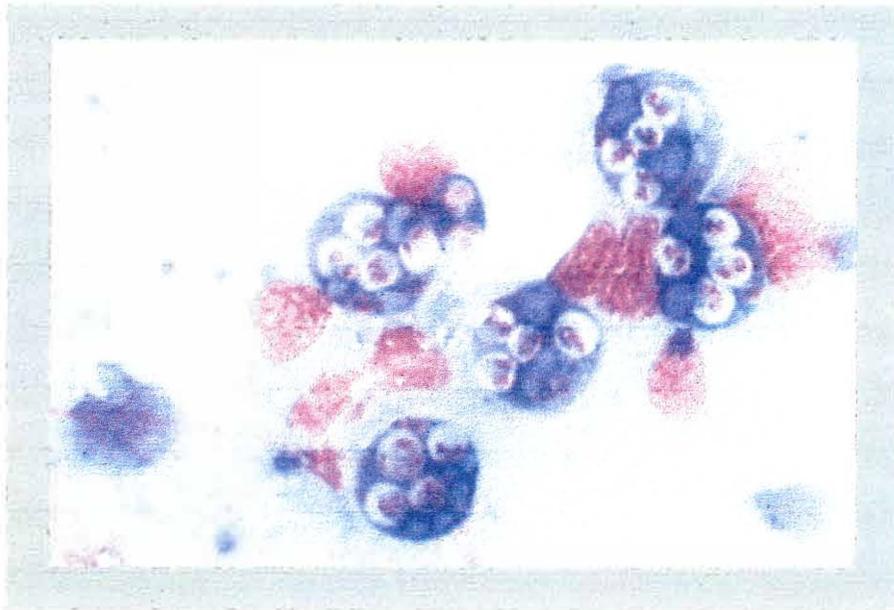


Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes
Formation en Aquaculture, Pathologie Aquacole et Environnement

Rapport de Stage (avril-septembre 1996)

Maamar ZERABIB

**Contribution à l'étude du cycle de
Marteilia refringens, parasite de
l'huître plate, *Ostrea edulis***



*Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
B.P. 133 - 17390 La Tremblade*

 **IFREMER**

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie des invertébrés marins de L'IFREMER, la Tremblade.

J'adresse mes remerciements à Messieurs Jean Pierre Flassch, André Gérard et Tristan Renault, pour leur accueil, leur soutien et surtout de la confiance qu'ils m'ont accordée.

J'exprime toute ma gratitude à Messieurs Franck Berthe, Philippe Haffner et Bruno Cholet, qui ont bien voulu m'encadrer et diriger mon travail, leurs nombreux conseils ont été précieux et m'ont permis de progresser dans ce domaine.

Mes remerciements chaleureux vont à Messieurs Hervé le Bris et Guillaume Blanc, Professeur et Maître de Conférences à l'école vétérinaire de Nantes, d'avoir accepté de m'accueillir pour cette formation.

Je suis reconnaissant à Messieurs Bouguedour et Abda, Directeurs des Services Vétérinaires Algériens, de m'avoir permis de suivre cette formation.

Enfin, je ne peut trouver les mots pour exprimer ma reconnaissance de l'aide précieuse dont j'ai bénéficié, de la part des membres du laboratoire et des stagiaires. Je garderais un très bon souvenir de Nathalie, Rose-Marie, Cécile, Pierre, Christophe, Christophe Lemaire, Pascal, Serge, Béatrice, Sophie, Bertrand, Katia, Patricia, Marie, Magalie, Qinggang, Julie, Laurence, Anne et David.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.	1
CHAPITRE I : <u>Etat actuel des connaissances concernant le pathogène <i>Marteilia refringens</i> parasite de l'huître plate <i>Ostrea edulis</i>.</u>	3
1 - <u>Introduction.</u>	3
2 - <u>Etude de l'agent pathogène.</u>	5
2.1- Morphologie du parasite.	5
2.1.1 - Observations en microscopie photonique.	5
2.1.2 - Observations en microscopie électronique.	6
2.2 - Taxonomie du parasite.	10
2.3 - Cycle du parasite.	11
3 - <u>Pathogénie.</u>	13
3.1 - Symptomatologie.	13
3.2 - Histopathologie.	13
3.3 - Effets pathogènes du parasite.	15
4 - <u>Epidémiologie de la maladie.</u>	16
4.1 - Réceptivité de l'hôte.	16
4.2 - Facteurs environnementaux.	16
4.2.1 - Température.	16
4.2.2 - Salinité.	16
4.2.3 - Renouvellement d'eau.	17
4.3 - Facteurs cultureux.	17
CHAPITRE II : <u>Approche expérimentale.</u>	18
A - <u>Matériels et méthodes.</u>	18
1 - <u>Techniques d'étude du parasite.</u>	18
1.1 - Techniques cytologiques.	19
1.2 - Techniques histologiques.	19
1.3 - Techniques immunologiques.	19

2 - <u>Essais de reproduction expérimentale de la maladie.</u>	
2.1 - Matériel biologique.	19
2.2 - Essai de reproduction artificielle de l'infection.	20
2.2.1 - Purification du parasite.	20
2.2.2 - Inoculation du parasite.	20
2.3 - Recherche de formes infestantes.	20
2.4 - Essais de transmission horizontale de la maladie.	22
2.4.1 - Transmission intraspécifique.	22
2.4.2 - Transmission interspécifique.	22
3 - <u>Suivi du cycle parasitaire de <i>M. refringens</i> chez <i>O. edulis</i>.</u>	22
B - <u>Résultats et discussion.</u>	23
1 - Techniques d'étude du parasite.	23
2 - Essais de reproduction expérimentale de la maladie.	27
3 - Suivi du cycle parasitaire de <i>M. refringens</i> chez <i>O. edulis</i> .	30
CONCLUSION.	33
ANNEXES.	34
BIBLIOGRAPHIE.	48

INTRODUCTION

L'ostréiculture représente une part importante de l'aquaculture française avec une production d'environ 150.000 tonnes par an, ce qui place la France en troisième position mondiale, derrière le Japon et la Corée du sud. Cependant, le développement de cette activité a été souvent limité par l'apparition de maladies généralement causées par divers agents infectieux (parasites, bactéries, virus). Ainsi, la production annuelle d'huître plate, *Ostrea edulis*, estimée dans les années 70 à environ 20 000 tonnes, est aujourd'hui limitée à 1800 tonnes, en raison de la présence de deux maladies parasitaires : la marteiliose et la bonamiose.

Le plus ancien épisode de mortalité affectant l'huître plate a été observé en France et sur les côtes anglaises et hollandaises (Orton, 1924 a et b). Bien qu'aucun agent pathogène n'ait été mis en évidence, l'épizootie a eu pour conséquence une baisse très significative des productions et même la reconversion d'ostréiculteurs à d'autres métiers.

Les plus graves épizooties, ont eu lieu à la fin des années 1960. Ainsi, une infection à iridovirus (Comps *et al.*, 1976) a conduit à la disparition quasi totale de l'huître portugaise *Crassostrea angulata*. Ce sont les parasites qui affectent l'huître plate, *O. edulis*, avec l'apparition et le développement dès 1969 de la marteiliose (Comps et Duthoit, 1976), et à la fin des années 1970 de la bonamiose.

En 1991, il a été mis en évidence un virus apparenté à la famille des *Herpesviridae*, responsable de mortalités chez les larves d'huître creuse *Crassostrea gigas* élevées en écloserie (Nicolas *et al.*, 1992), et chez les naissains d'huître plate (Comps et Cochenec, 1992). Ce type de virus a été retrouvé depuis associé à des mortalités en écloserie, chez les larves d'huître creuse, d'huître plate et de naissains d'huître creuse (Renault *et al.*, 1994a et b).

Devant l'importance de ces phénomènes et de leurs conséquences socio-économiques, de nombreux travaux ont été engagés afin de mieux connaître ces maladies et de tenter de limiter leur impact sur les productions conchyliques. Toutefois, les particularités inhérentes à la pathologie des mollusques bivalves marins limitent les possibilités d'intervention. Peu d'alternatives peuvent être envisagées pour obtenir une protection efficace des cheptels vis-à-vis de leurs agents pathogènes, en raison de certaines caractéristiques des animaux élevés et des techniques d'élevage utilisées.

D'une part, pour des espèces élevées en milieu ouvert, la possibilité de traitement est difficilement envisageable dans la mesure où la recontamination est très probable et qu'il est nécessaire d'utiliser de grandes quantités de produits. Il y a donc risque d'accumulation de résidus. Cependant, ce type d'approche peut être envisageable pour limiter l'incidence des maladies infectieuses dans les écloséries où les animaux sont élevés en milieu clos.

D'autre part, les mollusques bivalves marins ne possèdent pas de cellules immunitaires de type lymphocytaire (lymphocytes T et B), cellules directement impliquées chez les vertébrés dans les réponses spécifiques vis à vis d'un agent pathogène, et qui peuvent être stimulées au moyen de la vaccination.

Cette caractéristique des mollusques, présente des répercussions sur le diagnostic des maladies. Ainsi, l'absence d'anticorps spécifiques dans l'hémolymphe impose la recherche de

l'agent pathogène en cause et non une trace de sa présence. Le diagnostic ne peut être dans ce cas que direct, et certaines techniques existantes pour la mise en évidence des agents pathogènes des vertébrés s'avèrent inaccessibles, et rendent parfois le diagnostic plus difficile à mettre en oeuvre.

Au vu de ce qui précède, les possibilités de protéger efficacement les mollusques présentant un intérêt économique contre les agents pathogènes sont restreintes. Elles correspondent, à la mise au point de techniques de diagnostic direct, sensibles et rapides, et à la sélection de population d'animaux "résistants" à certaines maladies.

Pour le premier point, l'étude des maladies chez les bivalves marins repose jusqu'à présent essentiellement sur l'histologie classique, parfois couplée à la microscopie électronique à transmission. Toutefois, ces techniques, consommatrices de temps, présentent des limites notamment au niveau de la capacité de traitement de nombreux échantillons. Il semble alors, indispensable aujourd'hui de développer de nouveaux outils de diagnostic basés notamment sur l'immunologie et la biologie moléculaire.

Pour le second point, le développement de population d'animaux "résistants" à certaines pathologies peut constituer une voie très prometteuse, dont l'exploration permettra d'obtenir un moyen de lutte contre les maladies des mollusques marins. La reproduction de certaines pathologies au laboratoire, permet de sélectionner des populations plus résistantes par le biais de la génétique quantitative. D'un point de vue plus fondamental, l'existence de souche d'animaux résistants ou tolérants à certaines maladies permet d'envisager l'étude des mécanismes de résistance chez les invertébrés marins.

C'est dans cette perspective que l'IFREMER développe depuis plusieurs années des programmes de recherches concernant certains agents infectieux reconnus comme responsables d'épizooties chez les mollusques bivalves marins.

Un programme de recherche concernant le parasite *Marteilia*, répondant à un appel d'offre de l'Union Européenne dont l'objectif principal est l'étude de la transmission aux espèces sensibles, des mécanismes de transmission et du cycle de développement de l'agent infectieux. Le présent stage a été entrepris dans ce cadre, et notre travail s'est attaché essentiellement à l'étude expérimentale de la maladie : recherche des formes infectieuses, reproduction de l'infection, essais de transmission du pathogène et suivi du cycle de développement du parasite chez l'huître plate.

Dans une première partie nous rappellerons un certain nombre de connaissances concernant le parasite, puis nous présenterons notre démarche expérimentale.

CHAPITRE I : Etat actuel des connaissances concernant le pathogène *Marteilia refringens* parasite de l'huître plate *Ostrea edulis*.

1 - Introduction.

Le parasite *Marteilia refringens*, agent de la maladie de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis*, est responsable d'importantes mortalités chez cette espèce. Ainsi, dès 1967 des mortalités excédant plus de 50%, furent observées sur la côte Nord Ouest de la Bretagne, tout particulièrement dans l'aber Wrach (Alderman, 1979). Ce taux de mortalité a atteint 90% au cours du printemps de la même année (Comps, 1970 ; Herrbach, 1971). Parallèlement, la maladie toucha la plupart des centres ostréicoles français.

En effet, la maladie a été constatée en 1969, d'une part dans le bassin de Marennes-Oléron (Comps, 1970 a) et d'autre part, simultanément dans les abers Wrach et Benoît, la rade de Brest et le bassin d'Arcachon (Herrbach, 1971). Le parasite a été retrouvé par la suite tout le long des côtes Bretonnes : en 1972, dans l'estuaire de la Penzé (Grizel et Tigé, 1973) en rivière de Morlaix et rade de Brest (Tigé et Morel, 1974), enfin en 1974 et 1975, à Paimpol et Binic, ainsi que dans les rivières d'Auray, de Saint Philibert et de Crach (Grizel *et al.*, 1976). Les infections demeuraient dans la plupart des centres de production en 1976 et 1977 (Grizel, 1979), le parasite a été même mis en évidence en Corse (Franc, 1980).

A l'étranger, le pathogène *M. refringens* a été signalé dès 1970, sur la pointe Nord Ouest de l'Espagne (Herrbach, 1971), et au Pays Bas, suite à des exportations d'huîtres plates françaises. Si le parasite entraîna d'importantes mortalités dans les abers espagnols, aucune perte significative n'a été notée aux Pays Bas (Alderman, 1979).

Actuellement, le parasite évolue à l'état endémique dans les différents bassins ostréicoles et empêche le renouveau de cette activité. D'autre part, plusieurs espèces du genre *Marteilia* ont été décrites, sur la base de considérations ultrastructurales, comme susceptibles de parasiter diverses espèces de mollusques bivalves marins (tableau 1).

Bien que ce parasite ait suscité de nombreuses recherches en France comme à l'étranger et que l'agent responsable de la maladie ait été étudié de façon approfondie, un certain nombre de points concernant la biologie du parasite reste à élucider : notamment le cycle de développement du pathogène, son mode et ses mécanismes d'infections, l'évolution des formes libres du parasite et l'existence possible de différentes espèces de *Marteilia*.

Tableau 1 : Parasite du genre *Marteilia* observés chez des mollusques bivalves marins en France

Espèces hôtes	Genre <i>Marteilia</i>	Sources
<i>Cerastoderma edule</i>	<i>M. sp</i>	Comps <i>et al.</i> (1975)
<i>Modiolus modiolus</i> <i>Mytilus edulis</i>	<i>M. sp</i> <i>M. sp</i> <i>M. refringens</i> <i>M. maurini</i>	Auffret <i>et al.</i> (1985) Comps <i>et al.</i> (1975) Tigé <i>et al.</i> (1976) Auffret <i>et al.</i> (1985)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>M. refringens</i> <i>M. maurini</i>	Comps <i>et al.</i> (1980) Comps <i>et al.</i> (1982)
<i>Ostrea edulis</i> <i>Crassostrea gigas.</i> <i>Ostrea chilensis</i> <i>Ostrea angasi</i> <i>Crassostrea virginica</i>	<i>M. refringens</i> <i>M. refringens</i> <i>M. refringens</i> <i>M. refringens</i> <i>M. sp</i>	Grizel <i>et al.</i> (1974) Cahour <i>et al.</i> (1979) Grizel <i>et al.</i> (1983) Bougrier <i>et al.</i> (1986) Renault <i>et al.</i> (1995)
<i>Scrobicularia piperata</i>	<i>M. christenseni</i>	Comps (1985)
<i>Venerupis pullastra</i> <i>Venerupis rhomboides</i>	<i>M. sp</i> <i>M. sp</i>	Podder <i>et al.</i> (1983) Podder <i>et al.</i> (1983)

2 - ETUDE DE L'AGENT PATHOGENE.

