initiale des 3 populations a été choisie en fonction de plusieurs facteurs :
- la durée de l'étude, la taille des échantillons et la fréquence d'échantillonnage.
 - les huîtres disponibles dans chaque catégorie (en particulier beaucoup d'individus infestés depuis deux ans n'ont pas survécu durant les quelques mois d'hiver précédant l'étude, ce qui explique la faible taille de cette population d'étude)
 - les mortalités prévues normales et/ou dûes à *M. refringens* : 40 à 60% qui se vérifieront sur le terrain
 - le coût financier et le temps de travail demandé (2 lames histo au minimum par individu soit 1500 lames environ)
- ⇒ La taille des échantillons : 30 individus. Ce nombre permet de détecter une prévalence de 10% dans une population de plus de 100000 individus ce qui est largement suffisant pour notre étude (prévalences de 10 à 80% attendues). C'est également la taille des échantillons prélevés pour l'autre étude.
- ⇒ Le pas d'échantillonnage : 15 jours. Il a été choisi en fonction des données bibliographiques concernant la durée du cycle (2-3 mois) et du temps nécessaire pour traiter au fur et à mesure les échantillons.

3.2 Cereus pedunculatus

Après l'obtention de résultats positifs en PCR spécifique sur des anémones échantillonnées en mai 97, la recherche du parasite dans d'autres espèces (Audemard, 1998) a été focalisée sur cette espèce. En routine, 30 individus étaient échantillonnés une fois par mois (Audemard, 1998). L'effort d'échantillonnage est passé à une fois par semaine puis a encore été doublé en prélevant des individus de deux provenances différentes : 30 anémones fixées sur les coquilles des huîtres (prélevées aléatoirement sur les trois populations) et anémones fixées sur le substrat vaseux de la claire (prélevées par tamisage à une dizaine de mètres des huîtres) afin de déterminer l'importance du lieu de fixation de l'hôte.

D'autre part, 10 anémones ont été prélevées sur des huîtres parasitées maintenues expérimentalement au laboratoire dans des bacs à une température de 20°C depuis le 3/04/98. L'observation de leurs fèces a confirmé la libération du parasite dans ces bacs. Ces anémones étaient donc confinées dans un milieu à forte densité de *Marteilia refringens*. Elles ont été analysées le 24/04/98.

Chaque individu était alors coupé (à l'aide d'une lame de microtome usagée) en deux moitiés égales mises dans deux tubes eppendorfs de 2 mL. L'une, destinée à l'extraction d'ADN puis à la PCR, est placée au congélateur à -20°C; l'autre, destinée à l'histologie ou l'hybridation *in situ*, était conservée dans du Davidson.

4. Les populations d'*Ostrea edulis* étudiées

4.1 Populations infectées et saine

Les huîtres proviennent toutes de l'écloserie de l'IFREMER. Nous avons étudié trois lots d'animaux immergés dans la claire au même moment (fin janvier 98).

- Population « n » : âgées de quelques mois et contrôlées indemnes de *Marteilia refringens* - 1000 individus
- Population « n-1 » : infectées depuis un an - 700 individus
- Population « n-2 » : infectées depuis deux ans - 300 individus

Elles ont toutes été placées dans des poches ostréicoles, par lots de 50 à 100 par poche, et disposées à plat au fond de la claire, parallèlement, sur le substrat vaseux.

4.2 Autres huîtres plates et mollusques divers

Tous les mollusques autres que les huîtres plates ponctuellement échantillonnés ont également été observés en histologie suivant la même technique que *Ostrea edulis*; il s'agit de *Crassostrea gigas* (3), *Mytilus edulis* (3), *Crepidula fornicata* (1), *Ruditapes decussatus* (30), *Scrobicularia plana* (30) et *Lithophaga lithophaga* (1).

Un échantillon de 30 huîtres plates *Ostrea edulis* de filières (technique de captage et de grossissement en pleine eau) a également été analysé.

5. Techniques d'analyse

La recherche de *M. refringens* dans le cadre de la réglementation européenne (agent à recherche obligatoire) est réalisée à l'aide des méthodes cytologiques et histologiques classiques (Directive Communautaire 94/306/CE). Les techniques basées sur l'utilisation de sondes nucléiques et d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux ne sont pas utilisées dans le cadre de dépistage en routine de la maladie.

La taille du parasite (jusqu'à 30 µm) permet son observation en microscopie photonique. La méthode cytologique (frottis de glande digestive et coloration au kit Hémacolor/Merck après fixation dans un bain de méthanol) est la technique la plus simple pour le diagnostic de *Marteilia* mais elle ne permet pas d'observer le parasite au sein des tissus de l'hôte (important pour l'étude du cycle) et déstructure souvent les formes mûres. C'est pourquoi la technique utilisée ici a été l'histologie, plus difficile, plus coûteuse en temps et financièrement mais plus adaptée à l'étude du cycle de développement d'un parasite.

L'hybridation *in situ*, deuxième méthode utilisée dans notre étude, combine la première à un marquage spécifique de l'ADN du parasite à l'aide d'une sonde nucléique. Elle a été utilisée lorsque les formes parasitaires recherchées étaient difficilement visibles (petite

taille, forme inconnue, localisation inhabituelle) ou lorsque l'on souhaitait avoir une vision globale et exhaustive de la répartition du parasite dans l'hôte.

5.1 Méthodes histologiques

5.1.1 Principe

L'histologie est une technique visant à l'observation des structures cellulaires et tissulaires en microscopie photonique. L'examen histologique permet de préciser la localisation du parasite, sa morphologie et ses effets histopathologiques, et apporte également des précisions sur sa structure. La préparation des tissus en vue de cet examen comporte différentes étapes.

5.1.2 Méthode

a. Fixation des tissus

Le fixateur a pour rôle de conserver les tissus dans un état aussi proche que possible de leur morphologie *in vivo*. Le matériel vivant est prélevé, rincé, débarrassé de sa coquille et égoutté. L'animal est ensuite coupé dans un plan longitudinal en deux moitiés qui sont fixées, l'une dans du liquide de Davidson, et l'autre dans du Carson, principaux fixateurs utilisés pour les mollusques marins. Le liquide de Davidson, composé à base d'eau de mer, ce qui lui permet de bien préserver la structure des tissus, est utilisé pour l'analyse en histologie. Le liquide de Carson, moins approprié pour l'histologie, permet une bonne conservation de l'ultrastructure; il est utilisé pour conserver les échantillons susceptibles d'être utilisés ultérieurement en microscopie électronique.

b. Déshydratation, imprégnation et inclusion des échantillons

Les tissus sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol à 95%, puis d'éthanol absolu, afin d'éliminer l'eau des tissus. L'imprégnation des pièces par un solvant de la paraffine, le xylène, permet d'éliminer l'alcool et de faciliter l'étape suivante, l'imprégnation par de la paraffine en fusion à 60°C. Ces opérations sont réalisées dans un automate (LKB). Puis, les tissus sont inclus dans des blocs de paraffine à l'aide de moules métalliques et refroidis sur une plaque réfrigérante (LKB).

c. Confection des coupes

Après refroidissement des blocs sur la plaque réfrigérante (-20°C) qui permet de durcir la paraffine, les coupes de 2 μ d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome (LKB). Les rubans ainsi obtenus sont déposés à la surface d'un bain-marie à 37°C. Après étalement des coupes, celles-ci sont récupérées sur des lames de verre, égouttées et placées une nuit à l'étuve

à 60°C. Ce séchage à chaud permet d'éliminer l'excès de paraffine et de coller les coupes sur les lames de verre.

d. Coloration topographique à l'hémalun-éosine et montage des lames

Les lames sont déparaffinées par deux bains de xylène; ce solvant est ensuite éliminé par deux bains d'alcool puis les coupes sont réhydratées et colorées dans les bains de colorants. Enfin, trois nouveaux bains d'alcool successifs déshydratent les coupes avant de les plonger dans deux bains de xylène (hydrophobe), solvant de la résine Eukitt utilisée pour monter les lamelles.

1)	Xylène	2 bains de 15 mn
2)	Ethanol absolu	2 bains de 15 mn
3)	Eau courante	10 mn
4)	Hémalun	1 mn 30 sec
5)	Rincer à l'eau courante	10 mn
6)	Eosine	3 mn 30 sec
7)	Ethanol à 95%	2 bains d'1 mn
8)	Ethanol absolu	1 bain d'1 mn
9)	Xylène	2 bains de 15 mn
10)	Collage de la lamelle avec une goutte de résine Eukitt	

La composition des colorants est décrite en annexe.

Par sûreté, on réalise systématiquement 2 coupes pour chaque individu.

5.2 Hybridation *in situ*

5.2.1 Principe

L'hybridation *in situ* est utilisée pour repérer une séquence donnée d'ADN au sein d'une cellule. En effet, lorsqu'un ADN bicaténaire est chauffé à une température supérieure à la température dite de fusion, les deux brins de la molécule se séparent par suite de la rupture des liaisons hydrogènes (liaisons faibles) qui les maintiennent appariés. Si après séparation, l'ADN est refroidi dans des conditions de milieu favorables, une réassociation des brins est progressivement observée. Elle porte le nom d'hybridation.

On prépare alors une sonde constituée d'oligonucléotides spécifiques dont la séquence est celle recherchée (séquence spécifique de *Marteilia refringens* par exemple) et marquée à la digoxigénine. Elle est placée dans le tampon d'hybridation et s'hybride comme précédemment décrit sur la coupe avec les fragments d'ADN monocaténaires complémentaires. Celle-ci a été préalablement déparaffinée et soumise à une protéinase qui entraîne une lyse cellulaire et une destruction des protéines facilitant l'accès à l'ADN *in situ*.

La lame est également « préhybridée » avec le milieu d'hybridation c'est à dire le tampon seul mélangé à du t ARN de levure qui améliore la spécificité de l'hybridation à venir en saturant les sites responsables d'hybridation non spécifique.

La réassociation ne s'effectue qu'entre deux séquences strictement complémentaires, même s'il n'en existe qu'une parmi des milliards d'autres. Toute la puissance de certaines techniques utilisées en biologie moléculaire résulte de cette absolue spécificité.

5.2.2 Méthode

a. Préparation des sondes

Le gène codant pour la petite sous-unité ribosomale 18S 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*.

Des amorces (primers) choisies soit dans les zones conservées (amorces consensus : CS1, CS2 et CAS1), soit dans les zones spécifiques du parasite (amorces spécifiques : SS2, SAS2, SAS1) correspondent aux extrémités d'oligonucléotides dits conservés ou spécifiques. Ces amorces permettent donc d'amplifier par PCR (Polymerase Chain Reaction), un fragment de génome quelle que soit l'espèce considérée ou spécifiquement sur *Marteilia*.

C'est le principe de la méthode utilisée pour préparer les sondes spécifique et conservée, composées respectivement de l'oligonucléotide spécifique réalisé avec les amorces SS2-SAS1 et de l'oligonucléotide conservé. Il reste à y incorporer des nucléotides modifiés Digoxigénine-dUTP lors de la PCR. 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 d'hybridation.

b. Préparation des lames

C'est la même technique que pour l'histologie exceptée l'utilisation de lames de verre silanisées permettant une meilleure adhérence des tissus à la lame. De même, l'hybridation *in situ* peut se faire sur des coupes de 5 ou même 7 μ d'épaisseur, ce qui augmente la quantité d'ADN et donc renforce la réaction. Cependant, nous avons préféré l'épaisseur de 2 μ car elle autorise une meilleure observation des tissus environnant.

Dans un premier temps, un déparaffinage est effectué par deux bains de 5 mn de xylène et deux bains de 5 mn d'éthanol absolu. Les coupes sont ensuite séchées à l'air libre.

Il faut alors déposer sur les tissus de chaque lame 200 μ l d'une solution de protéinase K à 100 μ g/ml dans un tampon (50 mM Tris pH 7,4; 10 mM EDTA pH 8; 10 mM NaCl) le tout à incuber pendant une demi-heure à 37°C en chambre humide. Deux bains de 1 mn dans de l'éthanol 95% et 1 mn dans de l'éthanol absolu stoppent la protéinase K et déshydratent les tissus avant de faire sécher les lames à l'air libre.

c. Préhybridation et hybridation

500 μ l de milieu d'hybridation (tampon + 0,025 mg/ml t ARN de levures -> annexe) sont déposés sur chaque lame pour une incubation d'au moins 1 heure à 42°C. Le tampon d'hybridation est alors enlevé au mieux avec un papier absorbant et on dépose 1 μ l de sonde

marquée à la digoxigénine ajoutée à 50 µl de milieu d'hybridation sur une fenêtre d'incubation autocollante à installer sur la lame autour du tissu pour empêcher l'évaporation ultérieure du tampon.

Les ADN des tissus et de la sonde sont dénaturés par une exposition de 5 mn à 95°C puis l'ensemble est refroidi sur de la glace pendant 1 mn avant d'être incubé pendant une nuit à 42°C.

Le lendemain, les fenêtres et les tissus sont enlevées lavés par du SSC 2X (2 bains de 5 mn), puis par du SSC 0,4 X (10 mn à 42°C).

d. Détection

Le kit de détection de la Digoxigénine (Boehringer) fait intervenir plusieurs étapes. Après un bain en tampon DIG 1 (rinçage le SSC et équilibre le pH), sont déposés sur chaque lame 200 µl de tampon DIG 2 composé de DIG 1 et de 1 % « blocking reagent », saturant les sites susceptibles de réaction non spécifique avec les anticorps anti-digoxigénine, le tout pendant 30 mn à température ambiante.

Après un nouveau rinçage en DIG 1, 100 µL d'anticorps anti-digoxigénine dilués au 1/500ème dans du tampon DIG 2 sont déposés sur les coupes, à incuber pendant 1 heure à température ambiante.

Puis il faut effectuer deux lavages de 1 mn en tampon DIG 1 suivi d'un bain de 5 mn en tampon DIG 3 destiné à équilibrer le pH.

Le révélateur est alors préparé (20 µL de substrat NBT/BCIP fourni par le kit + 1 mL de DIG 3 pour 10 lames) et déposé (100 µL par lame) puis le tout est laissé à l'obscurité entre 10 mn et une nuit (1h30 à 2h00 pour la sonde *Marteilia*).

La réaction est ensuite bloquée par un lavage en tampon DIG 4 qui conserve les lames en attendant de les contre-colorer et de les monter.

e. Contre-coloration, montage et lecture

Le signal colorimétrique est difficile à distinguer dans une coloration classique Hémalun-éosine; il est préférable d'effectuer une contre-coloration légère, unicolore qui montre la structure globale du tissu tout en laissant bien ressortir les formes hybridées.

Après divers essais, il a été choisi le vert lumière dilué à 1% (= 1g/100mL) :

- | | |
|-------------------------------------|--------|
| 1) colorant | 5 sec |
| 2) eau additionnée d'acide acétique | 15 sec |
| 3) éthanol 95% | 15sec |
| 4) éthanol absolu | 15sec |
| 5) xylène | 15 sec |

Puis la lame est montée comme précédemment.

5.2.3 Contrôle des manipulations : les témoins

Pour la recherche spécifique de *Marteilia refringens* en hybridation *in situ*, il est nécessaire d'avoir des témoins pour valider chaque manipulation ; le choix des témoins dépend du résultat recherché. Il faut donc réaliser plusieurs coupes pour chaque bloc.

- Témoin positif de la spécificité de la sonde : coupe d'huître infestée.
- Témoin négatif de la spécificité de la sonde : coupe d'huître ou autre espèce non infestée (contrôlée en PCR), sonde spécifique d'une autre espèce qui ne doit pas hybrider (sonde *Bonamia* par exemple).
- Témoin positif de validation de la technique (fonctionnement du protocole et de la qualité des tissus analysés) : sonde consensus (à oligonucléotides conservés); tous les tissus hybrident, y compris *M. refringens*.
- Témoin négatif de la spécificité Digoxigénine/Anticorps anti-Dig : pas de sonde mais uniquement les anticorps couplés à l'enzyme puis le substrat; ce témoin permet de mettre en évidence un marquage immunologique aspécifique à l'origine de « bruit de fond ». Un autre témoin est également le substrat seul qui élimine la possibilité d'une réaction enzymatique endogène (phosphatases).
- Enfin, on réalise souvent la coupe sériée c'est à dire la coupe voisine de celle hybridée par la sonde spécifique, traitée en histologie, et qui permet de vérifier la nature des zones hybridées.

5.3 Lectures en microscopie photonique

5.3.1 Histologie

Les observations ont été faites aux grossissements 200, 400 et 1000. 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 l'éosine, colorant acide. La mise en œuvre de cette coloration est simple et reproductible. Cette technique ne permet qu'une différenciation limitée des structures. Toutefois, elle permet d'observer les éventuelles anomalies dans les structures tissulaires et cellulaires et notamment de mettre en évidence les différents stades de *Marteilia refringens*.

5.3.2 Hybridation *in situ*

Les zones d'hybridation, avec le substrat BCIP-NBT (kit Boehringer), apparaissent violettes/bleues, parfois noires si le signal est fort ou la révélation trop longue. L'ADN détecté ressort d'autant plus nettement que les tissus environnant n'ont été que légèrement colorés à l'aide d'une contre-coloration monochrome. La principale difficulté vient de l'existence d'accrochage non spécifique (voir discussion). Les tissus sont aussi en général abîmés par les bains successifs, la protéinase K et les hautes températures.

5.4 Quantification des différents stades de *M. refringens* dans les populations (n) et (n-1)

Cette étude complémentaire est intéressante à plusieurs niveaux :

La simple étude des prévalences c'est à dire « au moins un parasite ou non » ne décrit pas la notion d'intensité **parasitaire**, c'est à dire le nombre moyen de parasites par individu à un moment donné. Sans pouvoir véritablement aboutir à l'évaluation exacte du nombre de parasites par individu, cette quantification permet de comparer plus précisément les individus entre eux et les populations entre elles. Ainsi, nous n'étudions que les populations (n) et (n-1), suffisantes pour décrire la dynamique parasitaire de la transmission probable des (n-1) aux (n).

La quantification permet d'autre part de séparer la population parasitaire en plusieurs classes correspondant à différents stades de développement du parasite dans l'huître. L'analyse des proportions des stades observés nous donne beaucoup d'informations : la durée et la chronologie de la maturation du parasite, un rajeunissement de la population parasitaire (lié à une surinfection nouvelle ou une multiplication interne), un vieillissement de celle-ci...

Il a fallu trouver une méthode permettant de comparer objectivement les quantités de parasites observées (degré d'infestation) c'est à dire de compter les stades pour chaque classe. Il est bien entendu impossible de compter tous les parasites présents dans un individu; l'histologie (coloration classique hémalum-éosine) est la technique de routine la plus pratique pour avoir une approche quantitative du degré d'infestation de l'hôte. Nous avons choisi trois classes successives dans le temps faciles à distinguer en microscopie optique (grossissement 1000 à l'immersion).

- Classe 1 = « stades jeunes » : formes primaires à secondaires
- Classe 2 = « stades mûrs » : cellules tertiaires visibles à formes "prêtes à éclater"
- Classe 3 = « pansporoblastes » : pansporoblastes libres (après éclatement)

De même, on ne peut compter tous les parasites observés sur une lame (les animaux n'ont pas la même taille et ne sont pas coupés exactement au même endroit); dans un but d'homogénéité, nous choisissons de nous restreindre à la glande digestive.

Il a fallu ensuite définir un échantillon de surface c'est à dire une aire de comptage répétable sur chaque lame, facile à délimiter, représentative de l'organe infesté et choisie aléatoirement.

Après avoir éliminé comme unité de surface l'unité anatomique « diverticule digestif » (comptage sur 10 diverticules pris au hasard par exemple), nous avons choisi comme unité le **champ microscopique** (objectif 100) pris aléatoirement dans la glande digestive sur la lame.

Il a fallu également définir des critères d'acceptation d'une lame et d'un champ pour une meilleure homogénéité des aires de comptage. Ainsi, ont été éliminées les lames peu lisibles par manque de glande digestive visible ou par un défaut de conservation ou de coloration; et on n'ont été pris en compte que les champs situés dans des zones de diverticules et de canaux digestifs, représentatives de l'infestation d'un individu (nous avons éliminé

l'estomac dont l'aspect en histologie est très hétérogène en fonction des lames et des individus).

Restait à déterminer le nombre de champs par individu. Il a fallu pour cela comparer la variance entre individus et la variance entre champs (ANOVA) et calculer le nombre de champs nécessaire pour que la variance entre individus soit grande par rapport à la variance entre champs. Pour obtenir ces données, nous avons effectué alors un comptage sur 10 individus d'un même lot et 20 champs par individu. Il en a résulté que 1 champ par individu suffisait; pour plus de rigueur tout en restant dans les limites de la faisabilité, nous avons pris 5 champs par lame.

Le comptage se faisait à l'aide d'un compteur manuel. Les données étaient ensuite transférées sur EXCEL où ont été calculés le nombre moyen de jeunes stades, de stades mûrs et de pansporoblastes par champ dans un même échantillon de 30 individus (en pratique moins car certaines lames étaient illisibles).

5.5 Photo et numérisation

Les photos ont été prises à l'aide d'un appareil Olympus OM2, en utilisant un filtre LBD transformant la lumière artificielle du microscope en lumière naturelle. Nous avons utilisé des pellicules Kodac diapos 400 ASA.

Le microscope est également équipé d'une caméra numérique branchée à un ordinateur permettant de numériser, enregistrer puis d'imprimer ou d'envoyer par mail les images observées. Cependant, malgré le côté pratique et impressionnant du système, la définition et les couleurs restent largement inférieures à la photographie.

6. Prélèvement et observation de fèces d'*O. edulis*

Ces échantillonnages ont été faits ponctuellement au moment où les observations histologiques montraient une forte proportion de stades parasites mûrs et une libération apparente massive de pansporoblastes dans la lumière digestive. L'objectif était de déterminer la nature et la quantité approximative de formes parasites libérées.

6.1 Prélèvement

Deux méthodes ont été utilisées pour recueillir des fèces.

D'une part, les huîtres (n-1) infestées placées dans des bacs pour une manipulation d'infection expérimentale d'hôtes potentiels suspectés (Audemard, 1998) ont permis de recueillir régulièrement des fèces à l'aide d'une pipette Pasteur.

D'autre part, des fèces ont pu être récupérées directement dans les cavités palléales du lot d'huîtres plates (n-1) du 29/5/98 (n°7) dès l'ouverture de la coquille permettant d'obtenir des fèces pures (contrairement à la technique précédente). Les huîtres avaient été conservées vivantes 24h au réfrigérateur au préalable ce qui a pu augmenter la quantité de fèces

emprisonnées dans la cavité palléale, sachant que les bivalves ont besoin d'eau pour éliminer leur fèces (courant actif).

6.2 Traitement des fèces

Deux techniques ont été utilisées. En routine, les fèces sont observées à l'état frais en microscopie photonique donc sans coloration. Cette technique extrêmement simple a pour inconvénient de ne pas bien différencier les parasites présents noyés dans la masse de fèces; seules les grosses formes libres se distinguent. De plus elle ne permet pas une comparaison directe des formes parasitaires observées avec celles observées sur les coupes en histologie. Enfin, par définition, un état frais ne peut pas être conservé.

Nous avons donc traité des fèces en histologie (échantillon provenant des cavités palléales du lot n°7). Les fèces ont été recueillies dans un tube eppendorf de 2 ml avec de l'eau de mer puis centrifugées à faible vitesse (1000 t/mn) afin de ne pas séparer petits et gros parasites. Le surnageant a été éliminé et remplacé par du liquide de Davidson pour la fixation, le tout conservé ainsi plusieurs jours. Puis la déshydratation a été faite manuellement en suivant le protocole classique et en centrifugeant à faible vitesse entre chaque bain avant d'ôter la majeure partie du bain précédent à l'aide d'une micropipette.

Protocole manuel de déshydratation et d'inclusion en paraffine:

- 1) 2 bains d'éthanol 95 %
- 2) 2 bains d'éthanol 100% (Chaque bain dure 1h30 au minimum)
- 3) 2 bains de xylène

Le dernier bain de xylène est remplacé par de la paraffine en fusion (60°C) et le tube placé dans une étuve à 60°C une nuit durant. Enfin, le contenu du tube (paraffine + fèces) auquel on ajoute d'autre paraffine liquide est déposé dans un moule métallique. Les étapes suivantes sont les mêmes que décrit précédemment.

IV RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats

1.1 Etude de la cinétique de *M. refringens* dans les 3 populations d'*O. edulis*

1.1.1 Etude de la prévalence (figure 4)

- **(n-2)** : 90% à 100% des individus sont infestés de février à fin avril, date à laquelle les derniers individus ont été prélevés (fortes mortalités).
- **(n-1)** : elle varie entre 70 et 90% de février à début juillet; on observe un léger pic en avril et une augmentation dès fin juin jusqu'à atteindre 96% fin juillet.
- **(n)** : rien n'est observé jusqu'au 17/06 où les 1ères huîtres sont infectées à un taux de 20% environ puis ce taux est triplé en 1 mois.

Ces variations sont peu interprétables étant donné les intervalles de confiance. Ces résultats donnent un ordre de grandeur des prévalences selon l'âge de la population.

1.1.2 Etude de l'intensité parasitaire moyenne chez les (n) et les (n-1) (en parasites/champ)

a. Intensité parasitaire moyenne totale (figure 6)

Elle est obtenue en additionnant les moyennes de tous les stades.

- **(n-1)** : Il est observé une augmentation du 24/2 au 29/4; en 2 mois, l'intensité parasitaire est presque multipliée par 5 (pente = 0,2 parasite/j). Début mai, elle chute brutalement puis réaugmente. Début juillet, elle chute à nouveau puis remonte brusquement.
- **(n)** : l'infestation démarre le 17/6 et augmente également jusqu'à fin juillet. La vitesse d'infestation est exactement la même que celles observées chez les (n-1) au printemps, c'est à dire une pente de 0,2 parasite/j environ sur l'histogramme.

Les augmentations observées sont apparemment de type exponentiel.

b. Intensité parasitaire moyenne stade par stade (figure 7)

On différencie 3 classes : jeunes stades (J), stades mûrs (M) et pansporoblastes libres (P).

- (n-1) : Il y a une majorité de jeunes stades. En février, ils sont quasiment les seuls représentés, puis leur nombre augmente rapidement, puis chute début mai, stagne en mai-juin puis réaugmente fin juin.

On observe 2 périodes dans cette cinétique. L'augmentation rapide de mars à fin avril est majoritairement due aux stades jeunes; leur nombre est multiplié par 2,5 en 1 mois; on observe très peu de formes mûres en février-mars.

Puis en avril on peut voir des formes mûres et des pansporoblastes libres mais leur nombre reste constant. Par contre, on observe que le nombre de jeunes augmente seulement début avril c'est à dire en même temps que l'apparition des stades mûrs et des pansporoblastes. En avril, la chute affecte tous les stades, ce qui laisse penser à une mortalité massive des huîtres; cependant, en particulier, les stades mûrs et les pansporoblastes disparaissent quasiment totalement.

En mai-juin, le nombre de jeunes n'augmente pas tandis que le nombre de stades mûrs augmente significativement ainsi que les pansporoblastes

Puis début juillet, une nouvelle baisse du nombre de tous les stades est observée, suivie immédiatement d'une brusque augmentation de tous les stades et en particulier des formes mûres accompagnées d'une libération massive de pansporoblastes.

- (n) : le schéma est très proche de celui observé fin mars chez les (n-1) : une augmentation très importante des stades jeunes avec une hausse moins importante proportionnellement des stades plus mûrs et une production régulière de pansporoblastes. En 1 mois, le nombre de J est multiplié par 7.

Il y a donc un délai de 2 mois environ entre les premiers pansporoblastes libérés et les premières huîtres (n) infestées.

1.2 Etude du cycle de développement du parasite dans *O. edulis* (photos)

C'est l'aspect qualitatif du cycle parasitaire. Le développement individuel du parasite lui-même est très bien décrit dans plusieurs publications. C'est pourquoi nous préférons effectuer une synthèse des observations pour chaque échantillon ce qui nous donnera une vision plus large de la chronologie de l'évolution de *Marteilia refringens* dans son hôte.

1.2.1 Chronologie et description du développement de *Marteilia*

a. Population (n-1)

24/02	On observe uniquement des stades dits « jeunes » (figure 8) c'est à dire avec au maximum des cellules secondaires et seulement dans les épithéliums de la glande digestive (estomac, canaux, diverticules digestifs). Certaines formes présentent un cytoplasme beaucoup plus volumineux, avec peu de cellules secondaires visibles (2 ou 3) et un amas caractéristique de baguettes réfringentes (« baguettes protéiques »). Les tissus sont peu abîmés.
11/03	Les stades sont plus mûrs; quelques cellules tertiaires et granules réfringents apparaissent. Il y a une hyperplasie accompagnée d'une dégénérescence des

	<p>épithéliums infestés dont des fragments mêlés de parasites de tous stades se retrouvent dans la lumière des tubules.</p> <p>L'infestation de la glande digestive se répartit par lobules (groupe de diverticules lié un canal). La population parasitaire est très homogène au sein des diverticules d'un même lobule. Par contre, il y a une grande hétérogénéité de maturation et d'intensité parasitaire entre lobules voisins. Ce phénomène est particulièrement visible en hybridation <i>in situ</i> (coloration légère des tissus).</p>
01/04	<p>Il y a beaucoup de stades très mûrs (diamètre de 20 à 30μ), une enveloppe primaire renfermant des pansporoblastes (ex-cellule secondaires) bien différenciés, contenant des granules réfringents et des cellules tertiaires. Les stades mûrs sont essentiellement dans les diverticules digestifs (fig. 10) et un peu dans les canaux (fig. 11); ils n'existent pas dans l'estomac où ne se trouvent que des jeunes stades (au maximum 3 ou 4 cellules secondaires simples) alignés régulièrement le long de l'épithélium.</p> <p>Il y a parfois une grande densité de jeunes stades dans des replis très diverticulés de l'estomac et de canaux primaires. Certaines huîtres semblent déjà saturées de parasites. Des formes mûres éclatent, libérant les pansporoblastes dans la lumière des diverticules et des canaux (fig. 11) ainsi que les "baguettes protéiques" précédemment décrites. Certains pansporoblastes libérés ont une morphologie différente : plus petits, plus basophiles, sans granules réfringents.</p> <p>On retrouve dans la lumière intestinale (région rectale) de quelques individus une multitude de pansporoblastes libres et pour la plupart éclatés libérant cellules tertiaires et granules réfringents mélangés au contenu intestinal (fig. 12). Certains pansporoblastes, par contre, semblent rester dans l'épithélium des diverticules.</p>
15/04	<p>Deux phénomènes : 1/ de plus en plus de formes très mûres et éclatées; certaines lumières de diverticules et canaux sont remplies de pansporoblastes libérés à des stades de maturation variables au milieu de débris tissulaires.</p> <p>2/ une recrudescence de stades très jeunes, très petits (quelques μm), souvent basophiles, parfois libres, partout dans la glande digestive et en particulier dans l'épithélium de l'estomac et des canaux.</p> <p>De plus, les épithéliums des diverticules sont souvent délabrés, dentelés, amaigris.</p>
29/04	<p>Relargage massif de pansporoblastes et une grande proportion de jeunes stades. L'infestation (maturation et intensité parasitaire) est plus homogène dans une même glande digestive; la répartition par lobule est beaucoup moins visible.</p>
15/05	<p>Les tissus sont très délabrés, certaines huîtres moribondes. Beaucoup moins de parasites et peu de stades mûrs (sauf quelques individus).</p>
29/05	<p>Idem</p>
17/06	<p>A nouveau beaucoup de stades mûrs et une libération importante de pansporoblastes.</p>
03/07	<p>Les animaux sont en très mauvais état : épithéliums fins et délabrés, lumières remplies de cellules mortes. La majorité des individus sont peu parasités et il y a peu de stades mûrs excepté quelques animaux très sévèrement parasités (grande disparité d'infestation entre les individus).</p>

22/07	La plupart des individus sont fortement parasités; à la fois beaucoup de très jeunes stades et un relargage massif de pansporoblastes.
-------	--

b. Population (n-2)