2.1 - Morphologie du parasite.

2.1.1 - Observations en microscopie photonique.

Les différents stades de développement du parasite *Marteilia refringens* chez l'huître plate, *Ostrea edulis*, se situent principalement au niveau de la glande digestive : estomac, diverticules digestifs, intestin et rectum. Par ailleurs, des formes morphologiquement très proches ont été également observées dans les branchies.

2.1.1.1 - Au niveau des branchies.

Au sein des tissus nécrosés, ou en voie de nécrose, des formes sphéroïdes ou ovoïdes de 6 à 10 μm , renfermant un ou plusieurs éléments cellulaires de 4 μm de diamètre (figure 1) parfaitement individualisés "uninucléés ou binucléés", ont été signalées par Comps (1970a et b). Les analogies existant entre ces formations et les formes observées dans l'estomac, permettent de les considérer comme pouvant être des formes plasmodiales.

2.1.1.2 - Au niveau de la glande digestive.

a - La cellule primaire.

Dans les différentes parties du tractus digestif de l'huître, la structure de base du parasite est représentée par une cellule souche nommée cellule primaire par Grizel *et al.* (1974a) ou encore plasmode par Perkins (1976a). Persistant tout au long du développement du parasite, la cellule primaire de forme arrondie (figure 1) voit sa taille varier de 10 μm à 30 μm , suivant le nombre de cellules secondaires incluses dans son cytoplasme (Grizel *et al.*, 1974).

Limitée par une membrane simple de type unitaire, la cellule primaire est caractérisée par un cytoplasme qui présente des affinités tinctoriales révélant une nature légèrement basophile. Le cytoplasme renferme un noyau peu chromophile avec un volumineux nucléole et des inclusions légèrement réfringentes en formes d'aiguilles (Grizel *et al.*, 1974a).

b - La cellule secondaire.

La formation à l'intérieur de la cellule primaire de *M. refringens*, d'une ou de plusieurs cellules aboutit à la formation de cellules dites cellules secondaires (Grizel *et al.*, 1974a), présporanges (Perkins, 1976a) ou sporontes (Desportes, 1981).

La différenciation de la cellule secondaire se fait par un processus de bourgeonnement, réalisé par la coalescence de vésicules de type réticulum endoplasmique, délimitant une portion du cytoplasme autour d'un noyau. La première cellule secondaire résulte d'un bourgeonnement endogène (Perkins, 1976a), les autres étant dues à des bourgeonnements exogènes (Desportes, 1981).

La cellule secondaire de forme oblongue, de taille qui dépasse rarement 4 à 5 µm de diamètre (figure 1), présente un cytoplasme très basophile et un noyau comportant un volumineux nucléole (Grizel, 1974b). Le cytoplasme ne renferme comme organites que des membranes sans ribosomes, du réticulum et des mitochondries (Perkins, 1976a).

c - La cellule tertiaire.

La multiplication cellulaire à l'intérieur des cellules secondaires, évoluant en sporanges (Grizel *et al.*, 1974a ; Perkins, 1976) ou pansporoblaste (Desportes et Ginsburger-Vogel, 1977), conduit à la formation de 3 ou 4 unités constituées chacune de 3 sporoplasmes uninucléés emboîtés (figure 1). Ces unités sont les cellules tertiaires (Grizel *et al.*, 1974a) ou spore primordia (Perkins, 1976a).

Parallèlement à ces transformations, Grizel *et al.* (1974a) signalent une augmentation de la taille de la cellule primaire et l'apparition d'inclusions protéiques amorphes dans le cytoplasme des sporanges (figure 1). Sur appositions cellulaires, ces inclusions sont très réfringentes et permettent une reconnaissance aisée des formes évoluées du parasite (Herrbach, 1971).

2.1.2 - Observations en microscopie électronique.

a - La cellule primaire.

La cellule primaire est délimitée par une membrane simple de type unitaire, qui ne paraît pas subir de modification au cours du cycle du parasite. Elle est en contact étroit avec les membranes cellulaires de l'hôte par l'intermédiaire de microvillosités (Grizel *et al.*, 1974a).

Le cytoplasme riche en ribosomes, renferme un noyau peu chromophile qui possède un nucléole volumineux bien apparent (Grizel *et al.*, 1974a). le cytoplasme comporte également divers autres organites. Parmi ceux-ci, des corps multivésiculaires renfermant de nombreuses vésicules. Ces dernières sont limitées par une membrane dont la citerne est plus ou moins occupée par du matériel dense aux électrons (Perkins, 1976a).

Au voisinage de ces vésicules, des particules denses, vermiformes, de 50 à 130 nm de longueur (Perkins, 1976a) sont observées. Elles sont constituées d'une zone médullaire opaque aux électrons, séparées par un espace clair, d'un cortex comportant une couche dense épaisse, un feuillet clair et un feuillet dense externe (Bonami *et al.*, 1971). Interprétées par Grizel *et al.* (1974a) comme des particules d'allure virale, ces corps ont été assimilés par Perkins (1976) à des haplosporosomes.

La cellule primaire contient également des inclusions de taille variable pouvant atteindre 5 µm, de structure paracrystalline contenant du matériel de nature protéique (Grizel *et al.*, 1974a). Ces inclusions sont formées de vésicules aplaties, régulièrement empilées et séparées par une couche de matériel finement granuleux dense aux électrons (Grizel *et al.*, 1974a).

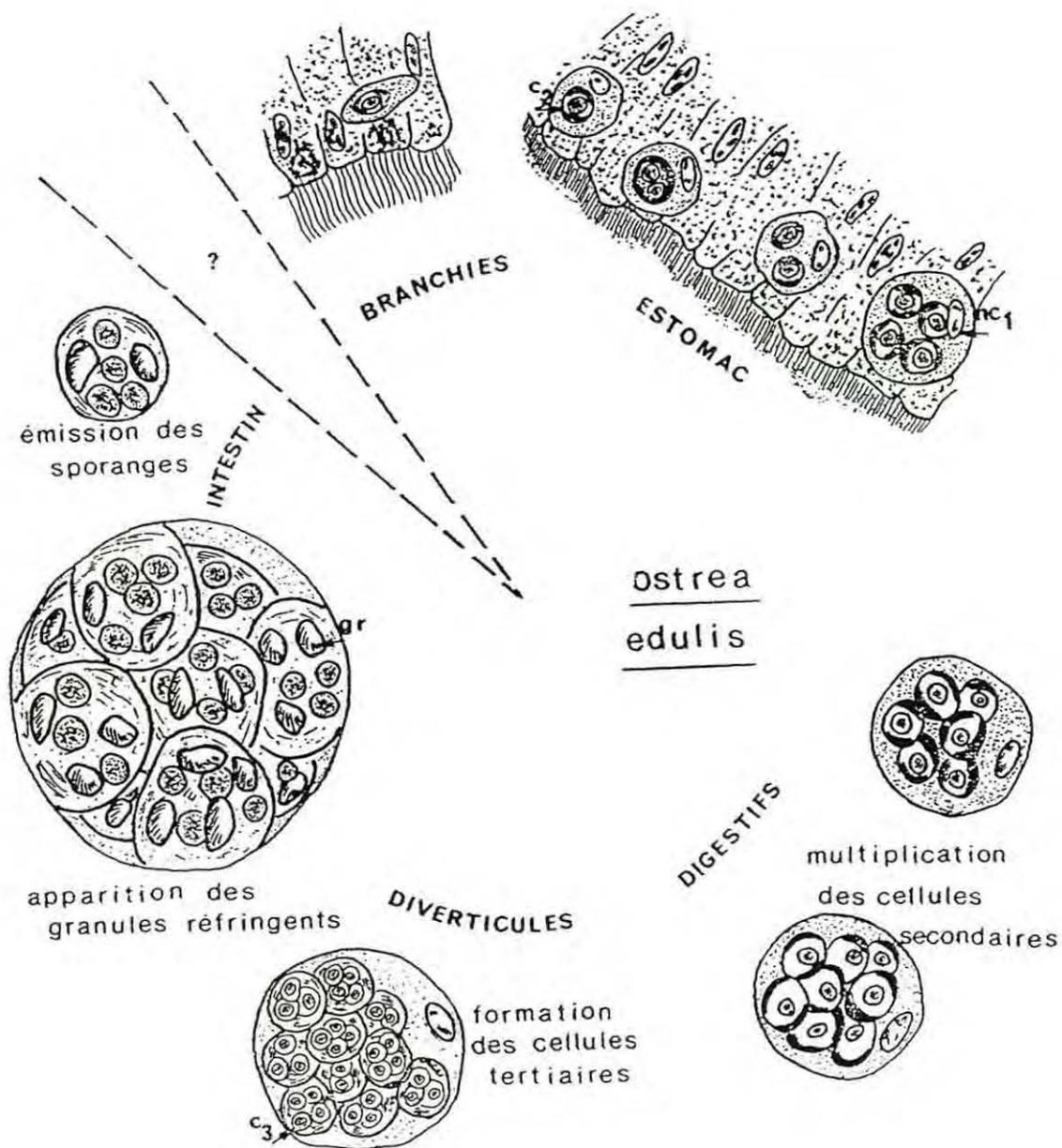


Figure 1: Les différentes formes du parasite avec leur localisation chez l'huître plate *O. edulis*. nc₁ : noyau de la cellule primaire. c₂ : cellule secondaire. c₃ : cellule tertiaire. gr : granule réfringent.

b - la cellule secondaire.

Les cellules secondaires (figure 2) possèdent un cytoplasme de structure très proche de celui des cellules primaires, le noyau n'offre aucune particularité et son diamètre voisin de 2 μm est plus petit que celui de la cellule primaire (Grizel *et al.*, 1974). Par ailleurs, lors de la sporulation, les cellules secondaires subissent une évolution typique (Grizel *et al.*, 1974b).

La membrane cytoplasmique, est doublée d'une paroi constituée d'une couche de quatre unités membranaires, se formant par tronçon. Ces unités peuvent emprisonner des ribosomes qui lui confèrent un aspect granuleux.

La paroi est enveloppée d'une couche fibrillaire, les fibrilles étant alors perpendiculaires à la surface de la cellule (Perkins, 1976). Le cytoplasme devient très vésiculeux, les espaces intervacuolaires étant occupés par des grains ribosomiaux de 12 à 16 μm de diamètre (Bonami *et al.*, 1971). De grosses inclusions amorphes, très denses aux électrons, apparaissent dans le cytoplasme résiduel (Grizel *et al.*, 1974b).

c - La cellule tertiaire.

La cellule tertiaire ou spore de *M. refringens* (figure 2) décrite par Perkins (1976a), présente une forme sphérique mesurant 3 μm , ou ovoïde, limitée par une paroi épaisse de 29 nm. Elle est constituée de trois sporoplasmes uninucléés emboîtés, le plus interne est logé dans une vacuole du sporoplasme moyen, lui même situé dans une vacuole du sporoplasme externe.

Le sporoplasme externe comprend un grand nombre d'haplosporosomes sphériques ou ovoïdes, de 111 nm de diamètre (ou inclusions cytoplasmiques rapportés par Ginsburger-Vogel et Desportes, 1979a), et des mitochondries, alors que les ribosomes sont rares ou absents.

Le sporoplasme moyen contient, des vésicules vermiformes limitées par une double membrane, des ribosomes, des mitochondries et du réticulum endoplasmique.

Le sporoplasme interne possède des mitochondries et de nombreux ribosomes, lui conférant un aspect dense.

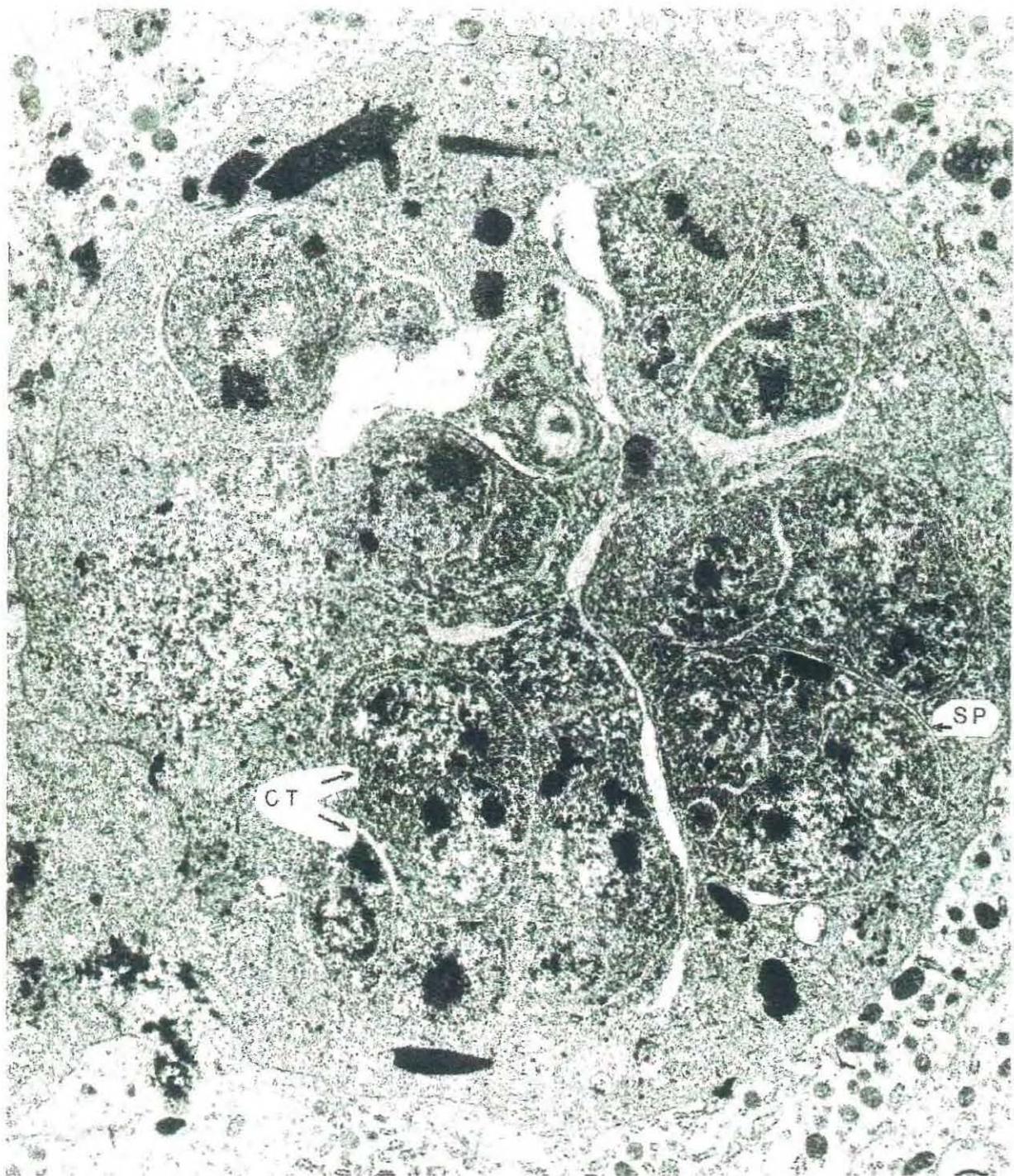


Figure 2 : Vue générale du parasite après division des cellules secondaires donnant des sporanges (SP). Les cellules tertiaires (CT) ou spores sont visibles sur cette micrographie. Micrographie Grizel *et al.* (1974).