L'évolution est similaire mais plus précoce. Ainsi, il y a déjà des cellules tertiaires fin février et les premiers pansporoblastes mûrs et libérés dès mi-mars. A partir de mars également, beaucoup d'huîtres sont moribondes et les tissus de la glande digestive délabrés. Fin avril (dernier échantillon), tous les individus sont sévèrement infestés et relarguent massivement des pansporoblastes.

c. Population (n)

24/02 à 29/05	Aucune forme de <i>M. refringens</i> n'a été clairement observée. Tous les doutes sur des possibles jeunes formes infestantes ont été contrôlés négativement en hybridation <i>in situ</i> .
17/06	<p>Apparition des premiers stades (fig. 8) : la plupart des huîtres infestées hébergent peu de parasites et ce sont uniquement des formes jeunes ou très jeunes (petites, rondes, parfois basophiles) , mais également des formes à grand cytoplasme et à baguettes protéiques. On observe peu de cellules secondaires. Ces premiers stades semblent infester uniquement la glande digestive (estomac, canaux, diverticules) et surtout de manière très localisée (quelques diverticules ou canaux). Elles sont peu enchâssées dans les épithéliums encore intègres.</p> <p>On observe quelques rares individus très parasités et porteurs de stades très mûrs libérant déjà des pansporoblastes.</p> <p>L'hybridation <i>in situ</i> révèle quelques formes parasitaires isolées dans les épithéliums de palpes ou de la bouche.</p> <p>Un individu a montré une infestation relativement importante au niveau des palpes (voir photo), sous forme d'amas de 2 ou 3 cellules parasitaires (jeunes stades ?) répartis à la base et au milieu des palpes. La coupe histologique ne comprenait cependant pas ces palpes. Enfin, aucun parasite n'a été observé ailleurs chez cet individu.</p> <p>Une hybridation est également visible au niveau des branchies mais le signal n'est pas net et semble plutôt dû à un « accrochage » aspécifique.</p>
03/07	<p>L' intensité parasitaire par individu est plus élevée.</p> <p>Certains individus portent uniquement des formes très jeunes de <i>M. refringens</i> tandis que d'autres sont parasités essentiellement par des formes mûres. La répartition et synchronisation par lobule est très nette. On observe comme chez les autres populations une différence de maturation flagrante entre les diverticules, les canaux et</p>

	<p>l'estomac (dans l'ordre décroissant). On observe en grande quantité des formes de <i>M. refringens</i> extrêmement petites (taille d'une cellule) qui pénètrent dans les épithéliums. On les voit fréquemment dans les replis stomacaux et les canaux primaires (structure divisée).</p> <p>L'hybridation <i>in situ</i> met de plus en évidence chez plusieurs individus quelques jeunes stades très localisés dans les épithéliums de la bouche (foyers de 5 à 6 parasites), des palpes (fig. 15) (jusqu'à 15-20 amas de 2 ou 3 cellules parasitaires sur un individu) et une forme repérée dans des branchies.</p>
22/07	Idem. Le profil de l'infestation rejoint celui des (n-1) en avril.

1.2.2 Etude des fèces (fig. 13)

Les états frais répétés ainsi que les coupes histologiques réalisées sur un échantillon de fèces issues du lot (n-1) du 29/05 ont montré la présence de pansporoblastes entiers dans ces fèces. Les quantités observées sont très variables suivant les échantillons.

1.3 Recherche d'hôtes intermédiaires par la présence du parasite dans d'autres espèces

Elle se résume à une analyse histologique des mollusques autres que *O. edulis* échantillonnés dans la claire et au cas de *Cereus pedunculatus*.

1.3.1 Etude de mollusques autres que les huîtres plates étudiées

Nom commun	Genre espèce	Nombre	Date	Résultat
Huître plate (de filières)	<i>O. edulis</i>	30	fév 98	-
Palourde	<i>Ruditapes decussatus</i>	30		-
"	"	1	29/05	-
Huître creuse	<i>Crassostrea gigas</i>	1	01/04	-
"	"	1	15/04	-
"	"	1	29/04	-
Moule	<i>Mytilus edulis</i>	1	15/04	-
"	"	2	29/04	-
Clam	<i>Scrobicularia plana</i>	30	29/04	-
Crépidule	<i>Crepidula fornicata</i>	1	29/04	-
Bec de jarre		1	29/04	-

Figure : Diagnostic histologique de *M. refringens* dans d'autres espèces de bivalves

1.3.2 Cas de *Cereus pedunculatus* (anémones)

Après l'obtention de résultats positifs en PCR spécifique sur des anémones échantillonnées en mai 97 (pas d'individus conservés en vue d'histologie), la recherche du parasite dans d'autres espèces (Audemard, 1998) a été focalisée sur cette espèce.

a. Détection par PCR

- Anémones des sédiments : des 90 anémones prélevées mensuellement de février à avril 1998, aucune n'a donné un résultat en PCR spécifique.
- Anémones fixées sur les huîtres : des 30 anémones prélevées le 7/05/98, toutes ont donné un résultat négatif en PCR spécifique. Le même type de prélèvement effectué le 20/05/98 sur 30 anémones a mis en évidence 22 résultats positifs.
- Anémones de bacs : sur 10 anémones analysées, 8 donnent un résultat positif en PCR spécifique.

Ces résultats positifs ont ensuite été validés par la confirmation que les fragments détectés appartenaient au génome de *Marteilia refringens*, par Southern blot avec la sonde SMART (hybridation des produits de la PCR), technique que nous ne détaillerons pas ici.

b. Détection en hybridation in situ et histologie (fig. 16 et 17)

◆ Infection expérimentale (anémones des bacs)

Un premier essai d'HIS avec la sonde *Marteilia* spécifique sur ces anémones détecte sur la plupart d'entre elles la présence de petites cellules qui hybrident différemment du bruit de fond (mis en évidence avec un témoin "sonde Bonamia"). Elles sont d'abord identifiées en histologie classique comme des petites cellules à cytoplasme très basophile dont le nombre, la taille et la répartition semblent correspondre aux formes hybridées.

Un deuxième essai permet d'obtenir des tissus bien mieux conservés. L'HIS, plus nette, permet de localiser précisément certaines formes hybridées : certaines sont unicellulaires, parfois en foyers, d'autres forment des ensembles pluricellulaires faisant penser à des pansporoblastes (taille, morphologie, nombre de cellules, présence de structures amorphes jaunâtres de la taille de granules réfringents). Ce ne sont pas les cellules basophiles observées lors de la première HIS.

La coupe sériée en histologie montre indiscutablement ces mêmes structures vues en HIS, inhabituelles dans l'anémone et parfaitement identiques aux pansporoblastes observés dans les fèces d'*O. edulis*. Elles sont le plus souvent dans les tentacules qui sont généralement repliés et internalisés, dans le tissu proprement dit, non loin du canal central de ces tentacules. Ces structures sont parfois entières, parfois disloquées, parfois éparpillées dans les tissus (cellules « tertiaires » roses et « granules réfringents » blancs jaunâtres). Une de ces structures est même retrouvée, isolée au sein de tissus dilacérés, seule et intègre, ressemblant en tous points aux pansporoblastes décrits chez les huîtres plates infestées. De même, on observe en

HIS et en histologie, un tentacule particulièrement « infesté » de bout en bout , contenant un grand nombre de pansporoblastes, cellules tertiaires et granules réfringents suspectés.

◆ Infection naturelle (anémones du 20/05)

De nombreuses HIS ont été réalisées mais la détection se heurte à un bruit de fond considérable due à un accrochage aspécifique de la sonde marquée à la digoxigénine et/ou des anticorps anti-digoxigénine.

L'hybridation est plus floue que celle observée en infection expérimentale et on ne retrouve pas en histologie les formes observées chez les anémones des bacs. De plus, on se heurte à nouveau à un problème de qualité médiocre des tissus après HIS ce qui ne facilite pas la lecture.

1.4 température (figure 18)

La température a rarement été en dessous de 12°C, qui a été observée comme étant la température minimale de développement du parasite.

Le seuil de 17°C, seuil thermique de l'infection par *Marteilia refringens* supposé par Grizel (1985) est atteint véritablement fin avril (sauf petite chute en dessous de 15°C).

A partir de mai, la température oscille globalement entre 20 et 25°C.

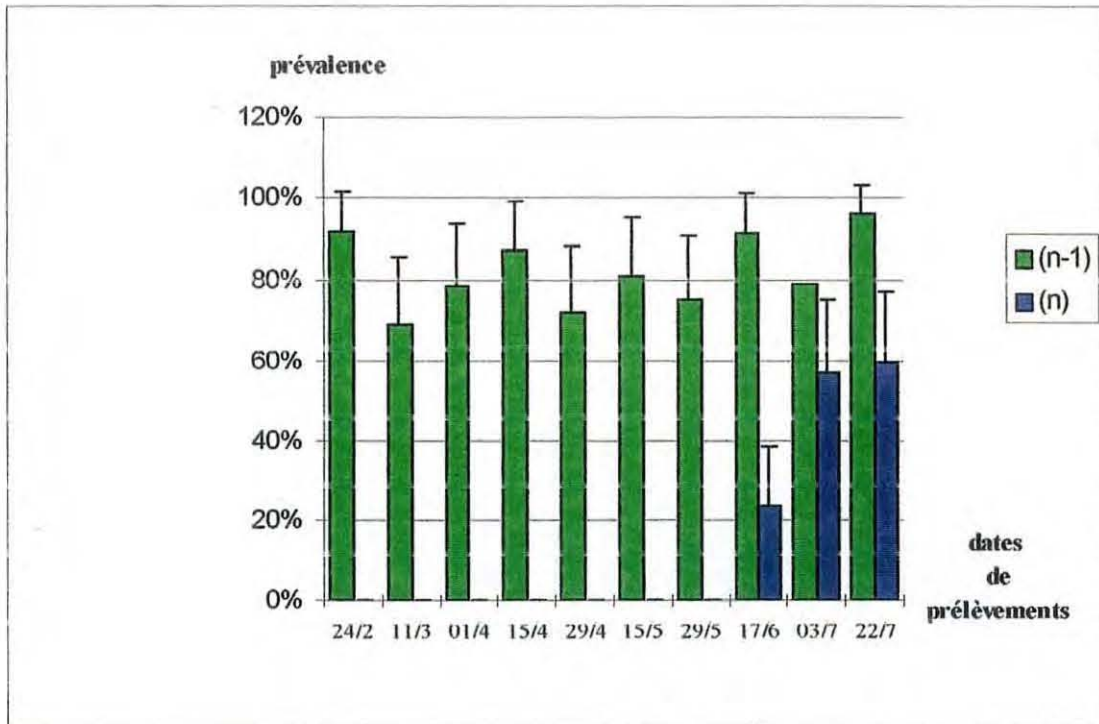


Figure 4 : Evolutions comparées des prévalences (%) de *Marteilia refringens* dans les populations d'*O. edulis* (n) et (n-1)

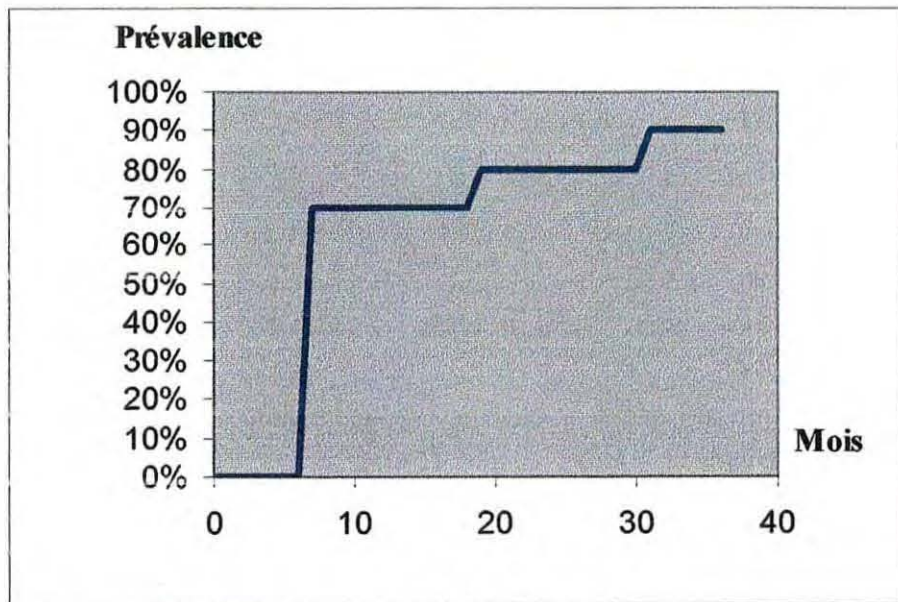


Figure 5 : Courbe théorique d'infestation d'une population d'huîtres plates par *M. refringens* pendant les trois premières années d'infection (prévalence en fonction du temps)

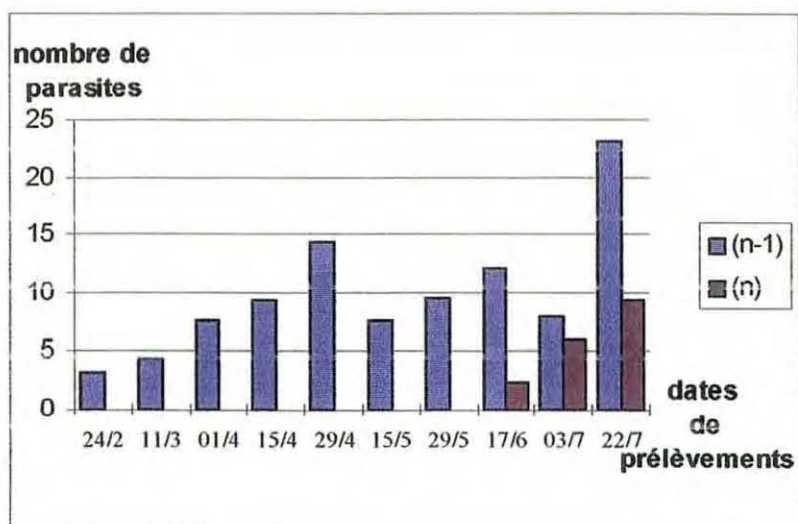


Figure 6 : Evolutions comparées du nombre total de parasites moyen par champ microscopique (*1000) dans les populations d'*O. edulis* (n) et (n-1)

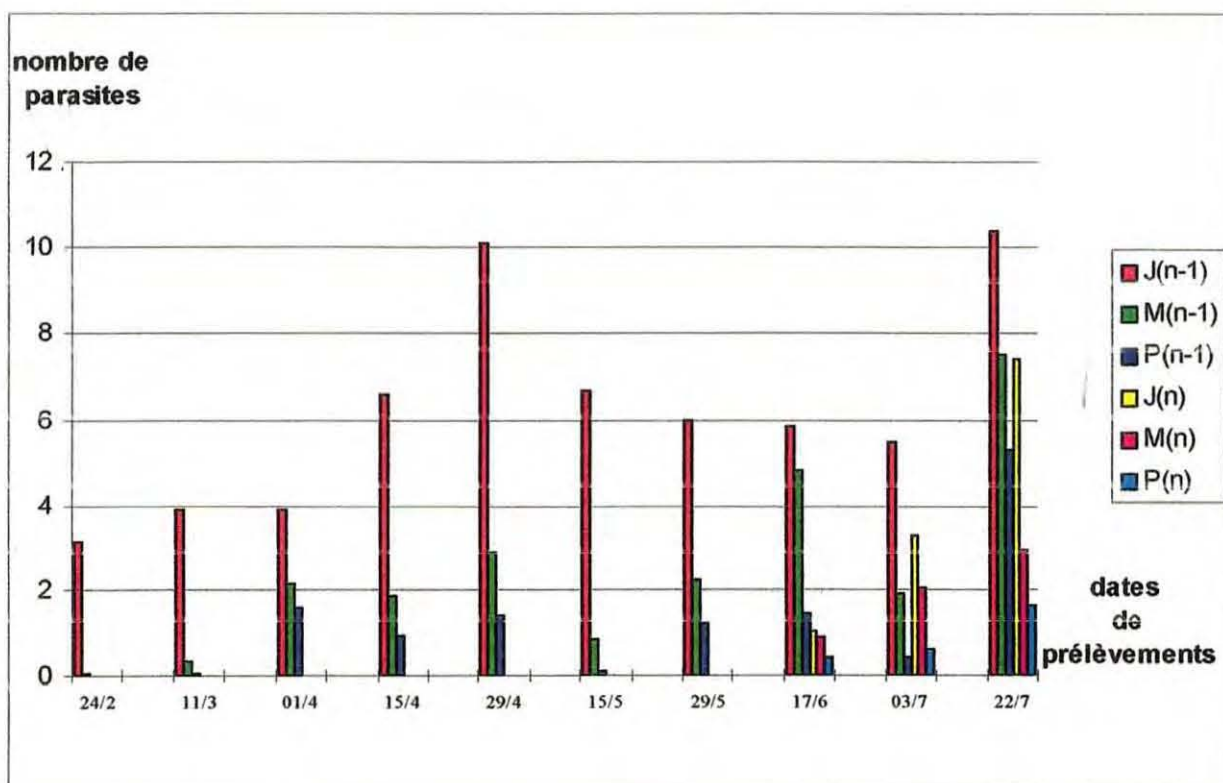


Figure 7 : Evolutions comparées du nombre de parasites *Marteilia refringens* (par champ microscopique *1000) dans les populations (n) et (n-1) d'*O. edulis* en distinguant les stades jeunes (J), les stades mûrs (M) et les pansporoblastes (P)