2.2 - Taxonomie du parasite.

Au cours des premiers travaux effectués sur l'agent responsable de la maladie de la glande digestive de l'huître plate, certains rapprochements ont été établis entre ce pathogène et d'autres organismes de groupes connus.

Ainsi, Comps (1970a) rapproche les formes plasmodiales observées chez le parasite de celles présentes chez les haplosporidies. Par ailleurs, Herrbach (1971) trouve certaines analogies entre le parasite et des champignons marins primitifs. En 1974, Grizel *et al.* (1974b) grâce à la microscopie électronique, créent pour lui un genre nouveau *Marteilia*, avec l'espèce *Marteilia refringens*. L'affinité taxonomique a été par la suite révisée par Perkins (1976a). Il classa ce pathogène parmi les haplosporidies, en rejoignant les travaux de Comps (1970a). Cette classification est basée sur l'identification des particules d'allures virales de Grizel *et al.* (1974a), à des haplosporosomes (Perkins, 1976a), qu'il considère comme un critère systématique (Perkins, 1968 ; 1969b ; 1971).

Sur ces bases, lors d'une révision de la classification des protozoaires, Levine *et al.* (1980) proposent suivant Perkins (1976) et Sprague (1979) de créer le phylum des *Ascetospora*. Ce dernier comprend la classe des *Stellatosporea* caractérisée par la présence d'haplosporosomes et par des spores comprenant un ou plusieurs sporoplasmes, et celle, des *Paramyxea* définie par des spores bicellulaires sans orifice et composées d'une cellule pariétale et d'un sporoplasme.

Parallèlement aux descriptions de *M. refringens*, l'étude d'un protiste parasite *Orchestia gammarellus* présentant des affinités avec *M. refringens*, ont conduit Ginsburger-Vogel et Desportes (1979, a et b), à créer pour lui un genre voisin, dit *Paramarteilia*, en s'appuyant sur le mode particulier de la sporogénèse qui donne 2 à 3 cellules emboîtées et ne retenant pas comme critère taxonomique la présence d'haplosporosomes. Ces auteurs rapprochèrent ce genre, ainsi que le genre *Marteilia*, des *Myxosporidies* et des *Paramyxidies*.

Ce rattachement par Desportes et Ginsburger-Vogel, a été confirmé suite aux études de Desportes (1981) et Desportes et Lom (1981) sur les affinités des *Paramyxa* avec les *Marteiliidae*. Desportes (1984) et Perkins (1988) ont retenu la classification de ces trois genres dans la classe des *Paramyxea*. Mais, compte tenu de l'importance des parasites qui constituent ces genres et qui affectent divers mollusques bivalves marins, Desportes (1984), Perkins (1993), suggèrent de réhausser la classe des *Paramyxea* au rang de phylum. Corliss (1994) conserve cependant la classification initiale (Sprague, 1979), tout en mentionnant les propositions de Desportes et Perkins.

Actuellement, nous retiendrons l'appartenance, des genres *Marteilia*, *Paramarteilia* et *paramyxa* à la classe des *Paramyxea*. Les travaux récents sur la phylogénie de ces organismes à partir de séquences de rDNA devraient permettre de préciser les relations entre ces espèces.

2.3 - Le cycle du parasite.

Dès les premiers travaux sur *M. refringens* (Comps, 1970 ; Herrbach, 1971 ; Grizel et Tigé, 1974b), il a été établi l'existence d'un lien étroit entre les stades successifs du développement du parasite et la localisation de ceux-ci dans les différentes parties de la glande digestive de l'huître.

Ainsi, les premiers stades du parasite, représentés par la cellule primaire sont essentiellement localisées dans l'épithélium cilié de l'estomac, toutefois ces stades jeunes peuvent être également observés dans les diverticules digestifs ou dans l'oesophage. La prolifération des formes jeunes dans les diverticules digestifs, précède le développement des stades suivants du parasite, qui conduiront à la formation de sporanges avec des granules réfringents et des spores.

Deux hypothèses ont été avancées par Franc (1980) et Grizel (1985) qui considèrent que le cycle d'évolution de *M. refringens* se déroulait en deux phases. Une première phase de schizogonie, favorisant la multiplication du parasite dans l'hôte, suivi d'une deuxième phase, dite sporogonique par Grizel (figure 3) ou sexuée par Franc (figure 4) et caractérisée par une différenciation cellulaire en lignée (Franc, 1980), aboutissant à la formation de spores de dissémination.

Les points de divergences de ces deux hypothèses, résultent essentiellement au niveau de la seconde phase. Ainsi, Franc (1980) considère que la formation des spores résulte d'un phénomène de conjugaison de cellules de la deuxième et de la troisième lignée, alors que pour Grizel (1985), les spores de dissémination sont obtenues par des phénomènes de conjugaison des cellules de la deuxième lignée proposée par Franc. Le devenir de ces dernières dans le milieu extérieur reste inconnu, et, l'hypothèse d'un cycle chez un hôte secondaire avait été avancée par Grizel et Tigé (1973) et Balouet (1979) dès les premières études.

Il a été montré également que le parasite évolue selon un cycle saisonnier, Tigé *et al.* (1979) ont établi expérimentalement que l'infestation de l'huître a eu lieu durant les mois de juillet et août par des formations jeunes du parasite. Ainsi durant l'été, certains examens peuvent montrer des sujets présentant une récente infestation, toutefois, durant cette période de l'année, les contrôles zoosanitaires dans les secteurs anciennement atteints par la maladie, mettent en évidence chez les huîtres parasitées des formes évoluées du parasite.

Les taux des parasites matures ou en voie de maturation augmentent jusqu'en octobre, les formes jeunes étant très rares dans les tissus et l'intensité de la maladie est à cette époque généralement forte puisqu'elle touche environ 20 à 100% des sujets examinés. Au cours de l'hiver suivant, le nombre de formes évoluées diminue et simultanément l'intensité de la maladie devient faible. Le taux de sujets parasités peut être inférieur à 10% des sujets examinés, et, enfin à partir des mois de mai et juin les formes jeunes de *M. refringens* sont visibles chez l'huître. Le cycle se poursuit avec l'apparition et l'augmentation des formes évoluées à la fin du printemps et au cours de l'été.

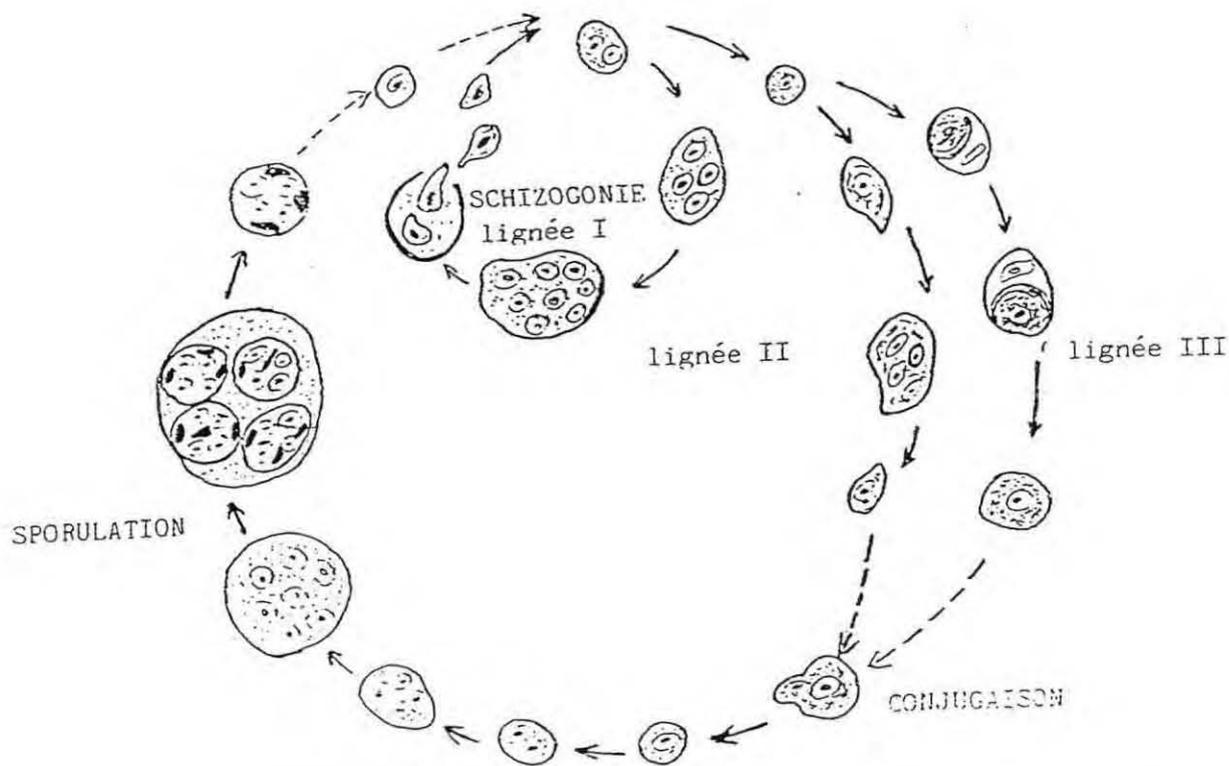


Figure 3 : Cycle de développement de *M. refringens*, d'après l'hypothèse de Grizel (1985).

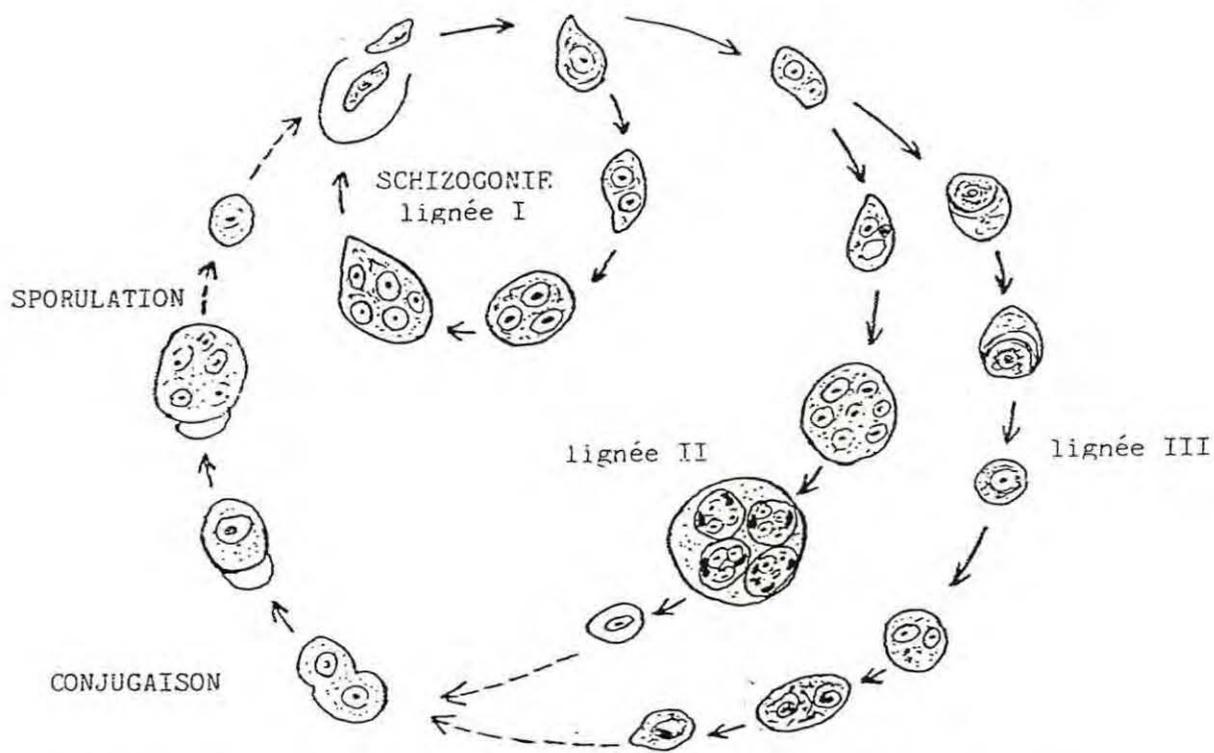


Figure 4 : Cycle de développement du parasite, d'après l'hypothèse de Franc (1980).

3 - Pathogénie.

3.1 - Symptomatologie.

La maladie se manifeste par plusieurs symptômes, soit externes et visibles au niveau de la coquille, soit internes et relatifs à l'état général du mollusque. Cependant, ces différents signes cliniques ne peuvent être considérés comme strictement spécifiques de la maladie. Grizel et Tigé (1973), avaient retenu essentiellement un arrêt de croissance, une dépigmentation de la masse digestive et l'amaigrissement considérable des huîtres.

Les sujets malades ne présentent généralement pas de liseré transparent indiquant la présence d'une nouvelle "pousse" et des bords de valves arrondies. Les huîtres sont dites "Boudeuses" (figure 5). La masse digestive, ordinairement fortement pigmentée, de couleur chocolat et entourée par des produits de réserve glycogéniques lui donnant un aspect blanc ivoire, présente chez les individus malades un aspect granuleux de couleur brun pâle.

L'ensemble de ces signes cliniques, dénotant une affection du système digestif, se traduisent par une masse viscérale d'aspect glaireux, contractée dans le crochet de la coquille, et par la mort de l'huître.

3.2 - Histopathologie.

L'examen microscopique de tissus d'huîtres présentant les caractéristiques précédentes, révèle dans la majorité des cas, la présence de cellules ou d'ensembles cellulaires près de la bordure marginale des épithéliums de l'estomac, des canaux et diverticules digestifs. Certaines de ces formations, peuvent être observées au niveau des lésions branchiales, quoique plus rarement dans cet organe (Lassere, 1969 ; Herrbach, 1971 ; Tigé et Morel, 1974 ; Balouet *et al.*, 1979). Il en est de même des stades décrits par Franc (1980) au niveau de l'épithélium péribuccal et de l'entrée de l'oesophage, et de ceux signalés par (Grizel *et al.*, 1974b) dans la lumière de l'intestin et du rectum.