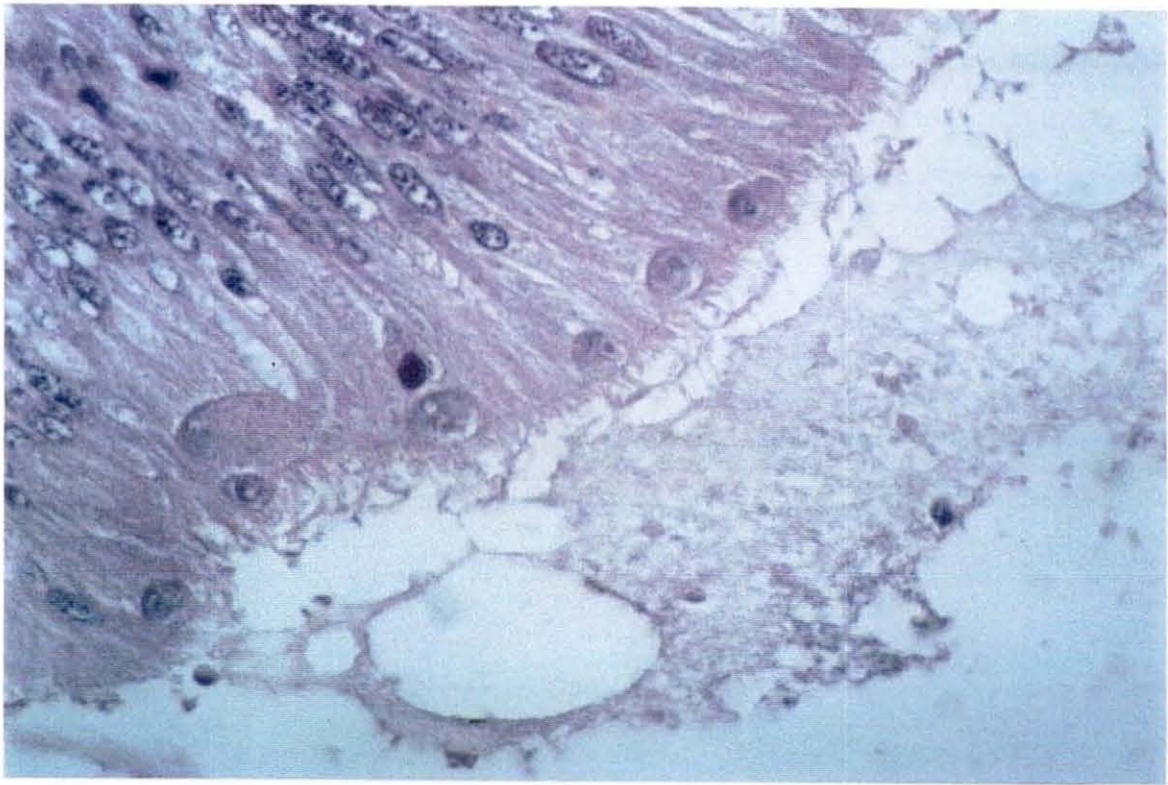


Figure 8 : Premiers stades de *Marteilia refringens* observés situés dans l'épithélium stomacal d'une huître plate *Ostrea edulis* (n) à peine infestée (Coloration hémalun éosine, X 1000)

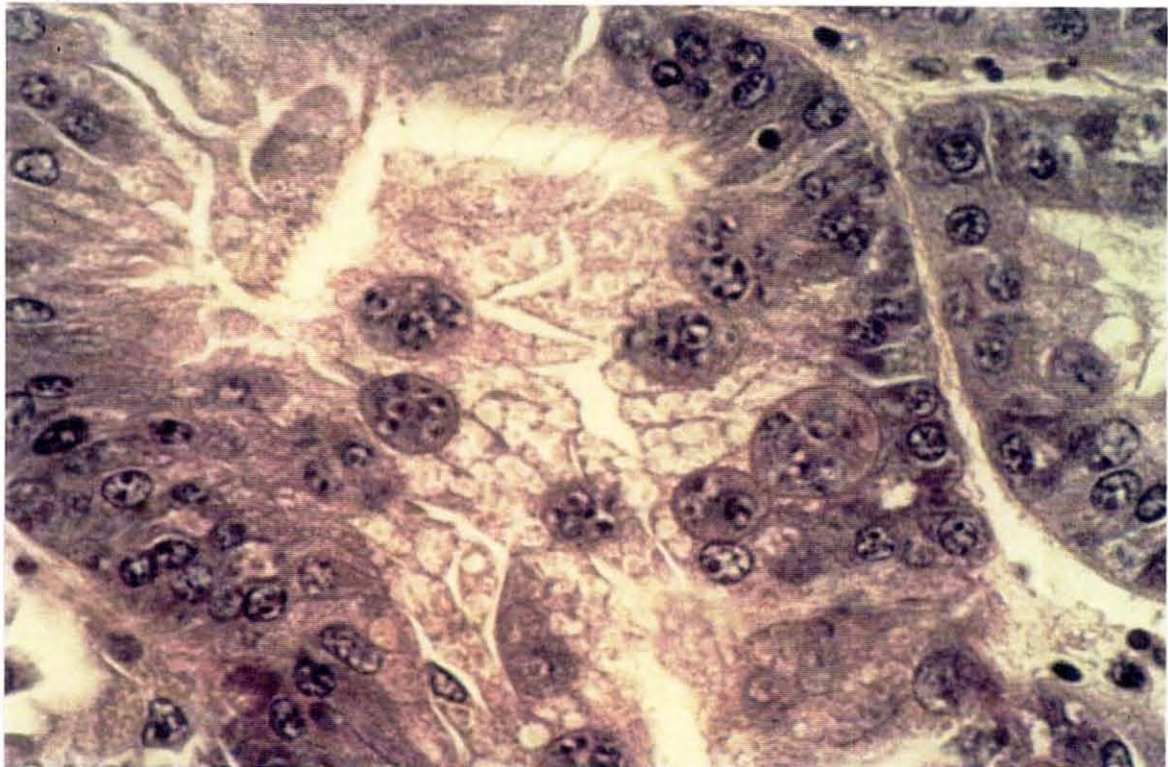


Figure 9 : Cellules primaires contenant plusieurs cellules secondaires et quelques cellules tertiaires situées dans un diverticule de la glande digestive d'*Ostrea edulis* (Coloration hémalun éosine, X 1000)

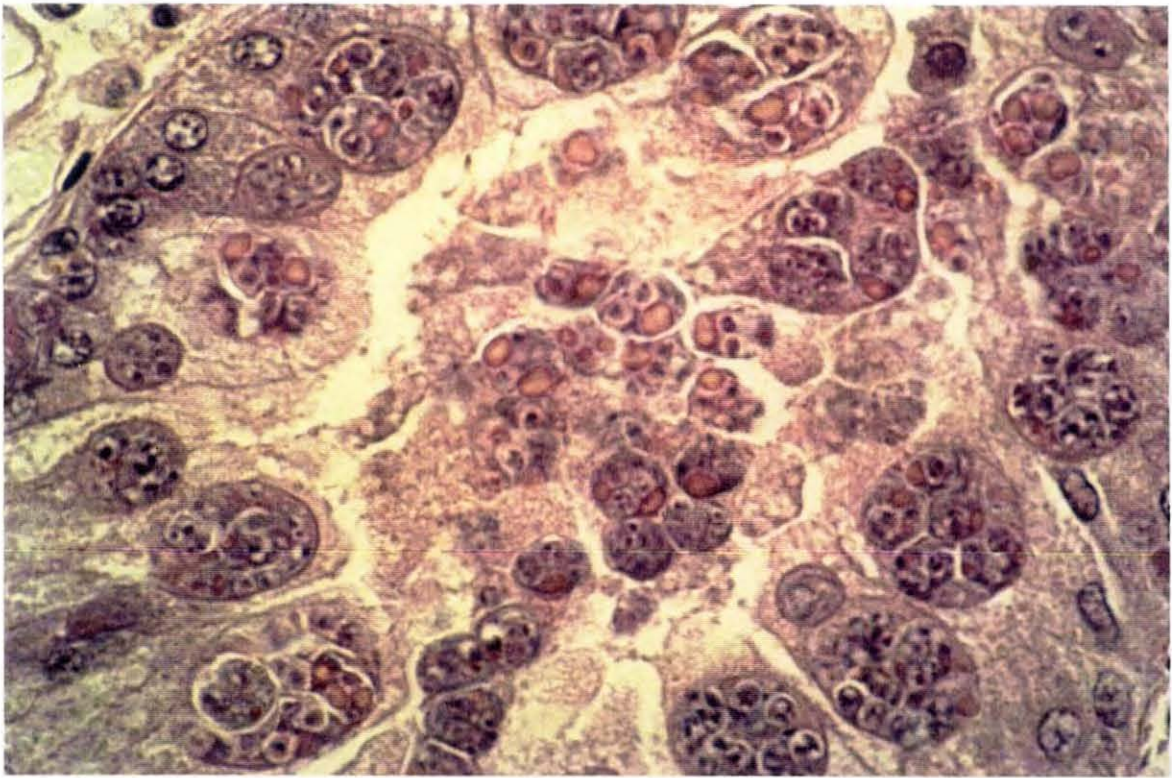


Figure 10: Stades mûrs ou « sporanges » et pansporoblastes libres respectivement dans l'épithélium et la lumière d'un diverticule de la glande digestive d'*Ostrea edulis* (Coloration hémalum éosine, X 1000)

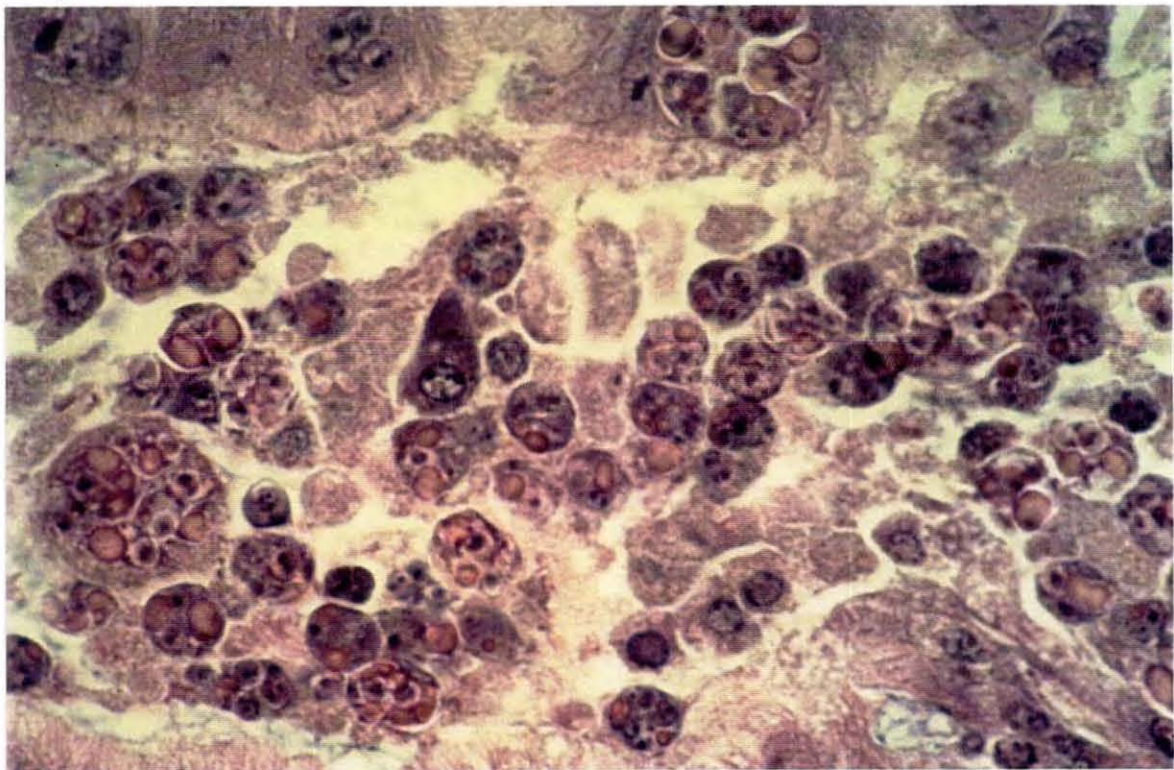


Figure 11 : Libération massive de pansporoblastes dans la lumière d'un canal de la glande digestive d'*Ostrea edulis* (Coloration hémalum éosine, X 1000)

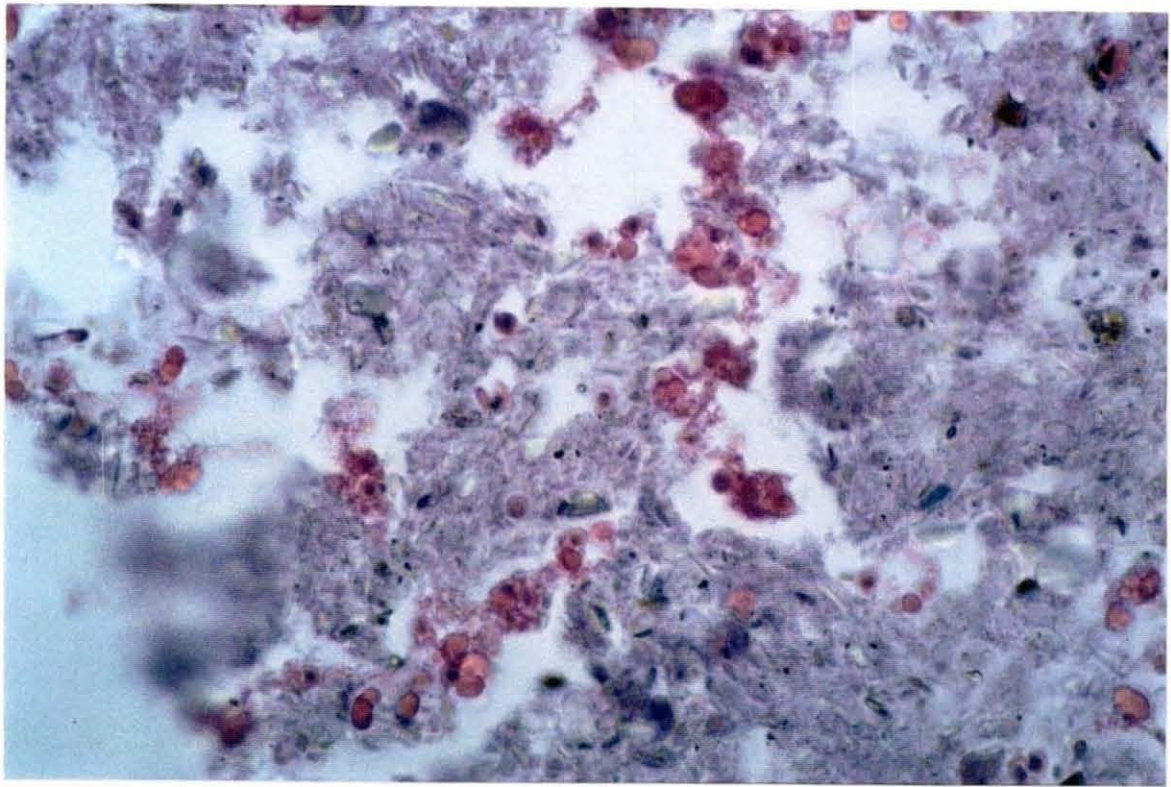


Figure 12: Libération massive de pansporoblastes « éclatés » (cellules tertiaires et granules réfringents) dans la lumière intestinale d'*Ostrea edulis* (Coloration hémalun éosine, X 1000)