Lors du développement de la maladie, les diverticules digestifs sont le siège d'altérations propres à influencer le comportement de l'hôte et l'évolution des lésions est étroitement liée aux phases principales du cycle du parasite. Au cours, de la phase de prolifération des formes jeunes, le parasite investit les canaux et tubules digestifs, sans introduire de modifications de l'épithélium digestif. Par contre, lors de la phase de sporulation et la formation des stades matures, des modifications notoires interviennent au niveau des cellules et des diverticules digestifs.

En effet, l'augmentation de la taille du parasite, inséré entre les cellules épithéliales, se traduit par l'encombrement de la lumière des tubules et la désagrégation de la partie apicale des cellules épithéliales, qui présente souvent des sécrétions anormales. Cette rupture libère le parasite dans la lumière des diverticules où sont également présents des débris nécrotiques et des cellules lysées. En fin d'évolution, l'épithélium digestif est profondément altéré, certaines cellules perdent leur ciliature et les cellules sécrétrices régressent.



a



b

Figure 5: (a) Vue externe d'une huître en croissance : (flèche) Présence d'un liseré transparent indiquant la croissance de l'huître. (b) huître dite boudreuse : Les bords des valves de la coquille sont arrondis, l'huître ne croît plus.

Cette perturbation progressive de l'appareil digestif entraîne un amaigrissement de l'huître, l'observation microscopique révèle la disparition des cellules de Leydig, qui constituent le tissu de réserve, et leur remplacement par des fibres conjonctives et des cellules hyalines.

3.3 - Effets pathogènes du parasite.

Si généralement, les signes cliniques indiqués ci-dessus sont notés conjointement à la présence du parasite, on peut observer ce dernier chez des huîtres apparemment saines, en état d'engraissement ou encore présentant des gonades normalement développées (Grizel *et al.*, 1974). Ces variations dans le comportement des huîtres parasitées rendent complexe l'analyse de l'action du parasite. Les expériences d'infestations expérimentales, réalisées à ce jour par les différentes équipes de recherches (Balouet *et al.*, 1979), n'ont pas abouti et la forme de contamination de *M. refringens* reste inconnue. Cependant, elle pourrait être vraisemblablement due à une des cellules de la spore ou les trois sporoplasmes, sous réserve qu'un cycle complémentaire n'ait lieu chez un hôte secondaire.

De même, le mode d'infestation des huîtres, est à mettre en évidence. Une infestation naturelle par voie digestive semble très probable, du fait que des formes parasitaires de *M. refringens*, ont été identifiées dans les cellules épithéliales peribuccales et dans l'épithélium stomacal près de la zone buccale.

Le mécanisme d'action du pathogène reste également à démontrer. Ainsi, l'absence d'altération et de déformation des cellules digestives (Grizel *et al.*, 1976), et le développement lent du parasite, conduit à penser qu'il évolue progressivement aux dépens de l'hôte, sans entraîner de profondes modifications cellulaires de l'huître. Poder (1980) signala des nécroses épithéliales du tractus digestif accompagnées de réactions hémocytaires limitées. Robledo (1994) nota que l'infestation par *M. refringens*, ne s'accompagne pas toujours par une infiltration hémocytaire dans la glande digestive, et le seul cas observé, était localisé au niveau des branchies des moules, *M. galloprovincialis*, suite à une infestation par des formes primaires de *Marteilia*.

Le parasite pourrait également se développer aux dépens des cellules épithéliales et en limiter l'activité métabolique en perturbant les fonctions digestives de l'huître : ainsi, pourrait être expliquée la présence de microvillosités existantes entre les cellules primaires du parasite et les cellules épithéliales de l'huître. L'encombrement des diverticules digestifs par de nombreuses formes du parasite, notamment, au cours de la période estivale, laisserait supposer une action mécanique de ce dernier par obturation des canaux digestifs.

Enfin, l'hypothèse d'une sécrétion par le parasite de substances toxiques pour l'huître ne peut être écartée, toutefois, aucun signe d'une quelconque action toxique sur les tissus n'a pu être décelé, aussi bien en microscopie photonique qu'en microscopie électronique.

Ces processus pathogènes aboutissent à la mort de l'huître, mais il faut également envisager les effets secondaires de bactéries et parasites rencontrés fréquemment chez les huîtres sujettes à un affaiblissement. Herrbach (1971) avait noté chez des huîtres parasitées affaiblies, la présence de nombreux ciliés *Ancistrocomideae* et flagellés *Hexamita sp.*

4 - Epidémiologie de la maladie.

4.1 - La réceptivité de l'hôte.

Dans l'état actuel des connaissances, l'huître plate, *O. edulis*, constitue le principal hôte du parasite (Grizel *et al.*, 1974). Les espèces *O. angasi* (Bougrier *et al.*, 1986), *O. chilensis* (Grizel *et al.*, 1983) semblent sensibles. Toutefois la sensibilité paraît légèrement différente en fonction de l'âge. Les très jeunes naissains (moins de 6 mois) ne sont qu'exceptionnellement trouvés contaminés, sans doute du fait de leur capacité réduite de filtration, comme cela a été décrit par Andrews (1965) et Ray (1954) lors d'infestation par *Perkinsus marinus*.

Parmi les autres mollusques, il faut signaler la mise en évidence de cet agent pathogène chez la moule *Mytilus edulis* (Tigé *et al.*, 1976) et *Mytilus galloprovincialis*, (Comps *et al.*, 1980) Par ailleurs, en mai 1977, des formes infectieuses jeunes caractéristiques de *M. refringens* ont été observées, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Cahour *et al.*, 1979), provenant de la baie de Carantec. Ces formes ont été mises en évidence chez seulement 3% d'huîtres creuses. Balouet *et al.* (1979) émettent l'hypothèse que les parasites ont été simplement captés par les huîtres chez lesquelles ils n'ont pas eu d'évolution épidémique. Cette hypothèse a été retenue et entérinée par la communauté européenne (circulaire N° 93/169).

4.2 - Facteurs environnementaux.

La vie des mollusques dépend étroitement des paramètres physico-chimiques du milieu ambiant. La salinité, le renouvellement d'eau, et la température sont autant de facteurs pouvant induire directement ou indirectement des mortalités ou des malformations.

4.2.1 - Température.

La période de contamination dans le milieu naturel survient uniquement pendant les mois estivaux. Les expériences réalisées (Balouet *et al.*, 1979) révèlent une étroite relation entre cette période et la température. Ainsi, une baisse très nette du taux de parasitisme est notée au cours du mois de mars et avril juste après les deux mois les plus froids de l'année. Par ailleurs, la reprise de l'infection a lieu très souvent au mois de mai lorsque les températures deviennent supérieures à 12°C.

4.2.2 - Salinité.

Les relations entre la salinité et *M. refringens* sont moins nettes pour expliquer l'évolution de la maladie. Ainsi, la présence du parasite a été rarement signalée dans les eaux franchement océaniques où la salinité varie peu et en général plus élevée qu'en zone estuarienne. D'autres part, le transfert d'huîtres plates parasitées des rivières de Bretagne où le taux de salinité est inférieure à 35‰ vers l'étang de Thau, dont la salinité varie entre 35 à 37‰, s'est traduit par des perturbations du cycle du parasite (Comps, 1979).

4.2.3 - Renouvellement d'eau.

Le renouvellement médiocre de l'eau dans les fonds d'abers, les fonds d'estuaires (la rivière d'Auray, de Daoulas), zones de prédilection de l'épizootie, correspond à la dégradation du milieu que l'on retrouve dans les zones lourdement infectées de la rade de Brest. Dans ces zones, l'utilisation intensive des parcs ostréicoles depuis plusieurs années, accumulant toutes sortes de déchets, constitue certainement un facteur hautement défavorable.

4.3 - Facteurs cultureux.

Si certains paramètres cultureux, tels que les transferts d'animaux de zones contaminées vers des zones indemnes, sont à l'origine du déclenchement et de la propagation de la maladie, d'autres facteurs ne semblent pas influencer directement le développement du parasite *M. refringens*.

Ainsi, il semblait que la profondeur d'immersion était un facteur limitant pour le développement de la maladie, mais cette hypothèse a été contredite par l'évolution identique de l'infection pour des huîtres immergées à différentes profondeurs, dans les eaux espagnoles (Balouet *et al.*, 1979).

L'évolution de la maladie semblait également liée à l'importance des stocks en élevage. Cependant, si cette hypothèse était valable sur le banc de Loumergat en rade de Brest, où le taux de contamination varie en fonction de l'importance des stocks, ce ne fut pas le cas dans la rivière de St-Philibert. Ainsi, après le diagnostic du parasite dans les parcs de cette rivière et l'interruption des élevages. Leur réutilisation dès 1979, malgré un accroissement important de la biomasse, s'est traduit par un niveau d'infestation très bas, devenu nul par la suite. Cependant, la maladie s'est brusquement redéclarée en 1982 et 1983 alors que la biomasse était quasiment nulle (Grizel, 1984).

Par ailleurs, le développement de la maladie sur le banc de Loumergat peut être expliqué par le fait que les élevages n'avaient pas été interrompus et cela aurait permis l'entretien de l'agent pathogène et son passage d'une population à une autre. D'autre part, son évolution dans la rivière de St-Philibert semble plutôt liée au cycle biologique qui n'aurait pas été complètement interrompu, traduisant la persistance de certaines formes du parasite qui se seraient développées lors de la réutilisation des parcs.

CHAPITRE II : Approche expérimentale.

La mise en évidence du pathogène *M. refringens* chez l'huître plate, *O. edulis*, a fait l'objet de nombreux travaux. Ainsi, les différentes phases du cycle du parasite, ont été confirmées par une étude en microscopie électronique (Grizel *et al.*, 1974). Toutefois, les études attachées au cycle de développement du parasite chez cette espèce et la transmission de cet agent pathogène d'individus contaminés vers d'autres sujets sains, sont restées partielles et contradictoires. Ainsi, des doutes subsistent toujours quant à la possibilité pour le parasite de réaliser son cycle intégralement chez l'huître, ou bien alors, à la nécessité d'intervention d'un agent intermédiaire pour lui permettre d'achever son cycle et de transiter d'un individu à un autre.

A cet effet, plusieurs essais de contamination et de reproduction de la maladie, ont été tentés en milieu naturel dans des zones endémiques et en conditions expérimentales au laboratoire, tout en intégrant certains paramètres qui semblent jouer un rôle prépondérant dans la phase de contamination. Parmi, ces expériences :

- inoculation de fractions de parasites purifiés, par ingestion forcée après anesthésie et par inoculation dans la cavité paléale suivi d'une exondation,
- recherche des formes infestantes du parasite, afin de déterminer la source de contamination,
- essais de transmission horizontale du parasite par contact entre individus de même espèce et de différentes espèces de mollusques bivalves marins,
- suivi du cycle du parasite et du niveau d'infestation chez une population d'huîtres plates infestées naturellement et maintenues dans des conditions expérimentales.

A - Matériels et méthodes.

I - Techniques d'études du parasite.

La présence de maladies chez les mollusques bivalves marins, a nécessité le renforcement des recherches dans le domaine de la pathologie. Ainsi, les deux parasites *M. refringens* et *B. ostreae*, ayant considérablement affecté l'élevage de l'huître plate sur les côtes européenne, ont été retenus dans le cadre de la législation Européenne (Directive communautaire 91/67/CE) comme agents à recherche obligatoire.

La recherche de *M. refringens* dans le cadre de la réglementation 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 du dépistage en routine de la maladie. Cependant, elles peuvent être utilisées dans le domaine de la recherche.

1.1 - Méthodes cytologiques.

La recherche du parasite est réalisée à partir de la glande digestive. Après ouverture des huîtres, un morceau de la masse digestive est prélevé avec une pince puis légèrement séché sur un papier filtre. Les appositions de glande digestive sont obtenues en mettant en contact les tissus sur une lame; ce geste suffit pour obtenir une empreinte des tissus. Les préparations sont alors fixées dans un bain de méthanol (pendant une à deux minutes), puis colorées à l'aide du kit Hémacolor (Merck) avant d'être observées au microscope photonique.

1.2 - Méthodes histologiques.

L'histologie est une technique visant à l'observation des structures cellulaires et tissulaires en microscopie photonique. Le matériel vivant prélevé, comprend une tranche d'huître ou de moule coupée selon un plan sagittal, puis fixées dans le liquide de Davidson. Ces préparations sont déshydratées (bains d'alcool successifs), imprégnées par un solvant de la paraffine (xylène), et par de la paraffine, puis incluses dans des moules métalliques. Les coupes confectionnées par la suite, sont colorées à L'hémalum-éosine et au Giemsa (l'ensemble du protocole est donné en annexe 2).

1.3 - Méthodes immunologiques.

Des réactifs immunologiques (anticorps monoclonaux : surnageant de culture), préparés à partir d'hybridomes produits par Robledo *et al.* (1994), ont été évalués comme outils potentiels dans l'étude du cycle parasitaire. Ces anticorps sont présentés par les auteurs comme potentiellement spécifique de certains stades de développement du parasite. Ils ont été testés en immunofluorescence (IF) et immunoperoxydase (IP) (protocole décrit en annexe 2), sur apposition cellulaires, cryocoupes et coupes paraffines de glandes digestives d'huître plate *O. edulis* et de moule *M. edulis*.

2 - Essais de reproduction expérimentale de la maladie.

2.1 - Matériel biologique.

Les essais de reproduction expérimentale de la marteiliose ont été effectués sur des huîtres et des moules de divers origines. Les huîtres plates, *O. edulis*, contaminées étaient issues de l'aber Wrach (Bretagne) et du golfe du Morbihan (Bretagne), alors que les moules *Mytilus edulis* provenaient de la rivière de la Trinité sur Mer (Bretagne).

les huîtres saines provenaient de Sète (Méditerranée) et du banc d'Angoulin (la Rochelle), les moules *Mytilus edulis* et *galloprovincialis* indemnes étaient originaires de la région de Royan (Charente Maritime) et de l'Etang de Thau (Méditerranée). Tous les lots témoins retenus pour la réalisation des manipulations étaient préalablement testés contre une éventuelle contamination par l'examen cytologique de trente glandes digestives de sujets du même lot et de même origine.

2.2 - Essais de reproduction artificielle de l'infection.

2.2.1 - Purification du parasite.

L'isolement et la purification du parasite ont été réalisés conformément aux premières étapes des protocoles établis par Miahle *et al.* (1985) et Robledo *et al.* (1994), légèrement modifiés et simplifiés (figure 6). Les glandes digestives des animaux infestés ont été utilisées pour purifier les différentes formes du parasite.

Les sujets fortement parasités par *Marteilia* sont identifiés par l'examen cytologique de glande digestive colorées à l'Hémacolor (Merck). Les glandes digestives des sujets infestés sont disséquées et le tissu superficiel de la gonade est séparé de la glande digestive. Par la suite, les glandes digestives sont homogénéisées en utilisant un broyeur (Ultraturax). L'homogénat est tamisé progressivement à travers un filtre en nylon de 250 µm, puis 75 µm afin d'éliminer les gros débris. Le filtrat résultant sera clarifié par centrifugation (2500g, 30 min, 4°C) en tubes de 50 ml.

Le culot obtenu est dilué dans l'eau de mer filtrée (EMFT) additionnée de Tween 20 à 5%, et déposé sur un gradient discontinu de sucrose (5% - 35%) en EMFT (5 à 6 ml de chaque phase est placé dans un tube plastique de centrifugation) et centrifugé (2500g, 30 min, 4°C). Les interphases 5/35 et le culot sont récupérés à l'aide d'une seringue et dilués en EMFT puis reculotés. Les interphases 5/35 contiennent les cellules primaires, alors que le culot contient les pansporoblastes. Après comptage sur cellules de Malassez, ces prélèvements sont inoculés aux animaux.

2.2.2 - Inoculation du parasite.

Différents essais d'inoculation de fractions enrichies en parasites ont été réalisés sur des lots d'huîtres provenant de populations saines. Ces essais ont été effectués, soit après anesthésie et ingestion forcée, soit sans anesthésie, par dépôt dans la cavité paléale suivi d'une exondation. Le détail de ces expériences est donné en annexe (cf. annexe 3).

2.3 - Recherche de formes infestantes du parasite.

Trois expériences ont été réalisées afin de préciser la source de contamination de *M. refringens* :

1. Huîtres plates *O. edulis* saines placées seules en zone endémique (claire).
2. Huîtres plates *O. edulis* saines placées en contact d'huîtres plates *O. edulis* parasitées en zone endémique (claire).
3. Huîtres plates *O. edulis* indemnes placées en contact avec des sédiments provenant de zone endémique (claire) en condition expérimentale (bac).

Le détail des protocoles expérimentaux est donné en annexe (cf. annexe 3).

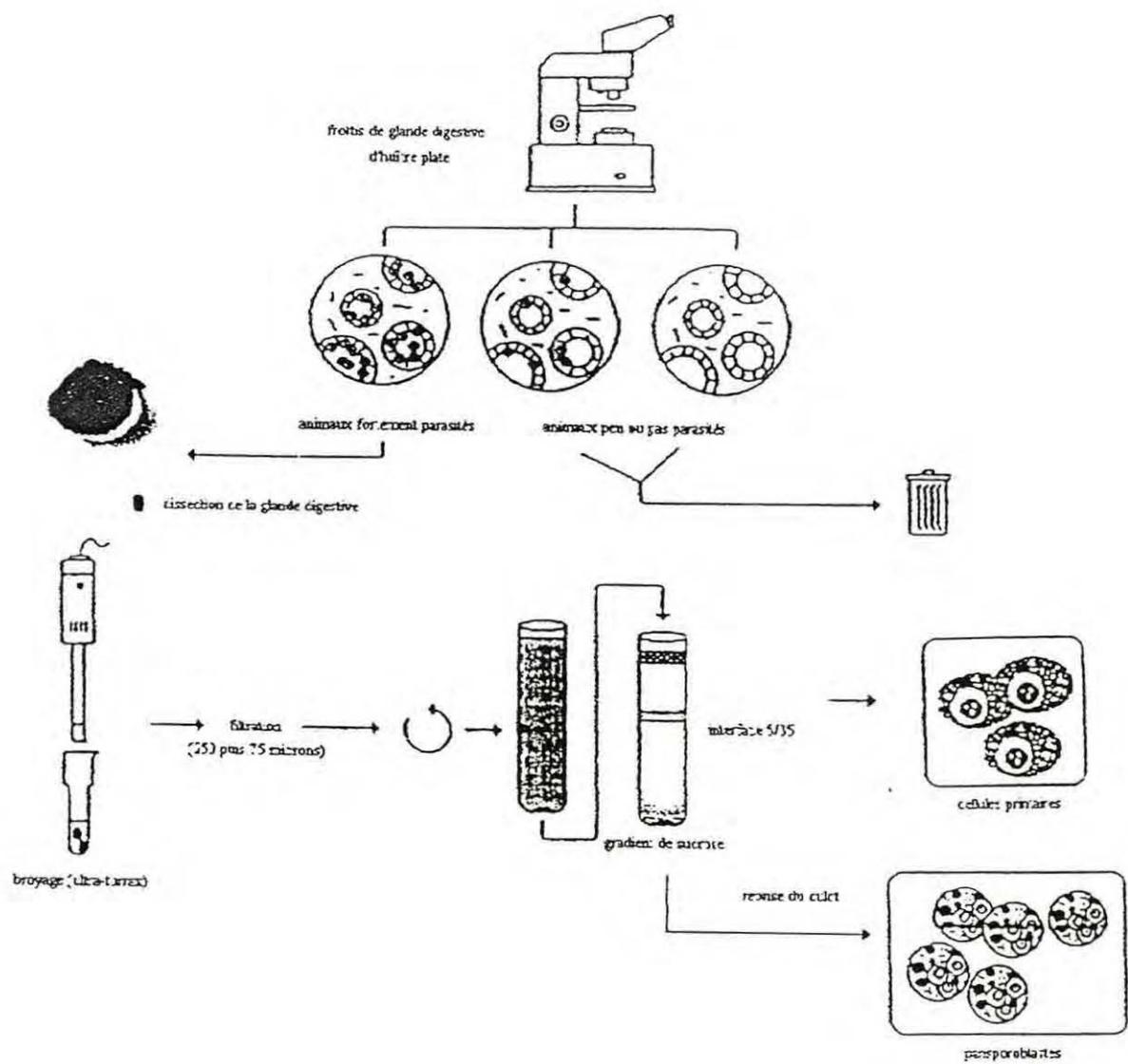


Figure 6 : Protocole d'enrichissement du parasite *M. refringens*.

2.4 - Essais de transmission horizontale de la maladie.

Les présentes expériences reposent sur la mise en présence de lots de trente animaux sains et animaux naturellement contaminés en conditions expérimentales d'élevage (bac). Le protocole détaillé des essais réalisés est donné en annexe (cf. annexe 3).

2.4.1 - Transmission intraspécifique.

Premier bac : trente huîtres plates *O. edulis* saines ont été mises en contact avec trente autres animaux infectées.

Deuxième bac : un lot de trente huîtres plates a été retenu comme témoin négatif.

2.4.2 - Transmission interspécifique.

Premier bac : des lots de trente huîtres plates (*O. edulis*) et moules (*M. edulis* et *M. galloprovincialis*) indemnes, ont été mis en contact avec un lot de trente huîtres plates *O. edulis* infestées.

Deuxième bac : des lots de trente huîtres plates (*O. edulis*) et moules (*M. edulis* et *M. galloprovincialis*) indemnes, ont été placés en contact avec un lot de trente moules infectées (*M. edulis*).

Troisième bac : un lot de trente sujets de chaque espèce, a été retenu comme témoin négatif.

3 - Suivi du cycle parasitaire de *M. refringens* chez *O. edulis*.

Une population de sept cents huîtres plates, *O. edulis*, infestée naturellement a été placée en conditions expérimentales pendant une période de quatre mois, afin de suivre l'évolution du parasite chez cette espèce. L'ensemble du protocole est détaillé en annexe (cf. annexe 3).

B - RESULTATS ET DISCUSSION.

Après avoir présenté dans le chapitre précédent les objectifs de notre étude et exposé notre protocole expérimental, nous tâcherons dans celui-ci de présenter les résultats obtenus à l'issue de ces expériences et de les discuter en se référant aux travaux réalisés précédemment par divers chercheurs.

1 - Techniques d'étude du parasite.

1.1 - Cytologique.

Sur appositions de glande digestive, les premiers stades de développement de *M. refringens* se distinguent nettement des autres cellules par leur aspect en cocarde. Le cytoplasme basophile des cellules prend une couleur bleue et le noyau peu chromophile est de couleur rouge. Les formes matures sont repérables de part leur taille (figure 7). Cette technique de part sa facilité et sa rapidité de réalisation est considérée comme une technique de choix dans le diagnostic de routine de la maladie. Cependant dans le cadre de notre étude, elle présente peu d'intérêt dans la mesure où elle ne permet pas d'observer de formes à localisation extra digestive, ni une observation fine du parasite.

1.2 - Histologique.

Divers colorants topographiques peuvent être utilisés pour ce type d'examen. Ainsi, Grizel *et al.* (1974) et Franc (1980) ont utilisé la coloration de Mann-Dominici et le Trichrome de Masson pour observer les formes jeunes du parasite et l'Azan d'Heindenhein pour l'observation des formes évoluées du parasite. La coloration de Feulgen-Rossenbeck et de Vago-Amargier, ont été également pratiquées et permis respectivement la mise en évidence des noyaux et des inclusions cytoplasmiques. Lors de notre étude, l'examen histologique des tissus d'huître fixés dans le liquide de Davidson et colorés à l'hémalum-éosine (figure 7) et au Giemsa, a permis d'observer avec précision la localisation, la morphologie et la structure du parasite.

1.3 - Caractérisation immunologique.

Les résultats de la caractérisation immunologique des anticorps monoclonaux, sont indiqués ci-dessous dans le tableau 2. Les six anticorps monoclonaux (4/1-1, 3/1-1, 12/5-1, 1/1-3, 9/1-1, 6/2-3), présentés comme spécifiques de notre parasite ont été testés ici. Les anticorps monoclonaux 1/1-3 et 6/2-3 n'ont pas présenté de réaction positive en immunofluorescence sur appositions cellulaires, contrairement aux résultats de Robledo *et al.* (1994). En conséquence, ces anticorps ont été éliminés de l'étude dès cette étape

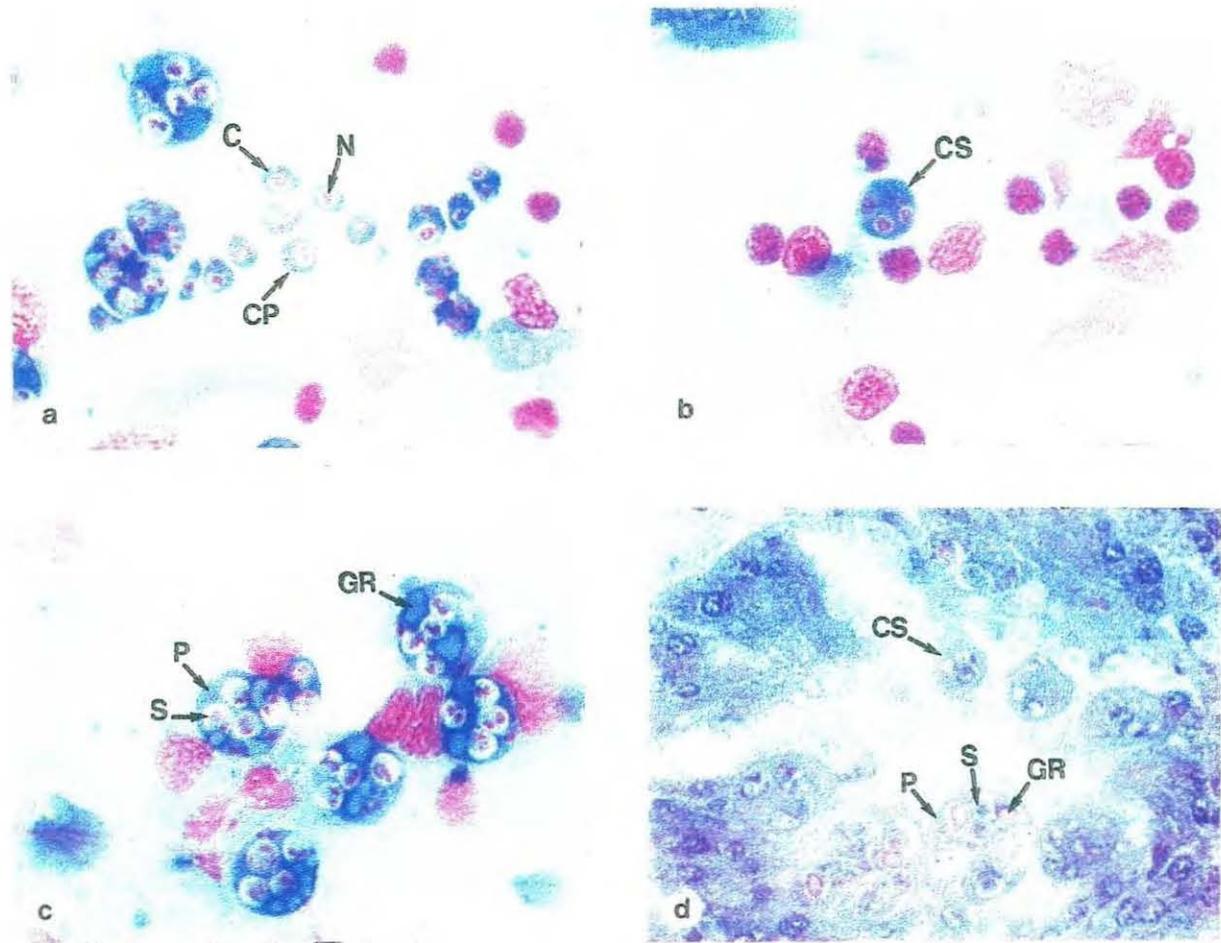


Figure 7 : Huître plate, *O. edulis*, parasitée par *Marteilia refringens*. (a,b,c) : apposition de glande digestive, colorée à l'Hémacolor. (d) : coupe histologique de glande digestive, colorée à l'hémalum-éosine. N : noyau. C : cytoplasme. CP : cellule primaire. CS : cellule secondaire. S : spore. P : pansporoblaste. GR : granule réfringent.

Tableau 2 : caractérisation des anticorps monoclonaux anti *Marteilia*.

Anticorps monoclonaux	IF/ apposition de glande digestive	IF et IP/ cryocoupe de glande digestive	IF et IP/ coupe paraffine de glande digestive
4/1-1	+	+	-
3/1-1	+	+	+
9/1-1	+	+	-
12/5-1	+	+	+/-

Ces résultats permettent de distinguer deux types d'anticorps monoclonaux. Un premier type (4/1-1 et le 3/1-1) s'est révélé spécifique des stades parasitaires matures (pansporoblastes). En effet, les cellules contenant des pansporoblastes présentent un marquage localisé au niveau des membranes sporangiales (figure 8). Par ailleurs, les spores et les granules réfringents situés dans les pansporoblastes ne sont pas marqués.

Le second type d'anticorps, représenté par les anticorps 12/5-1 et 9/1-1, s'avère spécifique des stades jeunes du parasite. L'observation en microscopie, permet également de distinguer un marquage localisé au niveau des membranes de ces formes.

Ces résultats confirment ceux de Robledo *et al.* (1994), cependant les essais de ces anticorps sur coupe paraffine se sont avérés négatifs ou très faiblement positifs. Ainsi, malgré l'utilisation de divers fixateurs (Davidson, Carson, Bouin, Carnoy) et traitement des coupes (trypsine, saponine, triton), pour essayer d'apporter des améliorations au protocole standard, les résultats obtenus n'ont pas permis d'obtenir des marquages satisfaisants. Il semble que ces réactifs immunologiques ne reconnaissent que des structures antigéniques natives. la fixation des tissus peut induire des modifications conformationnelles et détruire les structures antigénique reconnues par ces anticorps.