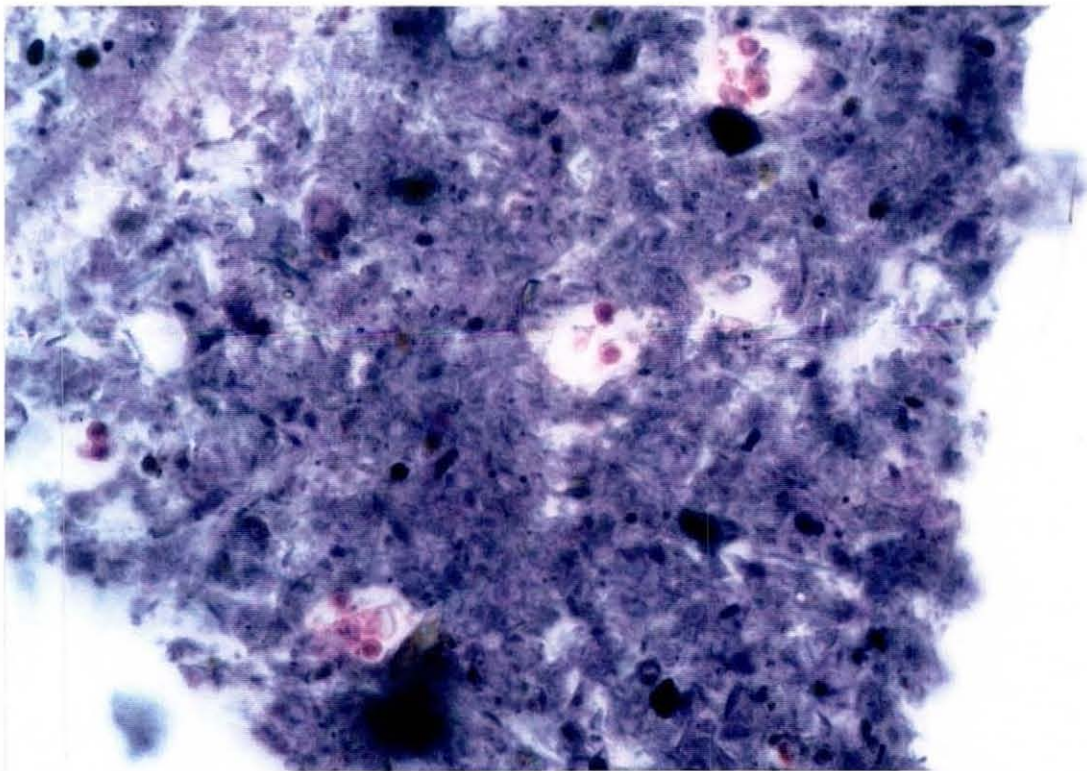


Figure 13: Présence de pansporoblastes entiers dans les fèces d'*Ostrea edulis* (Coloration hémalun éosine, X 1000)

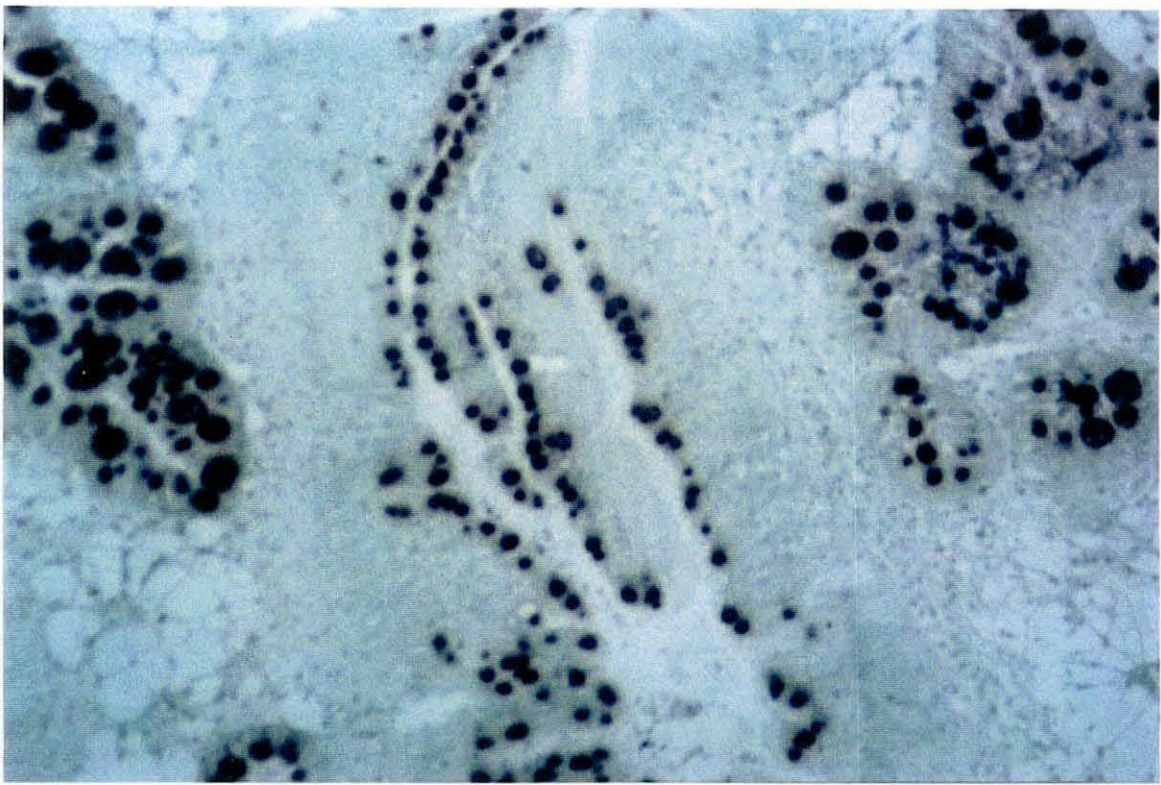


Figure 14: Détection de formes de *Marteilia refringens* en hybridation *in situ* dans la glande digestive d'*Ostrea edulis* (Contre-coloration au vert lumière 1%, X 400)

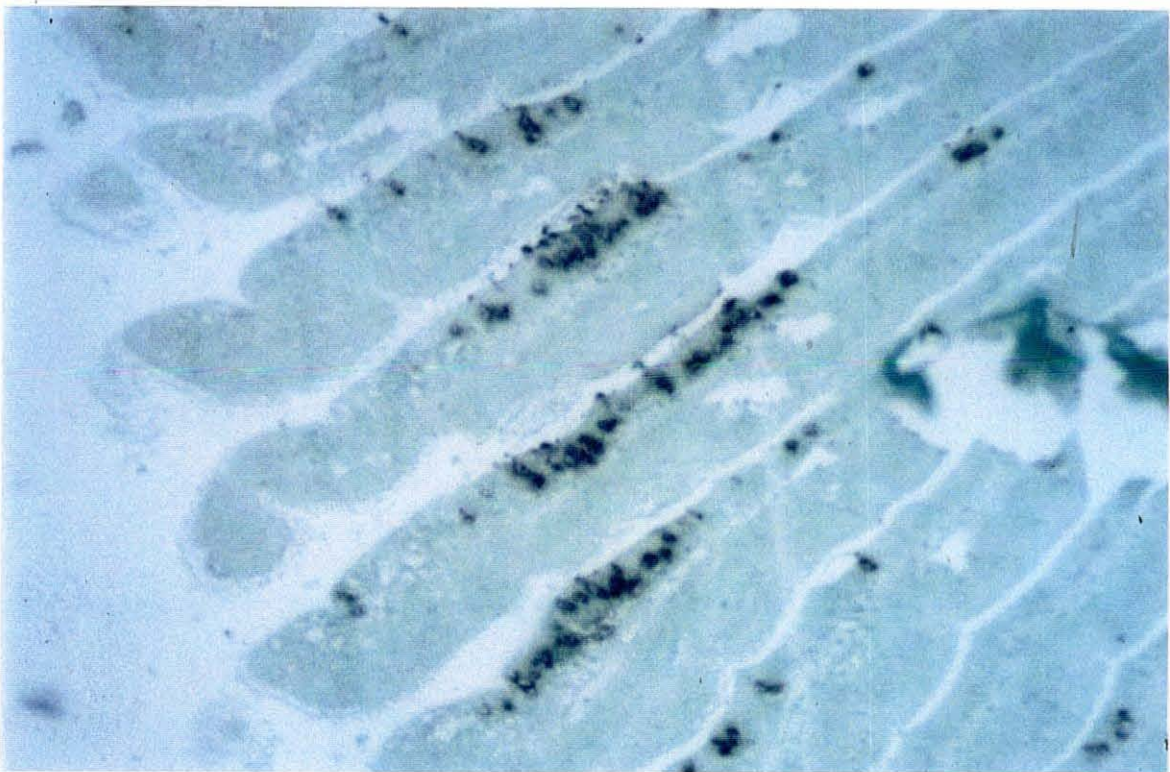


Figure 15: Détection de formes de *Marteilia refringens* en hybridation *in situ* dans les palpes d'*Ostrea edulis* (Contre-coloration au vert lumière 1%, X 200)

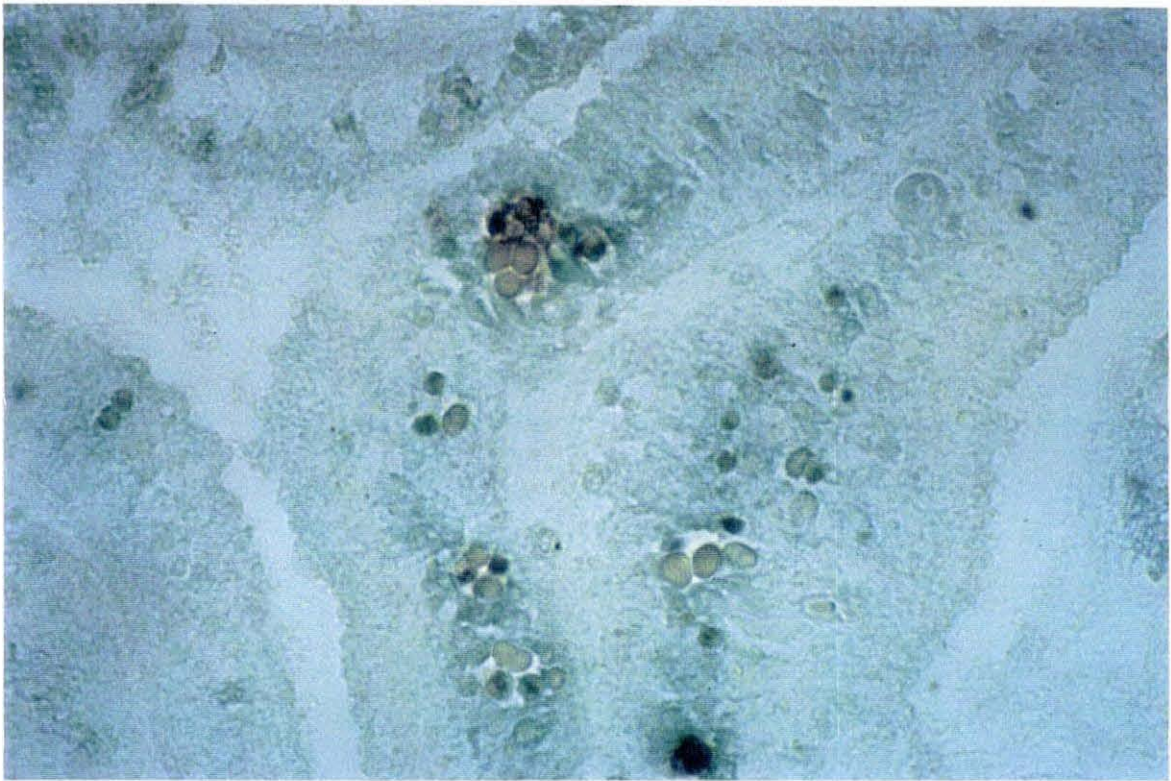


Figure 16 : Détection de formes de *Marteilia refringens* en hybridation *in situ* dans un tentacule de *Cereus pedunculatus* (Contre-coloration au vert lumière 1%, X 1000)

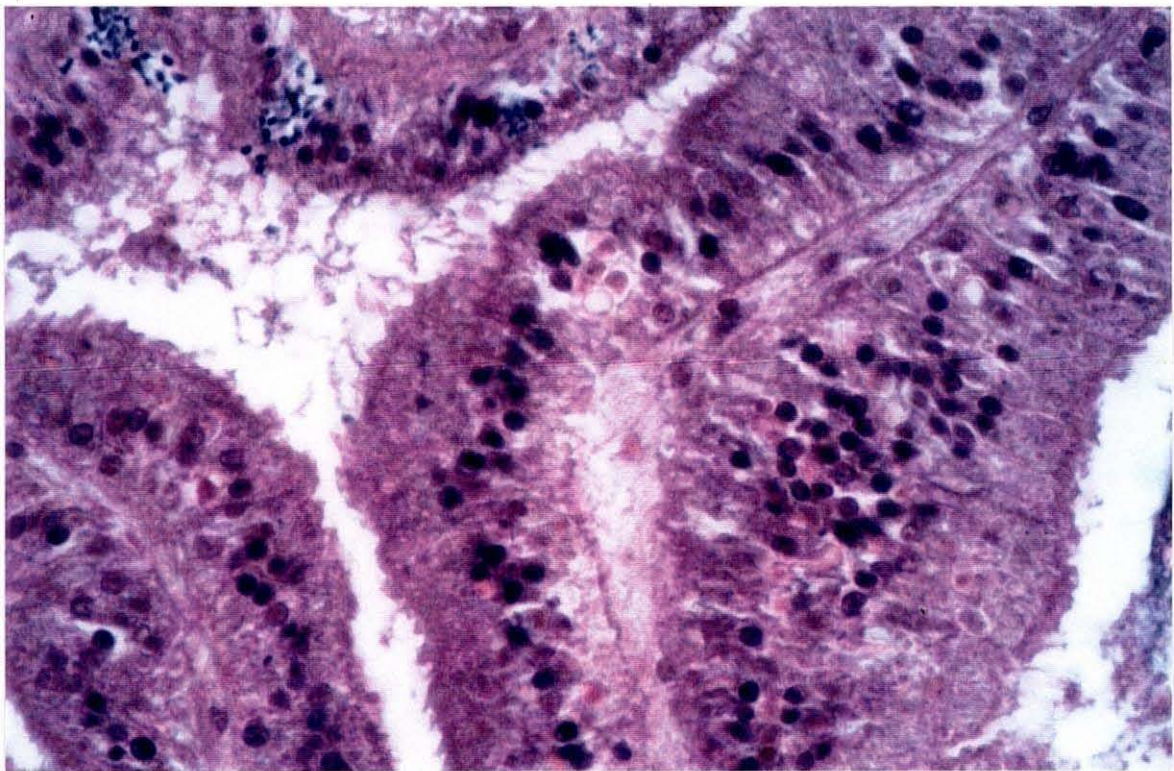


Figure 17 : Détection de formes de *Marteilia refringens* en histologie dans un tentacule de *Cereus pedunculatus* (Coloration hémalun éosine, X 1000)
(Coupe sériée de la figure)