Au vu de ces résultats, le choix a été fait de mener notre étude sur la base de l'histologie dans la mesure où la cytologie est une méthode trop peu précise et sensible pour notre sujet et où les anticorps monoclonaux disponibles ne nous permettaient pas de discriminer les différentes formes du parasite en immunohistochimie sur coupe paraffine.

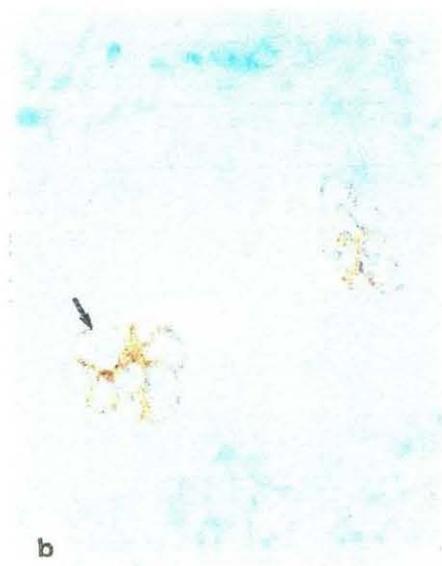
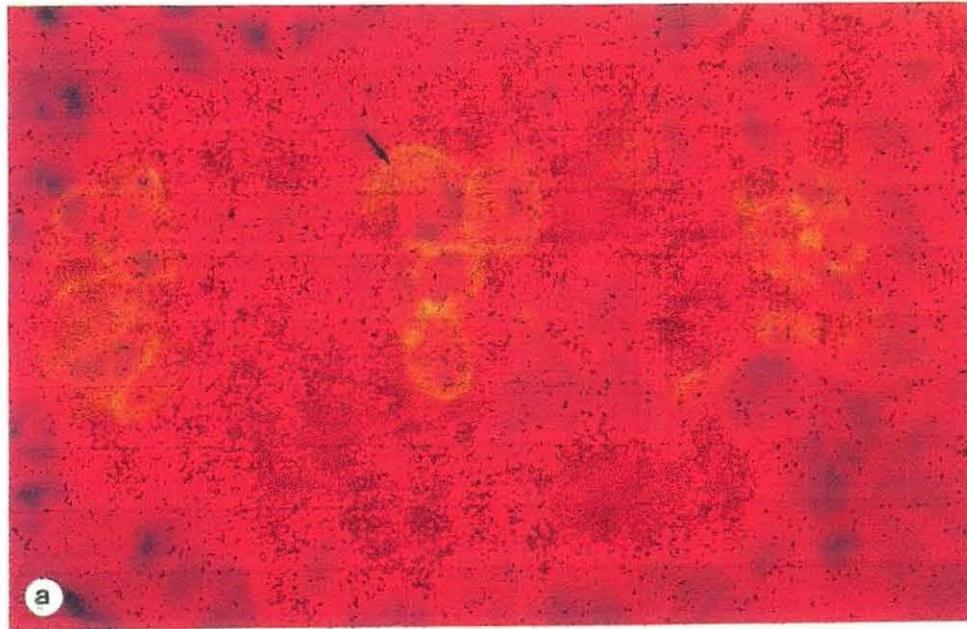


Figure 8: Apposition cellulaire de glande digestive d'huître plate, *O. edulis*, parasitée par *Marteilia refringens*. Marquage du parasite (flèche) en immunofluorescence (a) et en immunoperoxydase (b, c), obtenu avec un anticorps monoclonal anti-*Marteilia* (4/1-1).

2 - Essais de reproduction expérimentale de la maladie.

2.1 - Essais de reproduction artificielle de l'infection.

Aucun des essais réalisés, n'a permis de reproduire la maladie expérimentalement. En effet, l'examen en microscopie photonique de coupes histologiques de glande digestive, n'a pas permis de mettre en évidence la présence du parasite chez les sujets ayant été utilisés au cours de ces expériences. Ces résultats sont en accord avec ceux des différents essais réalisés par Balouet *et al.* (1979) et Figueras (communication personnelle). Cet échec peut s'expliquer, soit par le fait que la voie d'inoculation du parasite ne permet pas d'induire l'infection et conduit le parasite dans une impasse d'un point de vue pathologique, soit que les formes purifiées et utilisées au cours de ces expériences ne sont pas les formes infestantes. Cependant, l'inoculation de broyats de glande digestive d'animaux fortement parasités en formes matures et comprenant toutes les formes du parasite, n'a pas permis d'obtenir une contamination. Il paraît donc possible que la forme infestante ne soit pas hébergée par l'huître, soit qu'il existe une phase de maturation de la forme infestante dans le milieu extérieur, ou bien l'intervention d'un hôte intermédiaire.

2.2 - Recherche de formes infestantes du parasite.

première expérience.

L'observation microscopique de coupes histologiques de glande digestive des sujets placés dans une claire vierge, a permis d'observer après trois mois d'élevage la contamination d'un seul individu. Cependant, un prélèvement réalisé au début du mois d'août, n'a pas permis de distinguer d'individus contaminés. Ce constat peut être expliqué par le fait que lors de l'introduction d'une population saine dans une zone endémique, l'évolution du cycle du parasite est beaucoup plus longue et les délais d'apparition de la maladie peuvent varier d'un à plusieurs mois. Ainsi, prenant compte de ce constat et du taux faible de contamination, des prélèvements seront réalisés dans la saison pour confirmer ces constatations. Des observations similaires ont été décrites par Balouet (1976), dans la zone de Tinduff en rade de Brest et par Grizel (1985), dans les rivières de St-Philibert, de Crach et d'Auray. Cependant, l'introduction de cette population dans une zone endémique où les élevages sont abondants, se traduit par une évolution rapide du parasite et de la maladie. Ces constatations ont été vérifiées par une deuxième expérience mentionnée ci-dessous.

Deuxième expérience.

Une évaluation du niveau d'infestation des huîtres plates, *O. edulis* indemnes, placées en claire à l'île d'Oléron au contact de sujets contaminés, a été réalisée en fin d'expérience après quatre mois de contact. Ainsi, l'examen de coupes histologiques de glande digestive de 30 sujets prélevés aléatoirement, a permis de distinguer un taux d'infestation égal à 95% (18 fortement infestés, 4 moyennement et 6 très faiblement contaminés) et un taux de mortalité cumulé de 50%. Ces résultats confirment ceux de Balouet *et al.* (1979) et Balouet (1976).

Troisième expérience.

L'analyse histologique des individus maintenus en conditions expérimentales au contact avec le sédiment prélevé de cette claire, n'a révélé aucune contamination de ces individus. Ce résultat peut être, soit imputable à la durée relativement courte de contact de ces sujets avec le sédiment, soit à la période de prélèvement du sédiment qui ne correspondait pas à la période d'élimination du parasite dans le milieu extérieur ou bien à l'absence de l'hôte intermédiaire dans ce sédiment.

Ces trois expériences permettent de montrer, la possibilité de contamination des huîtres par proximité en milieu naturel et par simple immersion dans un milieu naturel endémique.

2.3 - Essais de transmission horizontale de la maladie.

2.3.1 - Transmission intraspécifique.

Après une période de contact de quatre mois, l'analyse histologique des individus morts au cours de la manipulation ou sacrifiés en fin d'expérience, n'a indiqué aucune infestation de ces individus. Les résultats observés à J_0 et après quatre mois de contact (fin d'expérience), sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3 : Résultats observés à J_0 et en fin d'expérience (J_{120})

Espèces	<i>O. edulis</i>	<i>O. edulis</i>
Statut initial	Infestées (12/30 - J_0)	Indemnes (0/30 - J_0)
Résultat final	3 / 12	0 / 21

N.B : Les animaux morts en cours d'expérience ne sont pas pris en compte dans le tableau.

Ces résultats confirment ceux obtenus par Balouet *et al.* (1979), et laissent penser essentiellement à l'intervention de facteurs extérieurs, et probablement d'un hôte intermédiaire dans la transmission du parasite, ou bien à la nécessité d'une période de maturation de la forme infestante dans le milieu naturel, comme cela a été déjà supposé par Grizel (1985). Cependant une autre hypothèse peut être donnée : les animaux infectés n'ont pas relargué de formes infestantes durant l'expérience.

2.3.2 - Transmission interspécifique.

L'examen en microscopie photonique de glande digestive des coquillages mis en contact les uns avec les autres, ne peut permettre de conclure à une transmission horizontale directe du parasite. Les résultats observés au niveau des trois bacs sont représentés dans les tableaux 4, 5 et 6.

La présence de sujets d'huîtres plates, *O. edulis*, infestés dans le premier et second bacs s'explique essentiellement par le fait que ces individus étaient préalablement contaminés. Cette hypothèse est confirmée par la mise en évidence d'individus contaminés dans le lot des témoins négatifs.

La mise en évidence du parasite chez un seul individu de l'espèce *M. galloprovincialis*, ne permet pas de considérer ce dernier comme sujet ayant été contaminé au cours de l'expérience. D'une part par le fait qu'après quatre mois de contact avec des huîtres et des moules contaminées, ce taux d'infestation est très faible. D'autre part, aucun individu de cette espèce ne s'est révélé positif dans les autres bacs. Il nous paraît donc probable que cet individu était dès le début de la manipulation infesté. Le taux bas d'infestation de cette population ayant pu passer lors de l'examen initial pour un taux nul.

Comps (1980), avait observé à l'issue d'une expérience de transmission du parasite *M. refringens* d'huîtres contaminées vers des moules *M. galloprovincialis*, une contamination de deux individus de cette espèce. Mais, ce dernier a considéré que ces individus avaient simplement captés le parasite et qu'ils ne pouvaient constituer des hôtes spécifiques du parasite.

Tableau 4 : Les résultats observés dans le premier bac.

Espèces	<i>O. edulis</i>	<i>O. edulis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>
Statut initial	Infestée	Indemne	Indemne	Indemne
Résultat final	10/22	5/30	0/30	0/28

Tableau 5 : Les résultats observés dans le second bac.

Espèces	<i>M. edulis</i>	<i>O. edulis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>
Statut initial	Infestée	Indemne	Indemne	Indemne
Résultat final	12/29	5/30	1/27	0/29

Tableau 6 : Résultats de l'observation des témoins négatifs (troisième bac).

Espèces	<i>M. edulis</i>	<i>O. edulis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>
Résultat final	0/30	12/30	0/30

3 - Suivi du cycle parasitaire de *M. refringens* chez *O. edulis*.

A l'issue de quatre mois de suivi des animaux en conditions expérimentales, les résultats de l'ensemble de nos observations sont notés dans le tableau suivant.

Tableau 7 : Résultats du suivi du cycle parasitaire.

Rang de prélèvement	Date de prélèvement	Mortalité cumulée	T° Moyenne	% infection	Formes jeunes	Formes matures	Branchies	Estomac	Glande digestive
1	29/4/96	124	10°C	20/30 (66%)	4/30 (13%)	16/30 (53%)	0/30 (0%)	14/30 (46%)	19/30 (63%)
2	13/5/96	162	11°C	17/30 (56%)	2/30 (6%)	15/30 (50%)	1/30 (3%)	11/30 (36%)	17/30 (56%)
3	28/5/96	192	11°C	18/30 (60%)	2/30 (6%)	16/30 (53%)	5/30 (16%)	17/30 (56%)	16/30 (53%)
4	10/6/96	220	17°C	16/30 (53%)	2/30 (6%)	14/30 (46%)	3/30 (10%)	15/30 (50%)	16/30 (53%)
5	25/6/96	306	22°C	11/30 (36%)	0/30 (0%)	11/30 (36%)	1/30 (3%)	11/30 (36%)	11/30 (36%)
6	8/7/96	328	21°C	6/30 (20%)	0/30 (0%)	6/30 (20%)	0/30 (0%)	6/30 (20%)	6/30 (20%)
7	21/7/96	342	22°C	6/30 (20%)	1/30 (3%)	5/30 (16%)	0/30 (0%)	6/30 (20%)	6/30 (20%)
8	5/8/96	345	23°C	3/30 (10%)	2/30 (6%)	1/30 (3%)	0/30 (0%)	3/30 (10%)	3/30 (10%)

Les principaux points à retenir de cette manipulation sont : d'une part le taux important de mortalité observé au cours de notre expérience (figure 9). D'autre part, le pourcentage d'infection, qui diminue au cours du temps (figure 10). Ce taux est passé de 66% à température égale à 10°C en début de manipulation, à un taux égal à 10% avec une température de 23°C en fin d'expérience. La réalisation des tests statistiques de comparaison de pourcentages d'infection observés en début et en fin d'expérience (test des écarts réduits), a permis de confirmer notre hypothèse et d'indiquer une différence significative entre les deux pourcentages au seuil de risque conventionnel de 5%. De même, dans le but de démontrer la décroissance réelle du taux d'infection, le test statistique de régression a permis d'obtenir, un intervalle de confiance de la pente compris entre $(-0,562 \pm 0,153)$, avec un risque relatif de 5%. Les valeurs de l'intervalle de confiance, étant strictement négatives indiquent une décroissance réelle du phénomène d'un point à un autre et qui tend à s'éteindre avec le temps. Le taux d'infection évolue parallèlement avec les pourcentages des diverses formes du parasite localisées au niveau des branchies, de l'estomac et des diverticules digestifs. Cependant, il est impossible de conclure, quant au rôle de la température dans ces phénomènes, même si celle-ci semble jouer un rôle important (cf. figure 9 et 10).

L'élimination de l'agent infectieux dans le milieu extérieur, ne semble pas entraîner la contamination des autres individus présents dans le même environnement, si l'on considère le taux d'infestation et le taux de formes jeunes au cours de l'expérience. Ce pourcentage diminue graduellement et devient nul au cours des prélèvements 5 et 6. Cependant il réaugmente au cours du dernier mois. Cette réaugmentation peut être interprétée comme une réinfestation des sujets sains, mais la réalisation de test statistique (test des écarts réduits), n'a pas indiqué de différence significative entre le pourcentage d'infection observé en début et en fin d'expérience. De plus, contrairement aux expériences réalisées ici, celles entreprises dans le milieu naturel et en zone endémique au parasite, ont permis d'observer des contaminations rapides (environ 3 semaines) à des niveaux d'infestation importants et relativement constants. Ainsi, il semble que dans notre expérience la tendance soit à un épuisement en parasite dans la population. Pour qu'il y ait infestation, entretien et transmission du parasite dans une population, l'intervention d'un hôte intermédiaire ou d'une phase de maturation dans le milieu naturel s'avèrerait nécessaire. Ces constatations ne constituent là que de simples hypothèses.

En ce qui concerne les stades parasitaires observés chez les sujets examinés, le premier constat à faire est l'observation dès le premier prélèvement d'un taux important de formes matures par rapport au formes jeunes. Ces observations correspondent à la description des stades évolutifs du cycle de développement du parasite (Grizel, 1976 ; Franc, 1980), et aux expériences de Balouet *et al.* (1979), selon lesquels, les formes infectieuses représentées par les formes jeunes sont essentiellement observées en hiver, alors que les formes matures prédominent à partir des mois d'avril et mai. Quant à la localisation de ces différentes formes parasitaires, nos observations confirment les travaux réalisés précédemment par Grizel (1976) et Franc (1980).

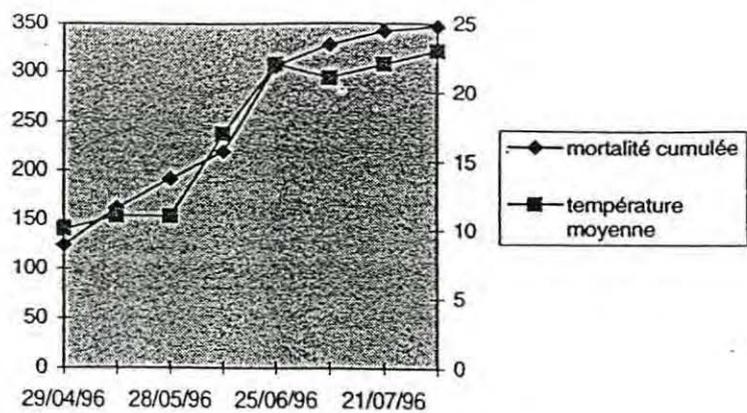


Figure 9 : Evolution de la mortalité et de la température en fonction du temps.

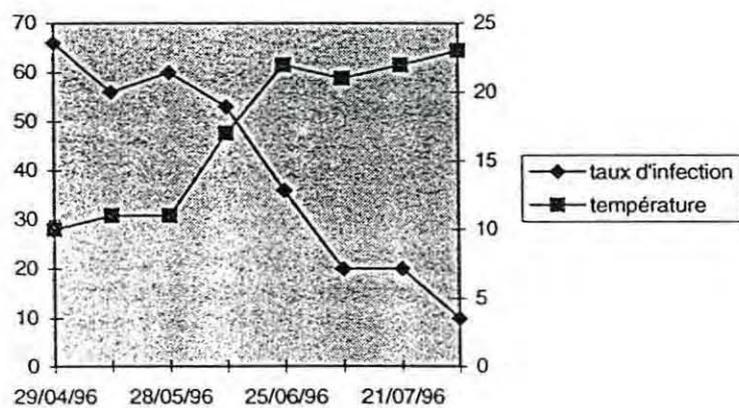


Figure 10 : Evolution du taux d'infection et de la température en fonction du temps.

Conclusion.

Au terme de ces expériences, les principaux points à retenir sont :

- La contamination d'animaux sains est possible en milieu naturel au voisinage d'animaux infectés.
- La contamination d'animaux sains est possible en les plaçant seuls dans une zone endémique.
- La contamination d'animaux sains n'a pu être réalisée en conditions expérimentales par proximité. Ceci laisse à penser que l'huître, elle-même, n'héberge pas la forme infestante. Ce constat est vérifié par l'inoculation sans succès de fractions enrichies en parasite et de broyat de glandes digestives fortement infestées.
- La dynamique du parasite dans une population naturellement infestée et placée en conditions expérimentales montre que cette population élimine le parasite sans réinfestation. Ce constat vient étayer l'hypothèse d'un hôte intermédiaire obligatoire dans le cycle de *Marteilia refringens*, ou d'un rôle de l'environnement pouvant constituer une source d'infection après maturation du parasite.

L'hypothèse d'un hôte intermédiaire semble donc réaliste et étayée par mes travaux mais nécessite la mise en évidence de cet hôte pour la confirmer.

ANNEXE 1

La conchyliculture en France et dans le monde.

La conchyliculture mondiale connaît depuis les deux dernières décennies une progression régulière de ses productions. Les données économiques émanant d'organisations internationales impliquées dans le développement de l'aquaculture (FAO : Food and Alimentation Organisation; CIEM : Comité International pour l'Exploitation de la mer) révèlent le rôle et l'importance de cette activité. En effet, cette activité, basée essentiellement sur l'élevage d'un nombre limité d'espèces de mollusques bivalves marins (tableau 8), occupe actuellement, derrière la pisciculture et la pénéculture, la troisième position des productions aquacoles mondiales.

La conchyliculture, avec 3.500.000 tonnes de produits mis sur le marché annuellement, répartis sur 1.200.000 tonnes de moules, 1000.000 tonnes d'huîtres, 800.000 tonnes de coques et 600.000 tonnes de coquilles Saint-Jacques, représente un chiffre d'affaires d'environ 3.700.000 dollars. Les grands pays producteurs, sont essentiellement les Etats-Unis (123.910 tonnes) et le Canada (10.898 tonnes) en Amérique du nord ; le Japon (454.342 tonnes) et la Corée du Sud (338.846 tonnes) en Asie ; la France (197.845 tonnes), la Hollande (52.600 tonnes) et l'Espagne (145.340 tonnes) en Europe.

La conchyliculture française, avec ses grands bassins ostréicoles de Marennes-Oléron, de Bretagne, d'Arcachon et de Thau, représente une importante activité qui contribue au développement harmonieux du littoral. En effet, celle-ci concerne environ 10.000 entreprises créatrices d'emplois permanents et saisonniers, autour de 10.000 personnes pour le seul département de la Charente Maritime. La conchyliculture française dégage à l'élevage un chiffre d'affaire de 2344 milliards de francs sur la base des productions suivantes: des huîtres creuses 140.000 t/an, prix 11ff/kg ; moules 80.000 t/an, prix 7FF/kg ; huîtres plates 2000 t/an, prix 40FF/kg ; palourdes 600 t/an, 40FF/Kg .

Cette activité contribue également au développement de certaines activités en amont tels la fabrication de bateaux, de moteurs et de matériels ostréicoles divers. La conchyliculture joue un important rôle social en contribuant au maintien permanent du tissu social dans les communes littorales tout en favorisant l'épanouissement des activités secondaires. Ainsi, la conchyliculture est une activité qui garantit l'enracinement des populations et qui pérennise la vie des communes littorales, évitant leur désertification et la création de zones de vacances fantômes peuplées uniquement deux mois sur douze.

Tableau 8 : Principales activités conchylicoles et espèces de bivalves marins élevées en France.

FAMILLES	NOM SCIENTIFIQUE	NOM VERNACULAIRE	ACTIVITES
<i>Ostreidea</i>	<i>Crassostrea gigas</i> , <i>Crassostrea angulata</i> <i>Ostrea edulis</i>	Huître creuse ou Japonaise. Huître Portugaise Huître plate européenne	Ostréiculture
<i>Mytilidea</i>	<i>Mytilus edulis</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Moule commune Moule bleu Moule de Méditerranée	Mytiliculture
<i>Pectinidea</i>	<i>Chlamys varia</i> <i>Chlamys opercularis</i> . <i>Pecten maximus</i> . <i>Pecten jacobaeus</i>	Pétoncle bigarré Pétoncle operculaire Coquille St-Jacques de l'Atlantique Coquille St-Jacques de Méditerranée	Pectiniculture
<i>Veneridea</i>	<i>Mercenaria mercanaria</i> <i>Ruditapes decussatus</i> <i>Puditapes philippinarum</i>	Clam commune Palourde Américaine Palourde croisée clovisse Palourde japonaise	Venericulture

ANNEXE 2

Protocoles Techniques

1 - Méthodes histologiques.

L'examen histologique permet de préciser la localisation du parasite, ses effets histopathologiques et sa morphologie, et apporte également des précisions sur sa structure. La préparation des tissus en vue de cet examen comporte différentes étapes.

- Fixation des tissus
- Déshydratation, imprégnation et inclusion des échantillons
- Confection des coupes
- Coloration et montage des lames

1.1 - Fixation des tissus

Le fixateur a pour rôle de maintenir les tissus dans un état aussi proche que possible de leur morphologie *in vivo* et de conserver les tissus pour qu'il ne se dégradent pas avec le temps. Les principaux fixateurs utilisés pour l'étude des mollusques marins sont le Davidson et le Carson, ils sont respectivement des solutions de formol salée et tamponnée. Le liquide de Bouin peut également être utilisé pour des applications particulières.

Composition du liquide de Davidson :

Eau de mer	1200 ml
Alcool à 95°	1200 ml
Formaldéhyde à 38%	300 ml
Glycérol	400 ml
Acide acétique cristallisable	10% (ajouter extemporanément)

Le liquide de Davidson, du fait de sa composition à base d'eau de mer, permet de bien préserver la structure des tissus. De plus, les coupes de tissus fixés au Davidson peuvent être colorées ultérieurement par des méthodes histochimiques telles que la méthode de Feulgen et Rossenbeck ou la coloration à l'acridine orange.

Composition du liquide de Carson :

NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	23,8 g
NaOH	5,2 g
Eau distillée	900 ml

Formaldéhyde à 40% 100 ml
Ajuster le pH à 7,2 - 7,4

Le liquide de Carson est parfois considéré comme moins approprié que le Davidson pour l'analyse d'échantillons en histologie. Toutefois, il permet une bonne conservation de l'ultrastructure et est principalement utilisé pour conserver les échantillons susceptibles d'être analysés ultérieurement en microscopie électronique.

Composition du liquide de Bouin :

Acide picrique	20 g
Eau distillée	750 ml
Formaldéhyde à 38%	250 ml
Acide acétique cristallisable	5% (ajouter extemporanément)

Ce fixateur a des propriétés décalcifiantes et est donc utilisé pour la fixation des jeunes naissains ou des larves d'huître. Ces animaux, trop petits pour être disséqués doivent en effet être fixés avec leur coquille. Après quelques jours de fixation dans le liquide de Bouin, la décalcification permet alors de ramollir suffisamment les coquilles pour réaliser des coupes.

1.2 - Déshydratation, imprégnation et inclusion des échantillons.

L'inclusion des pièces en paraffine nécessite différentes étapes qui vont permettre d'éliminer progressivement l'eau contenue dans les tissus et de la remplacer dans un premier temps par de l'alcool, puis du xylène et enfin par de la paraffine.

Après fixation au Carson ou au Davidson, 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 contenu dans les tissus et facilite l'imprégnation ultérieure par la paraffine liquide à 60°C. Ces opérations sont réalisées à l'aide d'un automate LKB.

Après fixation au Bouin, la déshydratation est réalisée par des bains successifs de butanol. Cet alcool étant un solvant de la paraffine, l'imprégnation par des bains de paraffine liquide (à 60°C) est réalisée directement après la déshydratation.

Des blocs sont réalisés en refroidissant les tissus dans des moules métalliques remplis de paraffine, sur une table réfrigérante (LKB).

1.3 - Confection des coupes.

Après refroidissement des blocs sur une plaque réfrigérée qui permet de durcir la paraffine, des coupes histologiques de 2 à 3 µm 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 histologiques, égouttées et séchées une nuit à 60°C. Ce séchage à chaud permet d'éliminer l'excès de paraffine et ainsi de coller les coupes sur les lames histologiques.

1.4 - Coloration et montage des lames.

Avant coloration, les coupes sont déparaffinées par deux bains successifs de xylène de dix à vingt minutes. Ce solvant est ensuite éliminé par deux bains d'éthanol absolu de dix minutes, puis les coupes sont réhydratées par un bain d'eau courante pendant dix minutes. Différentes colorations topographiques ou histochimiques peuvent être réalisées.

Coloration topographique à l'hémalum-éosine

L'hémalum permet de colorer les structures nucléaires ou basophiles en bleu à violet foncé, les ergastoplasmes sont bleus et les cytoplasmes prennent une teinte grise. La coloration des autres structures en rose est réalisée par un colorant acide, l'éosine. La mise en oeuvre de cette coloration est simple et reproductible. Cette technique ne permet qu'une différenciation limitée des structures. Toutefois, elle permet d'observer les tissus au microscope photonique et de noter les éventuelles anomalies dans les structures tissulaires et cellulaires.

Préparation des réactifs

<u>Hémalum</u> :	Hématoxyline	4 g
	Alcool à 95°	200 ml
	Potassium aluminium sulfate	11 g
	Eau distillée	200 ml
	Glycérol	200 ml
	Acide acétique	20 ml
	Iodate de potassium	0,8 g (ou KMnO : 4,07 g)

Dissoudre l'hématoxyline dans l'alcool.

Dissoudre l'alun de potassium dans l'eau distillée.

Mélanger les deux solutions et ajouter les autres constituants dans l'ordre énuméré.

<u>Eosine</u> :	Eosine	2,5 g
	Eau courante	250 ml

Coloration des coupes

Xylène	2 bains de 15 min
Ethanol absolu	2 bains de 15 min
Hémalum	30 sec
Rincer à l'eau courante	10 minutes
Eosine	3 min 30 sec
Ethanol absolu	3 bains de 2 min
Xylène	2 bains de 10 min
Monter sous lamelle avec une goutte de résine Eukitt	

Coloration au GIEMSA.

Cette méthode, valable uniquement sur des pièces fixées au Davidson, offre des résultats très satisfaisants et les préparations montrent une riche gamme de couleurs. Les bactéries, les rickettsies et les parasites protozoaires se colorent en bleu foncé, le noyau et l'ergastoplasme en bleu. Les cytoplasmes des cellules vivantes au moment de la fixation sont de couleur bleu clair, alors que celui des cellules nécrotiques est rose foncé. L'équilibre de ces couleurs est déplacé vers le rouge par l'abaissement du PH et vers le bleu lors de son élévation.

Préparation des réactifs :

Solution A : Acide citrique 0,1 M

Dissoudre l'acide citrique dans 750 ml d'eau distillée et compléter à un litre avec du méthanol.

Solution B : Phosphate dissodique 0,2 M (NaH_2PO_4)

Dissoudre le phosphate dissodique dans 750 ml d'eau distillée et compléter à un litre avec du méthanol.

Eau de rinçage :

Solution A	: 20 ml
Solution B	: 30 ml
Eau distillée qsp	: 1l

Coloration des coupes

Xylène :	3 bains de 5 min
Ethanol absolu :	2 bains de 5 min
Rincer à l'eau courante :	15 min
Giemsa stock :	05min
Rinçage :	2 ou 3 immersions rapide dans l'eau de rinçage tamponnée.
Ethanol absolu :	5 à 10 sec
Xylène :	2 bains de 10 min
Monter sous lamelle sous goutte de résine Eukitt	

2 - Methodes immunologiques.

2.1 - Immunofluorescence indirecte

Les tests en immunofluorescence indirecte sont réalisées sur apposition de glande digestive, cryocoupes et coupes paraffinées fixées au Carson ou au Davidson. Les anticorps à tester sont déposés sur les lames après déparaffinage et réhydratation. Après incubation avec le premier anticorps, l'anticorps secondaire marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine est à son tour déposé sur les lames. Après montage des lames en glycérine, l'observation est effectuée à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

Réactifs

Tampon phosphate (PBS)

NaCl	9 g/l
Na ₂ HPO ₄ anhydre	1,48 g/l
KH ₂ PO ₄	0,43 g/l
Ajuster le pH à 7,2	

Le tampon phosphate peut être préparé dix fois plus concentré, il peut alors être conservé à 4°C et être dilué dix fois avant l'utilisation.

Réactifs de saturation

Lait écrémé en poudre (Régilait)

Protocole.