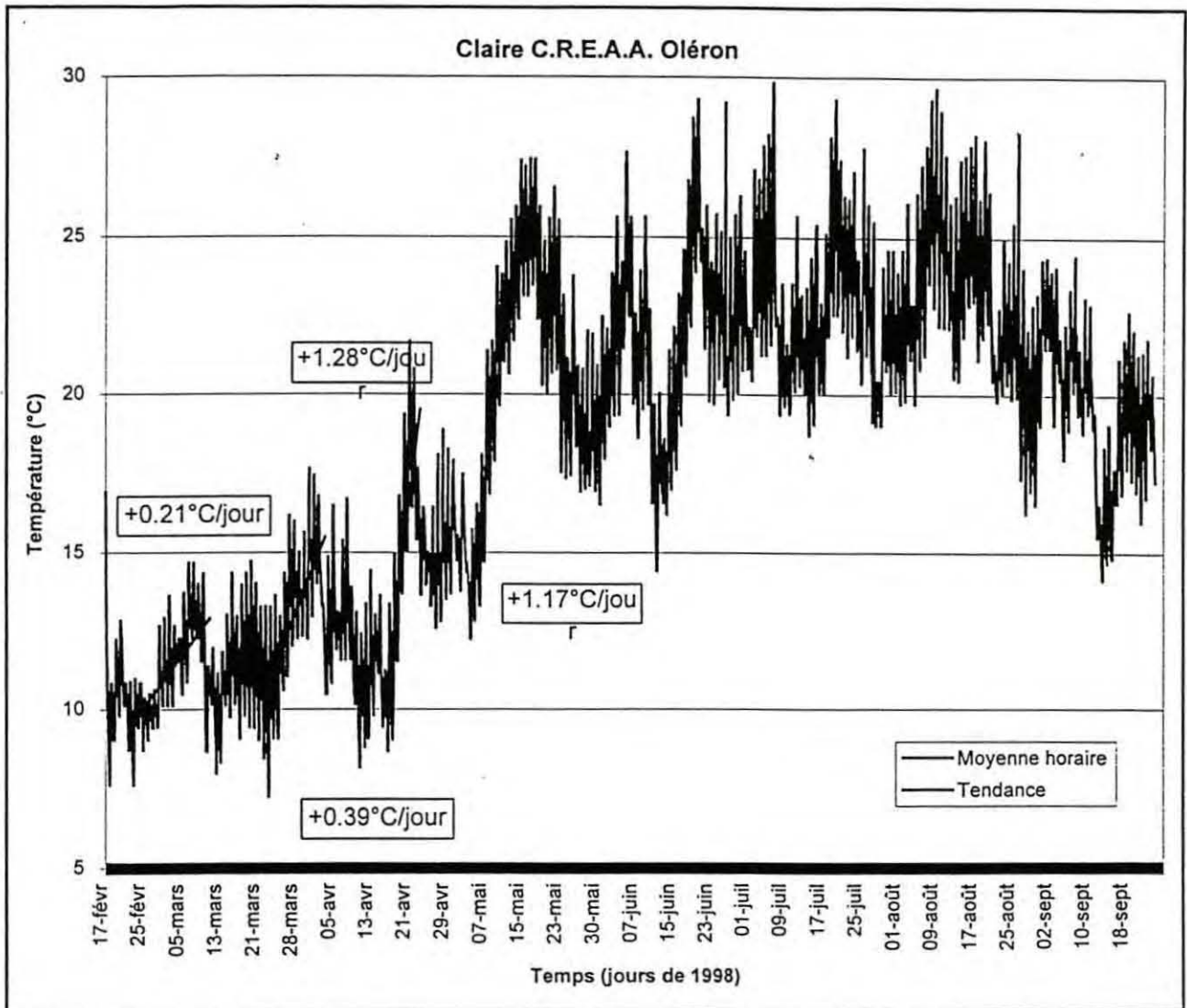


Figure 18 : Cycle thermique de l'eau de la claire du 17/02/98 au 18/09/98

2. Discussion

2.1 Nos résultats

Prévalence

En premier lieu, l'étude des prévalences montre un niveau d'infection très élevé dans les populations infectées dès le début de l'étude. En effet, elle varie entre 70 et 100% dans les populations anciennement infectées, et 60% au bout d'un mois pour la population nouvellement infectée. Cette zone est classée dans les zones dites "lourdement infectées" ou "à haut risque" du classement de Balouet *et al.*, (1979), qui qualifient ainsi les zones où le taux d'infection est supérieure à 40%, ce qui est encore peu par rapport à nos résultats.

Les données existantes sur les prévalences de *Marteilia refringens* sur nos côtes (Herrbach, 1971; Grizel, 1974) sont extrêmement variables, elles vont de 10 à 90% suivant les zones et les saisons.

Il apparaît également que plus une population est anciennement infestée, plus la prévalence est élevée ($n-2 > n-1 > n$). La marteiliose ne disparaît donc pas en hiver et conserve, semble-t-il, le "capital" cumulé des années précédentes.

Par ailleurs, on constate des variations, plus ou moins interprétables, du taux d'infection.

Chez les (n-1), il y a une chute de février à mars (-20%) qui peut être comparée à d'autres observations montrant une baisse de la prévalence durant l'hiver (Tigé *et al.*, 1979; Balouet *et al.*, 1979). Ceci est à comparer également aux expérimentations réalisées par Balouet *et al.* (1979) montrant une disparition totale des formes infectieuses dans un lot d'huîtres après 6 mois de stockage entre 6 et 11°C.

Toutefois, la disparition totale d'un parasite de son hôte dans ces conditions semble difficile à généraliser; une baisse de l'intensité parasitaire entraînant une non-détection du parasite par les techniques usuelles est peut-être plus probable, d'où l'intérêt d'outils de diagnostic plus sensibles.

Cette chute de la prévalence entre février et mars peut être également liée à une mortalité due au changement brutal de milieu (les huîtres ont été immergées dans la claire peu de temps auparavant) et touchant prioritairement les huîtres les plus faibles (donc, entre autres, les infectées).

Les variations constatées entre le 11/03 le 29/05 chez les (n-1) sont faibles pour être prises en compte et on peut considérer la prévalence comme quasiment constante. La chute modérée de prévalence observée chez les (n-1) en avril-mai peut être liée à un épisode de mortalité à cette période. Par contre, à partir de juin, l'augmentation chez les (n-1) est plus interprétable et doit être mise en parallèle avec l'infestation brutale et massive des (n) à cette même période. Ceci montre que l'âge des huîtres et/ou leur statut infectieux ne joue pas sur la période d'infection.

Tous les travaux montrent que l'infection se produit dans une fenêtre temporelle étroite située durant les mois d'été dans les eaux bretonnes (Tigé *et al.*, 1979; Balouet *et al.*, 1979). L'étude de Balouet *et al.* (1979) effectuée dans la rade de Brest peut être comparée aux résultats obtenus dans notre population (n-1); Balouet *et al.* ont observé une brusque

augmentation de la prévalence (13 à 40%) entre juin et juillet chez des huîtres déjà infestées après plusieurs mois relativement invariants. De son côté, Grizel (1985) a constaté un taux d'infection minimal en mars-avril et une augmentation de la prévalence en mai pour un maximum atteint dès juin ce qui concorde avec nos observations. De même, des huîtres saines placées dans ces zones infestées après cette courte période n'ont pas été contaminées (Balouet *et al.*, 1979).

D'autre part la prévalence observée au printemps est quasiment atteinte dès la fin juillet par la population plus jeune d'1 an. Il apparaît que l'infection d'une population se fait majoritairement la 1^{ère} année en 1 ou 2 mois et que le taux augmente peu par la suite. On peut donc avancer que la prévalence définitive est quasiment atteinte dès les premières semaines d'infection et n'augmente pas jusqu'à l'infection de l'année suivante.

La prévalence devrait donc en théorie être constante (sans tenir compte des mortalités et des faux-négatifs dus aux limites des techniques de diagnostic) durant l'année excepté durant ces quelques semaines où elle augmente. Le résultat serait alors une courbe théorique en escalier à trois marches (les huîtres plates survivent rarement plus de 3 ans au parasite) dont la première serait la plus grande (figure).

Le niveau d'infection largement supérieur de nos populations infectées explique l'aspect peu significatif de nos observations. Nous nous trouvons dans un milieu sursaturé en parasites (par rapport à l'estran), et ceci d'autant plus que l'eau de la claire n'est pas renouvelée. Les variations peuvent alors être "lissées" par la pression parasitaire particulièrement forte. Que seraient les résultats dans un milieu moins infestant qui est le cas général sur nos côtes ? Il faut souligner que cet inconvénient devient un avantage pour l'observation de l'infection des huîtres saines, spectaculaire dans cette étude. Il faut également souligner que les prévalences actuelles sont bien inférieures à celles observées durant les premières études réalisées au début de l'épizootie, en relation avec la disparition de l'hôte *O. edulis*.

Intensité parasitaire

Le suivi de l'intensité parasitaire a apporté plusieurs informations.

Chez les (n-1), elle augmente globalement de février à juillet (multipliée par 8). Il y a un pic important fin avril suivi brutalement d'une chute divisant par 2 l'intensité parasitaire individuelle moyenne; mais la croissance reprend aussitôt à la même vitesse.

Chez les (n-1), l'augmentation du nombre de parasite est très régulière mis à part un effondrement dans la 1^{ère} quinzaine de mai imputable à un épisode de mortalité par exemple (voir discussion et Berthe *et al.*, 1998). Il faut surtout remarquer le parallélisme entre la cinétique des (n) et les 2 épisodes de croissance observées chez les (n-1) : même ordre de grandeur, même vitesse de croissance; les courbes sont superposables.

Chez les (n), l'infection a lieu à partir de mi-juin (voir prévalences) et l'intensité parasitaire croît exactement à la même vitesse que chez les (n-1); la courbe est superposable à celle des (n-1) de février à avril.

Nous pouvons comparer cette étude à celle de Balouet *et al* (1979) qui effectuèrent une numération sur lames sur un lot d'huîtres saines placées en rade de Brest. Les premières

infections eurent lieu en juin également, l'intensité parasitaire grimpe rapidement à partir de juillet. Au printemps suivant (équivalent de nos (n-1)), la croissance reprend à partir de mars.

En différenciant les stades, il est possible d'établir des concordances nettes entre l'évolution de leur proportions respectives.

À la fin de l'hiver, la population est très jeune; puis apparaissent à partir de mars la maturation de nombreux jeunes en stades mûrs et la libération de pansporoblastes sans que le nombre de jeunes stades diminue. Au contraire, ce nombre, jusqu'alors stagnant, augmente avec un léger décalage par rapport aux stades mûrs, aboutissant au pic d'avril. Ces observations concordent avec celles de Balouet *et al.* (1979).

Cet afflux de jeunes stades peut avoir deux origines : extérieure (surinfestation) ou intérieure (multiplication dans l'hôte). Or les (n), qui à cette période ne sont pas infestées, constituent d'excellents témoins pour la première solution (sauf sensibilité plus précoce des (n-1), ce qui est peu probable). Nous démontrons ainsi ce que certains auteurs présentent comme une « schizogonie » (Franc, 1980; Grizel, 1985) et que nous nous contenterons d'appeler "multiplication du parasite dans l'hôte".

La chute en mai concerne tous les stades simultanément (pentes parallèles), ce qui peut aisément être attribué à une mortalité massive. L'hôte atteint alors son seuil de résistance au parasite dont la quantité augmente jour après jour. Ceci concorde également avec l'augmentation de la température en relation avec le degré d'infection (Berthe *et al.*, 1998) (figure 20).

Puis de mai à juin, chez les (n-1), la maturation s'accélère, le nombre de jeunes restant à peu près constant. À partir de mi-juin, le nombre de stades jeunes remonte soudainement, ce qui peut être lié à deux facteurs superposés: la multiplication interne à laquelle s'ajoute l'infestation d'origine exogène dont la part est facilement visualisée par l'intensité parasitaire des (n) à cette période.

Il faut noter d'autre part le parallélisme entre le profil de la courbe d'infestation des (n) en juin-juillet et celui des (n-1) en mars-avril; la dynamique du parasite est la même c'est à dire qu'il y a au début seulement un petit groupe de stades jeunes (pour les uns venant de l'extérieur; pour les autres, de l'année précédente) qui mûrissent, multiplication... Le phénomène de multiplication interne est très visible chez les (n) entre le 3/07 et le 22/07; la proportion de jeunes d'origine exogène est alors certainement minimale puisque la prévalence chez les (n) à cette période n'évolue pas. L'infestation est donc caractérisée par un apport ponctuel de stades jeunes.

Enfin, cette étude semi-quantitative montre qu'il y a depuis avril une production quasi constante de pansporoblastes dont la quantité réelle est sans doute sous-estimée, puisque beaucoup sont libérés dans le milieu extérieur.

Cependant certains arguments favorisent l'idée d'un relargage cyclique des pansporoblastes, qui surviendrait à un moment précis lorsque certaines conditions sont réunies. En effet, la présence de pansporoblastes dans les fèces et le contenu intestinal est très variable, et tient plus précisément du « tout ou rien ». Ainsi, seuls de rares individus ont présenté des pansporoblastes dans la lumière intestinale, mais à chaque fois en quantités massives (figure 12); ces observations confirment d'ailleurs celles de Grizel *et al.* (1974).

Le pansporoblaste est la seule forme (démontrée) de *Marteilia* qui soit libérée; il serait donc responsable de la dissémination du parasite. Il s'écoule 2 mois entre les premiers

pansporoblastes libérés et l'infestation des jeunes huîtres, ce qui était l'hypothèse d'un hôte intermédiaire mais n'exclue en aucun cas l'hypothèse d'une transmission directe puisqu'il résisterait plusieurs mois (Berthe et *al.*, 1998). Il lui faudrait dans ce dernier cas également la coïncidence de plusieurs conditions pour devenir infestant mais ces conditions seraient alors difficiles à obtenir expérimentalement car toutes les transmissions directes expérimentales ont échoué (Balouet et *al.*, 1979; Van Banning, 1979; Grizel, 1985; Lester, 1986; Berthe et *al.*, 1998).

Il faudrait également une étape permettant le passage de la forme de pansporoblaste à la forme infestante (forme jeune).

Etude qualitative

L'étude qualitative du développement de *Marteilia* dans l'huître peut également informer sur le rôle joué par les différents stades du parasite dans son cycle.

Il apparaît en premier lieu que l'infestation d'une huître saine touche la glande digestive dans son ensemble dès le début, contrairement à certaines observations antérieures décrivant une infestation progressive de l'estomac (la bouche ou les branchies parfois) vers les diverticules digestifs (cycle proposé par Grizel et *al.*, 1974). Ces derniers avaient observé que les épithéliums stomacaux et buccaux n'abritaient que des jeunes stades alors qu'on observait des stades mûrs dans les diverticules. Ces jeunes stades auraient d'autre part une forme différente de ceux observés dans les diverticules (Grizel et *al.*, 1974).

Nos observations montrent plutôt que ces jeunes stades infestants colonisent autant les diverticules que l'estomac dans les premiers jours d'infestation; cette hypothèse concorde avec l'anatomie et la physiologie de la glande digestive des bivalves.

En effet, cet organe creux est un diverticule de l'estomac (autrement dit un cul de sac ouvert sur l'estomac) directement en communication avec ce dernier par un flux à double sens (figure 22) (Grassé, 1960); ce mécanisme pourrait alors expliquer une invasion quasi simultanée de l'estomac et de la glande digestive.

Mais le parasite n'infeste pas la totalité de la glande digestive dès le début. C'est un organe très ramifié. Il y a une répartition et même une synchronisation par lobule (ensemble de diverticules liés au même canal secondaire) des stades de *Marteilia refringens*. Ce phénomène est surtout visible chez les (n) et les (n-1) peu infestées au printemps. La répartition tend à s'homogénéiser dans le temps. Ceci montre que l'infestation touche d'abord quelques lobules (sans doute à plusieurs reprises) et qu'elle s'étend ensuite de ces foyers primaires aux autres lobules (après multiplication), phénomène facilement expliqué par le flux à double sens caractérisant le fonctionnement de la glande digestive.