- 1 - L'immunofluorescence est réalisée sur coupes déparaffinées et réhydratées, appositions cellulaires et cryocoupes.
- 2 - Laver les lames deux fois dix minutes en PBS.
- 3 - Saturer 60 minutes en PBS additionné de Régilait (6%).
- 4 - Incuber à température ambiante pendant une heure avec le premier anticorps dilué (1/100^e à 1/1000^e) en PBS.
- 5 - Laver deux fois dix minutes en PBS.
- 6 - Incuber une heure à l'abri de la lumière avec le deuxième anticorps (conjugué à la fluorescéine) dilué au 1/100 en PBS additionné de 1% de bleu d'Evans.
- 7 - Laver trois fois dix minutes en PBS.
- 8 - Monter les lames sous lamelle, avec une goutte de tampon glyciné (Pasteur).
- 9 - Observer au microscope à épifluorescence : le bleu d'Evans masque l'éventuelle fluorescence native des cellules et permet d'obtenir une coloration de fond rouge, la fluorescéine permet de visualiser la localisation des anticorps par une émission de fluorescence verte.

2.2 - Immunoperoxydase.

La technique d'immunoperoxydase est comparable à celle de l'immunofluorescence indirecte. Cependant, l'anticorps secondaire est conjugué avec une enzyme, la peroxydase, et permet par l'intermédiaire d'un substrat chromogène de mettre en évidence la présence et la localisation de l'antigène. Le substrat chromogène utilisé est la diaminobenzidine (DAB) : il s'oxyde et donne un substrat coloré qui sert de marqueur. La coloration obtenue est de couleur brune.

Réactifs

DAB :

Diaminobenzidine : 120 mg

H₂O₂ (30 %) : 60 ul

Tampon Tris : 200ml

Protocole

- 1 - Déparaffiner par deux bains de xylène de dix à vingt minutes.
- 2 - Eliminer le xylène par deux bains d'éthanol absolu de dix minutes.
- 3 - Inhiber les peroxydases endogènes par un bain de 15 minutes en méthanol (200 ml contenant 600 µl d'H₂O₂).
- 4 - Réhydrater et laver par deux bains de dix minutes en PBS
- 5 - Démasquer les antigènes en incubant 30 minutes avec de la trypsine (Gibco 1:250; 0,25% en PBS). Etape facultative.
- 6 - Saturer 1h en PBS additionné de Régilait (6%).
- 7 - Incuber 60 minutes avec le premier anticorps dilué (1/100^e à 1/1000^e) en PBS.
- 8 - Laver deux fois dix minutes en PBS.
- 9 - Incuber une heure à l'abri de la lumière avec le deuxième anticorps (conjugué à la peroxydase) dilué au 1/250^e à 1/400^e en PBS.
- 10 - Laver deux fois dix minutes en PBS.
- 11 - Révéler pendant dix minutes, à l'aide d'un substrat chromogène de la peroxydase (DAB).
- 12 - Laver deux fois 5 minutes en eau distillée.

Intensification

Si nécessaire, la coloration à la DAB peut être intensifiée par un bain de 20 minutes en acide osmique à 0,1%, puis les lames sont rincées trois fois cinq minutes en eau distillée.

Contre coloration

Une contre coloration peut être réalisée. Elle permet de visualiser les tissus plus facilement.

- 1 - Plonger les lames trois secondes dans le Bleu de Unna.
- 2 - Laver 10 à 30 secondes en eau distillée contenant une goutte d'acide acétique.
- 3 - Laver 10 à 30 secondes en éthanol 95°
- 4 - Laver 10 à 30 secondes en éthanol absolu
- 5 - Placer les lames dans le Xylène

Montage des lames

- 1 - Déshydrater 10 à 30 secondes en éthanol absolu
- 2 - Rincer 10 à 30 secondes en xylène
- 3 - Monter sous lamelle avec une goutte de résine Eukitt, avant d'observer au microscope photonique.

ANNEXE 3

Plans d'expérience

1 - Essais de reproduction expérimentale de la maladie.

1.1 - Essai de reproduction artificielle de l'infection.

1.1.1 - Inoculation du parasite.

Les huitres plates concernées par cette manipulation provenaient de la région de Sète (Méditerranée). Après une période d'adaptation au laboratoire, les animaux ont été repartis en trois lots sur lesquels ont été réalisés des essais d'inoculation et d'ingestion forcée du parasite. Les animaux testés sont remis dans leur bacs et maintenus pendant une période de un mois et demi (13 juillet - 28 août).

pour le premier lot :

Les huitres plates de ce lot, ont été inoculés avec *M. refringens* par ingestion forcée. Après anesthésie au $MgCl_2$ (50g de $MgCl_2$ par litre d'eau de mer), une partie de ce lot d'animaux s'est vu déposer au niveau de la bouche et à l'aide d'une canule $5,5 \cdot 10^6$ cellules contenant des pansporoblastes, alors que l'autre partie était inoculée avec $6,6 \cdot 10^6$ cellules primaires.

Pour le deuxième lot :

Les animaux de ce lot, ont été soumis au même protocole que ceux du premier, mais aucune anesthésie n'a été appliquée sur ces sujets et le dépôt du parasite à l'intérieur de la cavité paléale était suivi d'une exondation de deux heures.

Pour le troisième lot :

Les sujets de ce lot, ont été inoculés avec du broyat de glande digestive provenant d'animaux fortement infestés par *M. refringens*. Comme ceux du précédent lot, les sujets n'ont subi aucune anesthésie et le dépôt du broyat à l'intérieur de la cavité paléale était suivi d'une exondation de deux heures.

1.2 - Recherche de formes infestantes du parasite.

Pour rechercher les formes infestantes du parasites, trois expériences ont été réalisées. en milieu naturel et en conditions expérimentales.

La première expérience.

Au mois de mars 1996, des huîtres plates *O. edulis* (banc d'Angoulin, la Rochelle) indemnes de *M. refringens*, ont été immergées seules en claire à l'île d'Oléron, zone endémique pour le parasite *M. refringens*. Des prélèvements ont été réalisés ultérieurement pour évaluer le niveau d'infestation de ces animaux et rechercher les formes infestantes.

La seconde expérience.

Un lot de 110 huîtres plates *O. edulis*, indemnes (banc d'Angoulin, la Rochelle), a été placé en contact avec des huîtres infestées dans une zone endémique (claire), située dans la même zone que la précédente expérience. Les animaux ont été maintenus en ces conditions pendant une période de quatre mois (juillet - octobre).

La troisième expérience.

L'expérience consistait à placer dans des conditions expérimentales des huîtres plates, *O. edulis*, indemnes (banc d'Angoulin, la Rochelle) au contact de sédiments prélevés de zone endémique (claire).

Dans un premier bac.

Au niveau de ce bac, trente huîtres plates originaires du banc d'Angoulin (la Rochelle), ont été retenues comme étant des témoins négatifs.



Dans un second bac.

Deux lots de trente huîtres chacun, ont été placés en contact avec les sédiments. Le premier lot a été maintenu pendant une période d'un mois, alors que la période de contact du second lot a été prolongée à un mois et demi.



1.3 - Essais de transmission horizontale de la maladie.

1.3.1 - transmission intraspécifique.

Dans un premier bac.

Un lot de trente huîtres plates, *O. edulis*, originaire du banc d'Angoulin (La Rochelle), a été placé au contact de trente autres huîtres plates *O. edulis*, fortement infestées et provenant de l'aber Wrach (Bretagne), pendant une période de quatre mois. La température de l'eau a été augmentée de 15°C à 24°C pendant la première semaine, puis maintenue à 24°C jusqu'à la fin de la manipulation.



Dans un second bac.

Trente huîtres plates (Banc d'Angoulin, la Rochelle) ont été retenues comme témoins négatifs.



3.2 - Transmission interspécifique.

Les expériences ont été menées dans trois bacs expérimentaux, permettant un élevage correct des animaux. La température de l'eau fut augmentée de 15°C à 24°C durant les premiers jours de l'expérience, puis maintenue à 24°C jusqu'à la fin de la manipulation.

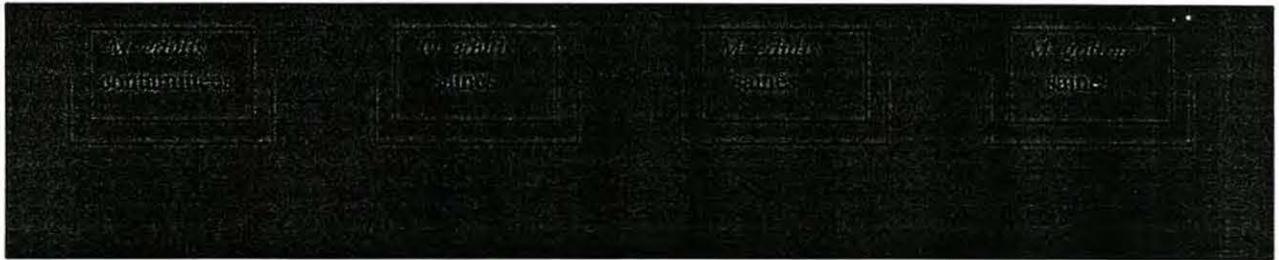
Dans le premier bac.

Un lot de trente huîtres plates *O. edulis* fortement parasitées originaires de l'aber Wrach (Bretagne), était mis au contact de trente huîtres plates, *O. edulis* (Sète, Méditerranée), moules *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (Etang de Thau, Méditerranée).



Dans le deuxième bac.

Un lot de trente moules *M. edulis* infestées par *M. sp* provenant de la Trinité sur Mer (Bretagne), était placé au contact de trente huîtres plates, *O. edulis* (Sète, Méditerranée), moules, *M. edulis* (Royan, Charente Maritime) et *M. galloprovincialis* (Etang de Thau, Méditerranée).



Dans le troisième bac.

Des lots de trente sujets de chaque espèce ont été retenus comme témoins négatifs.



2 - Suivi du cycle parasitaire de *M. refringens* chez *O. edulis*.

Une population de Sept cents huîtres plates, *O. edulis*, originaire de l'aber Wrach (Bretagne), prélevée durant l'hiver et infestée naturellement, a été placée à partir du mois d'avril dans un bac expérimental, pendant une période de quatre mois. La température de l'eau était mesurée quotidiennement et trente sujets étaient prélevés tout les quinze jours en vue de suivre l'évolution du cycle parasitaire chez cette espèce.



BIBLIOGRAPHIE

- Balouet, G., Cahour, A., & Chastel, C. (1977). Epidémiologie de la maladie de la glande digestive de l'huître plate : hypothèse sur le cycle de *Marteilia refringens*. *Haliotis*, 8, 323-326.
- Balouet, G., Chastel, C., Cahour, A., Quillard, A., & Poder, M. (1979). Etude épidémiologique et pathologique de la maladie de l'huître plate en Bretagne. *Science et pêche*, 289, 13-23.
- Bonami, J.R., Grizel, H., Vago, C., & Duthoit, J.L. (1971). Recherches sur une maladie épizootique de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. *revue des travaux de l'institut des pêches maritimes*, 35, 415-418.
- Cahour, A.; (1979). *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. *Marine Fisheries Review*. 19-20.
- Comps, M. (1975). Etude expérimentale de différentes conditions de milieu sur le comportement du parasite de la glande digestive de l'huître plate (*Ostrea edulis* L.). *Haliotis*, 5, 68-74.
- Comps, M., Grizel, H., Tigé, G., & Duthoit, J.L. (1975). Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule*. *C R Acad Sc Paris Serie D*, 281, 179-181.
- Comps, M., & Joly, J.P. (1980). Contamination expérimentale de *Mytilus galloprovincialis* LMK par *Marteilia refringens*. *Science et pêche*, 301, 19-21.
- Desportes, I., & Ginsburger-Vogel, T. (1977a). Affinités du genre *Marteilia*, parasites d'huîtres (maladie des Abers) et du crustacé *Orchestia gammarellus* (Pallas), avec les Myxosporidies, Actinomyxidies et Paramyxidies. *C R Acad Sc Paris Série D*, 285, 1111-1114.
- Figueras, A.J., & Robledo, J.A.F. (1993). Does the *Marteilia* present in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) infect flat oysters (*Ostrea edulis*)? *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 13, 97-99.
- Franc, A. (1980). Sur quelques aspects inédits du cycle de *Marteilia refringens* Grizel et col. 1974, parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Cahiers de Biologie Marine*, 21, 99-106.
- Ginsburger-Vogel, T., Desportes, I., & 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 série D*, 283, 939-941.
- Grizel, H. (1975). Développement et cycle du parasite responsable de l'épizootie de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Haliotis*, 5, 61-67.

Grizel, H., (1979). *Marteilia refringens* and oyster disease-recent observations. Marine Fisheries Review, 38-39.

Grizel, H., Comps, M., Bonami, J.R., Cousserans, F., Duthoit, J.L., & Le pennec, M.A; (1974). Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linne. Science et pêche, 240, 7-29.

Grizel, H., Comps, M., Cousserans, F., Bonami, J.R., & Vago, C. (1974). Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. C R Acad Sc Paris Série D, 279, 783.

Grizel, H., & Tigé, G.(1977). Observations sur le cycle de *Marteilia refringens*. Haliotis, 8, 327-330.

Herrbach, B.(1971). Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linne.Revue des travaux de l'institut des pêches Maritimes, 35, 79-87.

Mialhe, E., Bachere, E., Le Bec, C., & Grizel, H.(1985). Isolement et purification de *Marteilia* (*Protozoa* : *Ascetospora*) parasites de bivalves marins. C R Acad Sc Paris série III, 301, 137-142.

Morel, M., & Tigé, G.(1974). Maladie de la glande digestive de l'huître plate. Etude histochimique. Science et pêche, 241, 33-36.

Perkins, F.O. (1976). Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen, *Marteilia refringens*-Taxonomic implication. Journal of Protozoology, 23, 64-74.

Robledo, J.F., Boulo, V., Mialhe, E., Desprès, B., & Figueras, A.J. (1994). Monoclonal antibodies against sporangia and spores of *Marteilia sp.* (*Protozoa* : *Acetospora*). Diseases of Aquatic Organisms, 18, 211-216.

Robledo, J.A.F., Caceres- Martinez, J., & Figueras, A.(1994). *Marteilia refringens* in Mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) beds un Spain. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 14, 61-63.

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

Robledo, J.A.F., Mialhe, E., & Figueras, A.J. (1995). Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (*Protozoa* : *Ascetospora*) from mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.). In J.S. Stolen, T.C. Fletcher, S.A. Smith, J.T. Zelikoff, S.L; Kaatari, R.S. Anderson, K. Söderhäll, & B.A. Weeks-Perkins (Eds.), Techniques un Fish Immunology-4. Immunology and pathology of Aquatic Invertebrates. (pp.117-121).Fair Haven, N.J., U.S.A. SOS Publication.

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.

Villalba, A., Mourelle, S.G., Carballal, M.J., & Lopez, M.C. (1993). Effects of infection by the protistan parasite *Marteilia refringens* on the reproduction of cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* in Galicia (NW Spain). Diseases of Aquatic Organisms, 17, 205-213.