L'absence de stades mûrs dans les épithéliums des palpes, de la bouche ou de l'estomac semble plutôt due à l'inadaptation du parasite à évoluer dans ces tissus. La forme infestante peut plus ou moins s'y implanter mais ne peut pas s'y développer et n'évolue pas. Leur localisation dans ces différents épithéliums témoignerait par contre de la voie d'infestation utilisée. Le cas des canaux digestifs (primaires et secondaires) semble

intermédiaire. Seuls les diverticules digestifs d'*Ostrea edulis* sont réellement adaptés à *Marteilia refringens*.

Ceci nous amène à discuter le cas d'individus (n-1) « attardés » sur le plan parasitaire, c'est à dire infestés uniquement avec des stades jeunes (partout), alors que le reste de la population abrite des formes très évoluées et que les (n) ne sont pas infestées (témoins d'infestation exogène). Sachant que le développement de *Marteilia* est thermo-dépendant (Balouet et al., 1979; Berthe et al., 1998) et que par conséquent, l'évolution dans une population devrait être synchrone, nous pouvons postuler des différences de sensibilité au parasite entre les individus.

Cycle de développement

Nos observations sur l'évolution morphologique du parasite confirme globalement les études antérieures : maturation par divisions endogènes successives et libération de pansporoblastes contenant les cellules tertiaires constituées chacune de 3 sporoplasmes emboîtés; cette évolution prenant place dans l'épithélium des diverticules digestifs qui se délabre progressivement (Robledo and Figueras, 1995; Alderman, 1979).

En revanche, nous n'avons pas retrouvé toutes les étapes et tous les stades des cycles proposés par Franc (1980) et Grizel (1985).

Ainsi, selon eux, le premier stade du parasite est représenté par une cellule primaire simple, uninucléée. Ce stade serait à la fois la forme infestante et la forme libérée lors de la « schizogonie », c'est à dire la multiplication de cellules secondaires dans l'enveloppe primaire suivie de leur libération après éclatement de cette dernière (reproduction asexuée). Nous n'avons jamais pu constater l'existence, lors de nos observations, ni de ce stade uninucléé, ni de cette libération de cellules secondaires simples, directement inspirés des cycles de certains sporozoaires, comme le témoignent les termes de « plasmode » ou de « schizogonie ».

Le stade initial semble plutôt constitué d'une cellule primaire contenant déjà au moins une cellule secondaire; cette dernière ne serait pas toujours visible dans le plan de coupe étant donné sa petite taille, ce qui rejoint l'hypothèse de Perkins (1988).

Il n'y a pas de « schizogonie » proprement dite; les cellules secondaires simples dans les stades jeunes ne sont pas libérées mais évoluent en pansporoblastes qui sont les seules formes libérées après éclatement de l'enveloppe primaire: c'est donc une « sporogonie ».

D'autre part, nous n'avons jamais observé de « conjugaison » ou « fusion », telle que Franc (1980) et Grizel (1985) l'ont décrite, ni différencié de « lignées II ou III », actrices d'une reproduction dite sexuée du parasite dans l'huître.

Il apparaît donc, selon notre hypothèse, que la sporogonie est le seul mode de multiplication observé dans l'huître. Plusieurs questions se posent alors:

1. Cette sporogonie peut-elle avoir la double fonction de multiplication interne et de dissémination?

2. Comment se fait la transition entre les pansporoblastes et les formes jeunes issues de cette multiplication ?

Un pansporoblaste contient 4 cellules tertiaires (assimilées à des spores), chacune étant formée de 3 sporoplasmes uninucléés emboîtés les uns dans les autres. Perkins (1988) a postulé, en se basant sur des critères ultrastructuraux, que le sporoplasme extérieur dégénérait et que les 2 autres devenaient alors cellule primaire et secondaire complémentaire fonctionnelles pour une infestation.

Les cellules tertiaires du pansporoblaste pourraient-elles alors réinfester l'huître sur place? Ainsi, on observe des pansporoblastes seuls plus ou moins intégrés dans les diverticules, dont certains sont éclatés libérant les cellules tertiaires; de même, la plupart des pansporoblastes observés dans la lumière intestinale sont éclatés eux aussi. Il se trouve de plus que les cellules tertiaires ont la même taille (4-5 μm) et le même aspect que les plus petits stades jeunes observés.

Il est envisageable que ce sont les cellules tertiaires libérées qui réinfestent l'individu malade mais qu'elles ne résistent pas dans le milieu extérieur, et que la forme disséminée est le pansporoblaste entier et démontré résistant dans le milieu extérieur (Berthe et *al.*, 1998).

Une autre observation s'ajoute enfin: les pansporoblastes ne semblent pas tous libérés au même stade de maturation; beaucoup ne contiennent pas de granules réfringents, sont plus petits et possèdent un cytoplasme plus basophile. D'où une autre hypothèse basée sur deux types de pansporoblastes destinés respectivement à la dissémination (forme de résistance avec granules réfringents) et à la réinfestation interne (formes plus petites sans granule réfringent).

Mais ces hypothèses sont loin d'être vérifiées et nous font parvenir aux limites de la microscopie photonique. Elles se heurtent d'autre part aux résultats des expériences antérieures de transmission directe (Lester, 1986; Berthe et *al.*, 1998).

- Pourquoi les injections de parasites n'infestent pas les huîtres saines? Faut-il des conditions particulières du milieu extérieur?

- Enfin, que deviennent les pansporoblastes libérés dans le milieu extérieur?

Cereus pedunculatus

Des formes de *Marteilia* ont été détectées puis observées dans les anémones placées dans des bacs avec des huîtres infectées. L'enchaînement des étapes de détection puis de validation ont permis *in fine* d'observer le parasite au sein des tissus de l'hôte. Dans un souci de rigueur scientifique, il faut maintenant confirmer ce résultat en microscopie électronique et sur le terrain.

La comparaison des pansporoblastes observés dans les anémones avec ceux visibles sur les coupes histologiques de fèces d'huîtres infectées permet de croire que ces anémones ont été contaminées à partir des huîtres malades.

Les pansporoblastes ont été observés entiers pour certains, d'autres étaient éclatés (sans savoir si cette dernière observation était un artefact ou pas) libérant cellules tertiaires et granules réfringents dans les tissus de l'anémone.

C'est un résultat nouveau. 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).

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.

Ces résultats permettent de considérer *C. pedunculatus* comme un hôte potentiel de *M. refringens*. Cette espèce est de plus observée dans des biotopes similaires à ceux d'*Ostrea edulis*. Cependant, sa large répartition géographique ne pourrait pas sans doute 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.

Une première validation consiste à séquencer entièrement le gène amplifié en PCR afin de déterminer si le parasite mis en évidence est bien *Marteilia refringens* et non pas une espèce voisine.

Enfin, *Cereus pedunculatus* doit être régulièrement échantillonnée afin de suivre une éventuelle évolution des formes du parasite (les cellules tertiaires ou « spores ». La première question est de savoir si la pénétration du parasite dans l'anémone est active ou passive (phagocytose); Ce suivi permettra de préciser si cette anémone est une impasse (cul-de-sac épidémiologique) pour *Marteilia refringens* ou bien si elle est un hôte alternatif (même position qu'*Ostrea edulis* dans le cycle) ou fonctionnel (position différente, avec des stades différents).

Si cette dernière hypothèse se vérifie, 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 sont infectées au cours du mois de mai c'est à dire lorsque *Marteilia refringens* est déjà libéré dans le milieu depuis 2 mois sous la formes de pansporoblastes. Il semble donc probable que la transmission se réalise de l'huître plate vers l'anémone, mais cela n'exclue pas l'intervention d'autres hôtes. En effet, *Cereus* peut se mouvoir d'un substrat à un autre (Reymond, 1991) mais ce type de déplacement reste occasionnel et de faible importance. Or, un cycle parasitaire nécessite en général une phase de dispersion c'est à dire l'intervention d'un hôte mobile ou d'une phase libre (Combes, 1995).

Relation température/infestation

Aucun des seuils thermiques évoqués par certains auteurs (Grizel, 1985) n'a réellement pu être mis en évidence. La multiplication interne chez les (n-1) semble concorder avec une hausse rapide de la température (deuxième quinzaine d'avril : + 1.28°C/jour). Enfin, l'infection des (n) apparaît alors que la température est stabilisée entre 20 et 25°C depuis 1 mois et demi.

2.2 Intérêts et limites des techniques et méthodes utilisées

Site d'étude et populations étudiées

La claire ostréicole s'est révélée un très bon site d'étude par sa facilité d'accès et de suivi des paramètres. Cependant, des biais ont pu s'introduire dans notre étude.

Ainsi les poches d'huîtres étaient généralement posées à plat sur le fond, libres, les huîtres plus ou moins enfouies dans la vase. Mais une importante prolifération d'algues sur les poches associée à leur faible poids (trop petite quantité d'huître par poche) a fait remonter vers la surface certaines d'entre elles. Les différences importantes de ressources en nourriture ou en oxygène ont pu biaiser l'homogénéité des échantillons.

La stratégie d'échantillonnage

La taille théorique des échantillons (30) n'a pas toujours pu être respectée pour cause d'huîtres mortes ou mal conservées ou de coupes ne contenant pas de glande digestive.

D'autre part, la mise au point d'une technique de quantification sur lame histologique n'a pas été aisée. En effet, il fallait une technique la plus objective possible (numération sur lame), reflétant la réalité mais surtout reproductible et homogène entre les individus.

L'unité d'échantillonnage pouvait être anatomique (le diverticule s'y prête bien) ou artificielle (champ microscopique). Une pré-étude utilisant 10 diverticules par lame, choisis aléatoirement grâce à une règle (montée sur l'objectif) n'a pas donné satisfaction. En effet, les diverticules ne sont pas toujours bien délimités anatomiquement et il fallait de plus placer la règle subjectivement pour qu'elle coupe 10 diverticules (donc souvent au milieu de la glande ce qui introduit déjà un biais étant donné le caractère localisé de l'infestation par *Marteilia*). Le champ microscopique a donc été choisi (5 par individu) pris aléatoirement sur la coupe.

Il a fallu d'autre part poser des critères de sélection des lames (Matériel et méthodes) excluant les lames pas assez lisibles ou avec trop peu de glande digestive, mais aussi des critères de sélection des champs. Ceux-ci devaient être placés intégralement dans une zone de diverticules et de canaux digestifs (séparés par du tissu conjonctif) excluant l'épithélium stomacal (zone trop hétérogène) et le reste de l'animal. Il est évident que ceci peut introduire un biais quant aux proportions de stades jeunes / stades mûrs; l'observation de l'estomac aurait nécessité une autre étude avec une nouvelle unité d'échantillonnage (simple épithélium).

Puis s'est posé le problème de la distinction des classes qui a imposé une part de subjectivité pour déterminer par exemple si une forme très mûre était éclatée ou sur le point d'éclater... (une forme mûre ou cinq pansporoblastes ?).

Enfin, un autre biais existe : la notion de surface parasitable. En effet, *M. refringens* ne parasite que l'épithélium des diverticules et des canaux dans la zone d'étude: c'est la surface parasitable ou surface utile. La proportion de cette surface par rapport à la surface d'un champ doit être constante en moyenne pour que l'étude soit valide. Or, sachant que l'état physiologique de l'huître change pendant l'année à l'échelle de la population (reproduction, ressources trophiques, état de santé...), il est possible que la morphologie de la glande digestive change aussi introduisant un biais considérable. Une vérification statistique

objective n'est pas simple (calcul de surface grâce au diamètre de la lumière des diverticules); nous n'avons pas eu le temps de la faire mais une vérification subjective rapide n'a décelé aucune variation importante.

Outils de détection de *Marteilia refringens*

Il a été intéressant de comparer la sensibilité de l'histologie classique de routine avec l'hybridation *in situ*, beaucoup plus sensible.

Ainsi, sur 20 lames d'individus (n) (échantillons de prévalences 23 et 57%), il y a eu 2 faux négatifs (positifs en HIS) dont un parasité uniquement aux niveaux des palpes, rarement infestés. Dans quelques cas, des localisations peu habituelles n'avaient pas été observées non plus (bouche, palpes) mais sans changer le diagnostic de parasitose. On peut donc considérer l'histologie comme une méthode relativement fiable. Elle possède cependant ses limites dans le cas de formes ou de localisations inhabituelles et de faibles infestations.

L'hybridation *in situ* a permis des résultats inespérés en histologie classique. Elle a ainsi révélé des stades infestants très discrets dans divers épithéliums du tractus digestif. Elle a également permis de diagnostiquer sans hésitation la présence de *Marteilia refringens* dans un tissu complexe (l'anémone) auquel nous étions peu familiers et où une étude histologique préalable n'avait donné aucun résultat.

Elle a cependant posé quelques problèmes sur le plan technique et notamment un "accrochage" aspécifique parfois très important et gênant pour le diagnostic chez *Cereus pedunculatus*. Elle impose par conséquent une mise au point technique continue en fonction des espèces, des sondes utilisées, de la qualité des réactifs, du choix des témoins etc... incluant de nombreux essais.

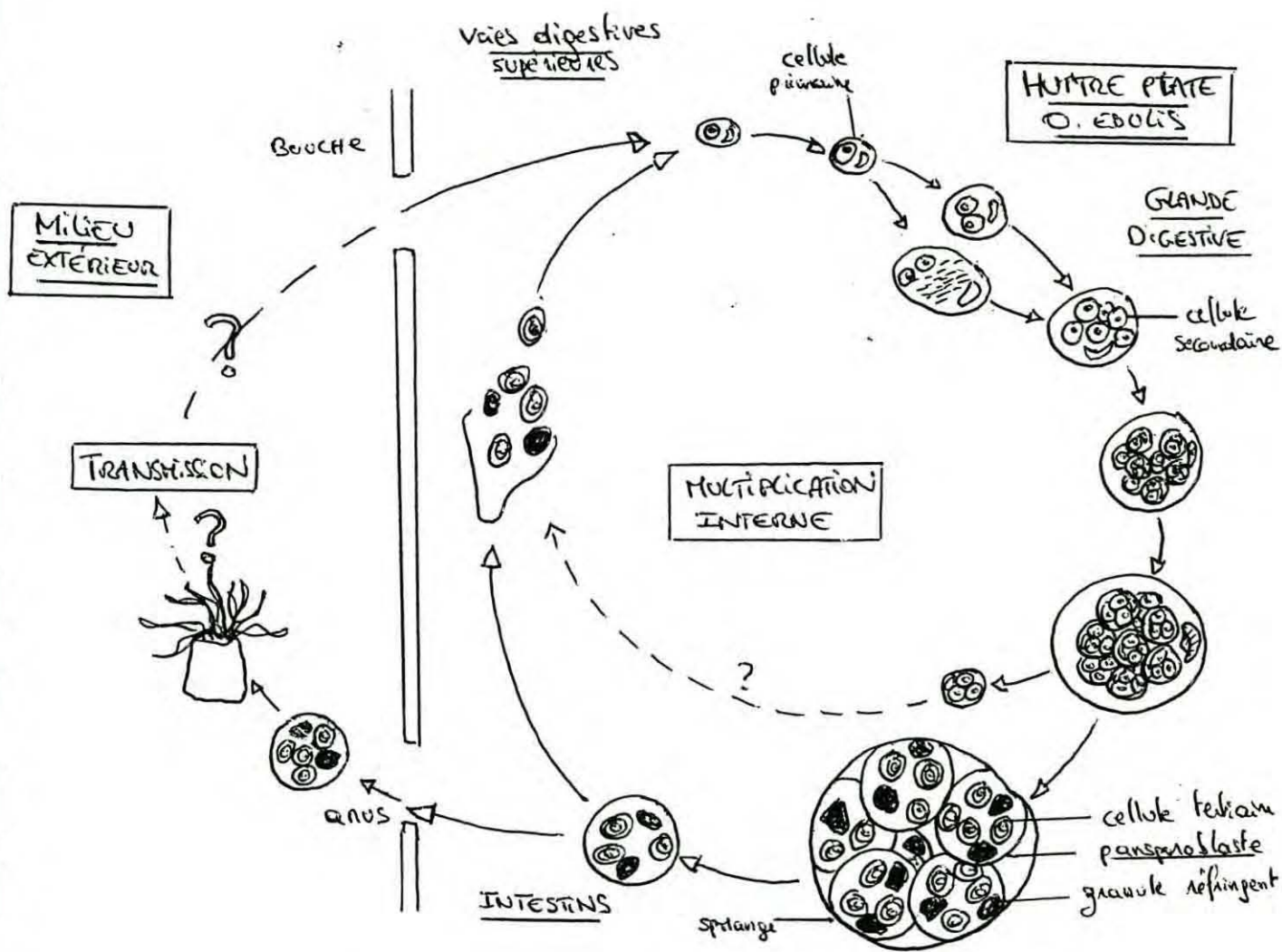


Figure 19 : Nouvelle hypothèse du cycle de *Marteilia refringens* d'après nos observations

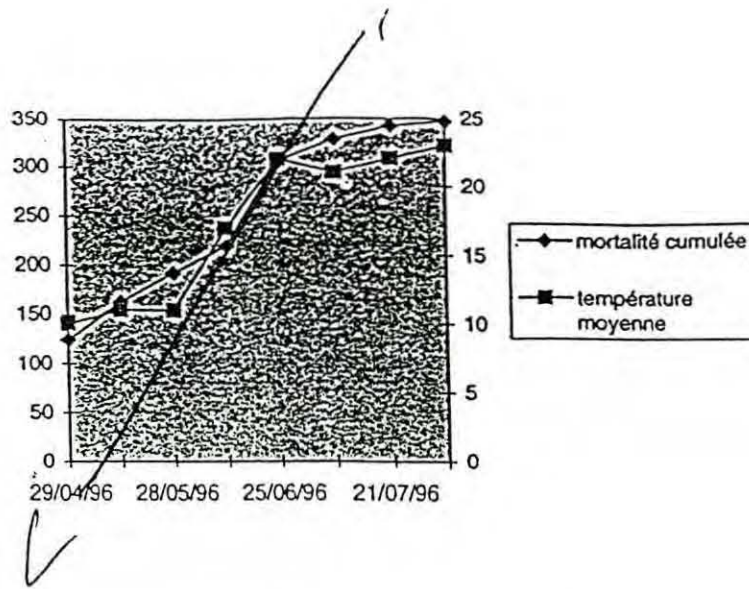


Figure 20: Evolution de la mortalité et de la température en fonction du temps (Berthe et al., 1998).

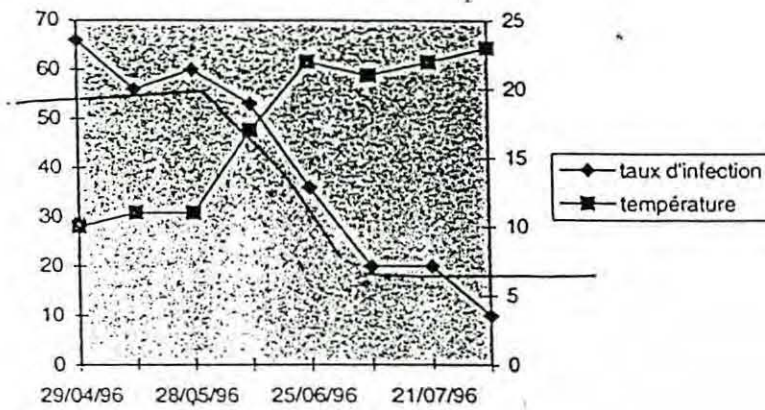


Figure 21: Evolution du taux d'infection et de la température en fonction du temps (Berthe et al., 1998).

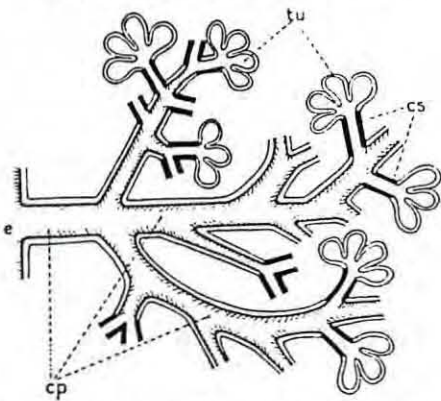


Fig. 1691. — Schéma de la constitution des diverticules digestifs (Anisomyaires et Eulamelli branches); cp, conduits principaux ciliés; cs, conduits secondaires non ciliés; e, estomac; tu, tubules digestifs (d'après Owen).

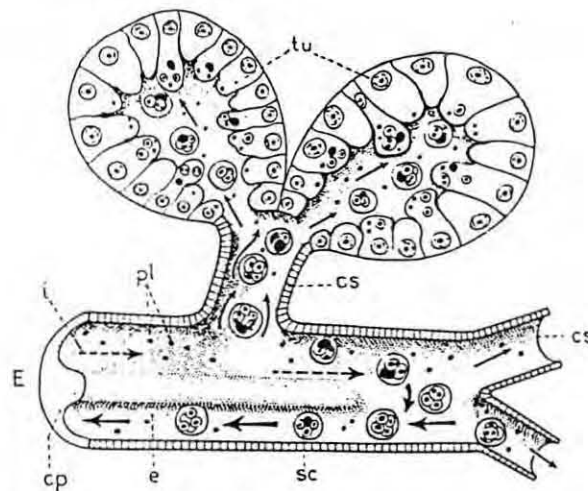


Fig. 1694. — Circulation probable du liquide et des particules dans les diverticules digestifs des Anisomyaires et des Eulamelli branches; cp, cs, conduits principaux et secondaires; e et i, portions exhalante et inhalante des conduits principaux; E, estomac; pl, particules libres; sc, sphères d'excrétion; tu, tubules digestifs. Les flèches indiquent les courants ciliaires (inhalant en trait interrompu; exhalant en trait continu); les flèches ponctuées indiquent les mouvements provoqués par l'absorption due aux cellules des tubules (d'après Owen).

Figure 22 : Schémas de la structure et du fonctionnement des diverticules de la glande digestive des bivalves (Grassé, 1960)

V CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le modèle d'infection par *Marteilia refringens* développé dans cette étude a prouvé son intérêt.

La claire ostréicole constitue un véritable outil pour la compréhension de la maladie puisqu'il permet de suivre simultanément la dynamique du parasite dans une population d'huîtres plates et dans le milieu.

Ainsi, l'approche semi-quantitative de l'étude a montré pour la première fois la chronologie de plusieurs phases distinctes dans la dynamique de *M. refringens* dans une population d'huîtres plates. Nous avons ainsi mis en évidence la succession de deux pics dans l'évolution de l'intensité parasitaire de la population infectée (n-1) : un premier pic qui survient en avril et correspond à une phase de multiplication interne intense, suivi d'un deuxième en juillet parallèlement à l'infection des huîtres saines. Il est ainsi précisément montré un intervalle de temps de deux mois entre ce premier pic et l'observation des premiers stades jeunes dans les huîtres juste infestées.

D'autre part, l'étude qualitative des différents stades parasitaires nous a amené à proposer un nouveau schéma du cycle parasitaire dans *Ostrea edulis* contredisant certaines observations antérieures. Notre hypothèse élimine notamment les phases de "schizogonie" et de reproduction sexuée alors décrites.

En revanche, si nous avons pu émettre des hypothèses sur le mode de transmission du parasite (voie d'infestation digestive, formes libérées, présence du parasite dans *C. pedunculatus*), certains résultats nécessitent une étude approfondie, notamment en microscopie électronique et en biologie moléculaire.

Sur le plan technique, nous avons mis au point, durant cette étude, une méthode semi-quantitative permettant de suivre et de comparer l'évolution de l'intensité parasitaire dans une population d'huîtres et d'évaluer le degré de maturité des formes parasitaires présentes.

De plus, ce travail a prouvé l'intérêt et l'efficacité de l'hybridation *in situ* dans l'étude du cycle d'un parasite, notamment pour la détection des stades infestants dans les huîtres nouvellement infestées et pour la détection de *M. refringens* dans une autre espèce hôte potentielle, *C. pedunculatus*, qui constitue un résultat nouveau.

Ce modèle semi-expérimental nous permet donc de disposer à l'heure actuelle de nouveaux atouts majeurs pour l'étude et le diagnostic du parasite.

La claire constitue un système quasiment contrôlé de reproduction *in vivo* de la marteiliose, alors que cela n'a jamais pu être réalisé *in vitro* en laboratoire. Il est envisageable, à long terme, d'extrapoler les résultats obtenus à d'autres milieux et notamment à l'estran.

Il représente enfin un système d'amplification efficace de *M. refringens*, principal problème rencontré dans l'élaboration d'outils de diagnostic.

BIBLIOGRAPHIE

Alderman, D.J. (1979) Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. Mar. Fish. Rev. 41(1-2): 67-69.

Audemard, C. (1998) Implication d'hôtes benthopélagiques dans le cycle de *Marteilia refringens* parasite de l'huître plate *Ostrea edulis*. CREMA l'Houmeau & IFREMER GAP, La Tremblade.

Auffret, M. and Poder, M. (1983) Recherches sur *Marteilia maurini* parasite de *Mytilus edulis* sur les côtes de Bretagne Nord. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 47(1-2):105-109.

Auffret, M. and Poder, M. (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 Abers disease in *Ostrea edulis*. Mar. Fish. Rev. 41(1-2): 64-66.

Balouet, G.; Chastel, C.; Cahour, A.; Quillard, A. and Poder, M. (1979). Etude épidémiologique et pathologique de la maladie de l'huître plate en Bretagne. Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit. 289: 13-22.

Baud J.P., 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.C.J.; Pernas, M.; Zerabib, M.; Haffner, P.; Thebault, A.; Figueras, A. (1998) Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special consideration of its life cycle. Submitted to Diseases Aquatic Organisms (1997).

Bougrier, S.; Tige, G.; Bachere, E. and Grizel, H. (1986) *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. Aquaculture 58(1-2): 151-154.

Cahour, A. (1979) *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. Mar. Fish. Rev. 41(1-2): 19-20.

Chatton, E. (1911) Sur une Cnidosporidie sans cnidoblaste (*Paramyxa paradoxa*, n.g., n.sp.). C. R. Acad. Sc. Paris 152: 631-633.

Combes C. 1995. Interactions durables : écologie et évolution durable du parasitisme. Masson (Ed.), Paris : 524 pp.

Comps, M. (1970) Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (*Ostrea edulis* L.) dans le Bassin de Marennes. I.C.E.S. C.M.1970/K:4.

Comps, M.(1976) *Marteilia lengehi* n. sp. parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 40(2): 347-349.

Comps, M. (1985) Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp. n. parasite du lavignon *Scrobicularia piperata* P. (mollusque pélécy-pode). Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 47(1-2): 99-104.

Comps, M.; Tigé, G.; Grizel, H. and Duthoit, J-L. (1975) Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule* L. C.R.Acad., Paris, série D 281: 179-181.

Comps, M.; Pichot, Y. and Deltreil, J-P. (1979) Mise en évidence d'une microsporidie parasite de *Marteilia refringens* agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* L. Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 43(4): 409-412.

Comps, M.; Pichot, Y. and Papagianni, P. (1982) Recherche sur *Marteilia maurini* n. sp. parasite de la moule *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 45(3): 211-214.

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). étude ultrastructurale de la sporulation de *Paramyxa paradoxa* Chatton (Paramyxida) parasite de l'annelide polychète *Pocillochaetus serpens*. Protistologica 17(3): 365-386.

Desportes, I. and Ginsburger-Vogel, T. (1977a) 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 285: 1111-1114

Desportes, I. and Lom, J. (1981). Affinités de *Paramyxa paradoxa* Chatton 1911, parasite de *Poecilochaetus serpens* (Annélide Polychète) avec les Marteiliidae Sprague, parasites d'Huîtres et du Crustacé *Orchestia gammarellus*. C. R. Acad. Sc. Paris 292: 627-632.

Desportes, I. and Perkins, F.O. (1990) Phylum Paramyxea. In: Handbook of Protoctista (Eds. Margulis, L.; Corliss, J.O.; Melkonian, M. and Chapman, D.J.) Jones and Bartlett Publishing Corporation, Boston. pp. 30-35

Figueras, A.J.; Jardon, C.F. and Caldas, J.R. (1991). Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.): preliminary results. Aquaculture 99: 17-33.

Fuentes, J.; Villalba, A.; Zapata, C. and Alvarez, G. (1995). Effects of stock and culture environment on infections by *Marteilia refringens* and *Myticola intestinalis* in the mussel *Mytilus galloprovincialis* cultured in Galicia (NW Spain). Dis. aquat. Org. 21: 221-226.

Ginsburger-Vogel, T.; Desportes, I. and Zerbib, C. (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 283: 939-942.

Grassé, P.P., (1960). Traité de Zoologie, Anatomie, Systématique, Biologie. T. 5, Fasc 2. 1962-1979.

Grizel, H. (1985) Etude des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné et de leur impact sur l'ostreiculture Bretonne. Thèse. Académie de Montpellier, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, France.

Grizel, H. and Tigé, G. (1973) La maladie de la glande digestive d'*Ostrea edulis* Linné. I.C.E.S. C.M. K13, 1-7.

Grizel, H.; Comps, M.; Bonami, J. R.; Cousserans, F. Duthoit, J. L. and Le Pennec, M. A. (1974) Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linne. Science et Peche, Bull. Inst. Pêches marit. 240: 7-30.

- Grizel, H.; Comps, M.; Raguenes, D.; Leborgne, Y.; Tige, G. and Martin, A.G. (1982) Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les côtes de Bretagne. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 46(3): 209-225.
- 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* Linne. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 35 (1): 79-87.
- Hine, P.M. (1996) Southern hemisphere mollusc diseases and an overview of associated risk assessment problems. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 15(2): 563-577.
- Lester, R. J.G. (1986). Field and laboratory observations on the oyster parasite *Marteilia sydneyi*. In: Parasite lives: Papers on parasites, their hosts and their associations (Eds. Cremin, M.; Dobson, C. and Moorhouse, D.E.) University of Queensland Press, St. Lucia, pp. 33-40.
- Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.G.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.F.; Loeblich III, A.R.; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E.G.; Page, F.C.; Poljansky, G.; Sprague, V., Vavra, J. and Wallace, F.G. (1980) A newly revised classification of the Protozoa. J. Protozool. 27(1): 37-58.
- 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 implications. J. Protozool. 23(1): 64-74.
- Perkins, F.O. (1988) Structure of protistan parasites found in bivalve molluscs. In: Disease processes in marine bivalve molluscs (Ed. Fisher, W.S.). Am. Fish. Soc. Spec. Publ. 18: 93-111.
- Perkins, F. O. and Wolf, P. H. (1976). Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. - Haplosporidian pathogen of Australian oysters. J. Parasit. 62(4): 528-538.
- Renault, T.; Cochennec, N. and Chollet, B. (1995). Marteiliosis in American oysters *Crassostrea virginica* reared in France. Dis. aquat. Org. 23: 161-164.

Robledo, J.A.F. and Figueras, A. (1995). The effects of culture-site, depth, season and stock source on the prevalence of *Marteilia refringens* in cultured mussels (*Mytilus edulis* Lmk.) from Galicia, Spain. *J. Parasitol.* 81(3): 354-363.

Robert, R.; Borel, M.; Pichot, Y. and Trut, G. (1991). Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquat. Living Resour.* 4(4): 265-274.

Roubal, F. R.; Masel, J. and Lester, R.J.G. (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.

Sprague, V. (1979) Classification of the Haplosporidia. *Mar. Fish. Rev.* 41(1-2): 40-44.

Tigé, G. and Rabouin, M.A. (1976) Etude d'un lot de moules transférées dans un centre touché par l'épizootie affectant l'huître plate. I.C.E.S. C.M. 1976/K21.

Tigé, G., Grizel, H., Langlade, A. & Rabouin, M.A. (1979). Compléments d'observations sur le cycle du parasite, *Marteilia refringens* (Grizel et coll. 1974). Conseil International pour l'exploitation de la Mer, K, 1-9.

Van Banning, P. (1979) Haplosporidian diseases of imported oysters, *Ostrea edulis*, in Dutch estuaries. *Mar. Fish Rev.* 41(1-2): 8-18.

Villalba, A.; Mourelle, S.G.; Lopez, M. C.; Carballal, M. J. and Azevedo, C. (1993a) 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.

Villalba, A.; Mourelle, S.G.; Carballal, M. J. and Lopez, M. C. (1993b) Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). *Dis. aquat. Org.* 17: 205-213.