

Direction Générale de l'Alimentation
Bureau de la Santé Animale
75732 PARIS

Objet : Avis sur la détection de parasites du genre *Marteilia* proche de l'espèce *Marteilia cochillia* chez les coques

La Tremblade, le 26/07/19

N/Réf. : 19-081 LGPMM/PAT/LNR/CG/IA/BC/DS/MN/LC/CB

Dossier suivi par : Céline Garcia et Isabelle Arzul

Madame, Monsieur,

Le Laboratoire de Génétique et de Pathologie des Mollusques Marins tient à vous informer de la détection, chez des coques, *Cerastoderma edule*, d'un protozoaire appartenant au genre *Marteilia* et apparenté à l'espèce *Marteilia cochillia*.

Ce protozoaire a été détecté sur un échantillon prélevé le 20/05/19 dans le cadre de la procédure « hausse de mortalité » du réseau de surveillance Repamo sur le gisement naturel de Fort Mahon (Somme). Une information vous avait été transmise par courriel le 13/06/19 pour vous signaler la détection de parasites appartenant au genre *Marteilia* suite aux analyses histologiques réalisées par le laboratoire agréé LABOCEA.

Nous avons reçu des échantillons le 14/06/19 de la part de ce laboratoire agréé afin de caractériser cette espèce parasitaire et notamment afin de déterminer s'il s'agissait de l'agent réglementé *Marteilia refringens*.

Vous trouverez ci-après le détail des différents résultats d'analyses réalisées sur les 3 échantillons de coques reçues. Ces échantillons ont été observés dans un premier temps en histologie puis différentes analyses PCR ciblant différentes régions du génome des parasites du genre *Marteilia* ont été réalisées. Des analyses d'hybridation *in situ* et de séquençage ont également été faites afin de compléter ces tests diagnostiques.

Nous restons à votre disposition et vous prions d'agréer, Madame, Monsieur, l'expression de nos meilleures salutations.

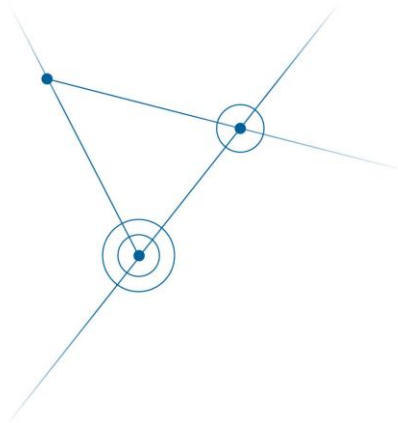
Christian Béchemin
Chef du laboratoire LGPMM

Institut français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
Etablissement public à caractère industriel et commercial

Station de La Tremblade
Ronces les Bains
17390 La Tremblade
France
+33 (0)5 46 76 26 10

Siège Social
155, rue Jean-Jacques Rousseau
92138 Issy-les-Moulineaux Cedex
France
R.C.S. Nanterre B 330 715 368
APE 7219Z
SIRET 330 715 368 00297
TVA FR 46 330 715 368
+33 (0)1 46 48 21 00

www.ifremer.fr



1. Résultats des analyses mises en oeuvre

Des analyses ont été mises en œuvre en utilisant différentes approches techniques (histologie, PCR, hybridation *in situ* et séquençage) par le laboratoire de Génétique et de Pathologie des Mollusques Marins de La Tremblade.

Analyses par histologie

Les analyses histologiques ont révélé la présence de protozoaires présentant des caractéristiques comparables à ceux du genre *Marteilia* sur 1 individu sur 3 analysés (Figure 1). Les parasites observés étaient au stade « cellules secondaires ». Aucune forme sporulée du parasite n'a été observée.

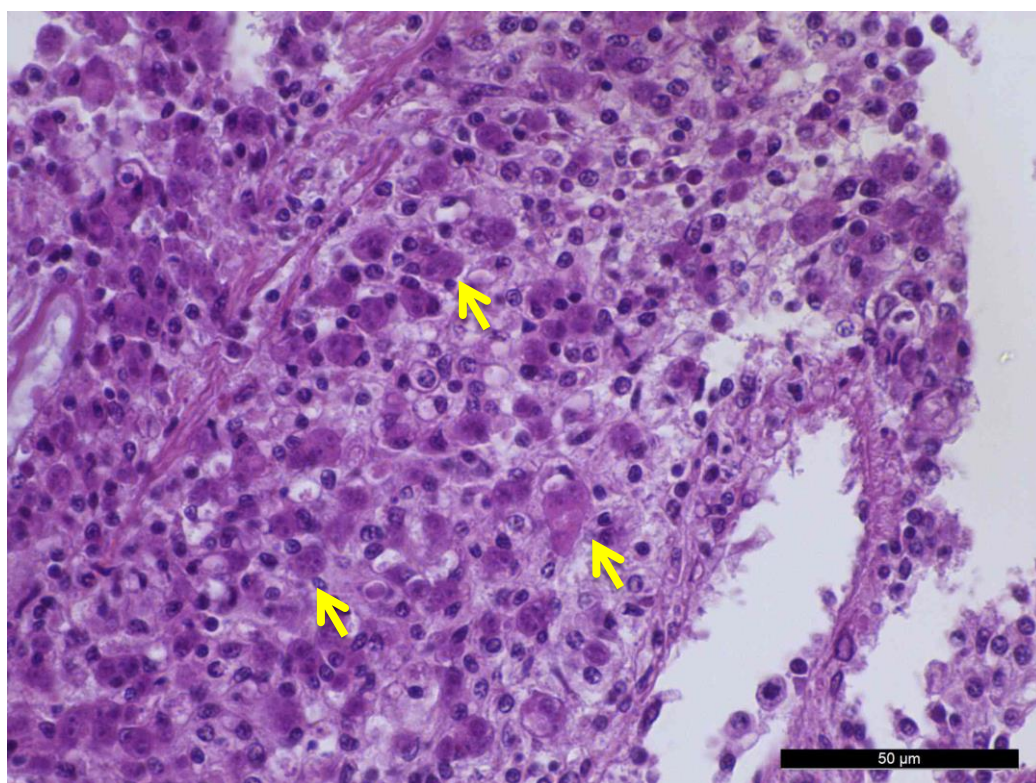


Figure 1 : Cellules secondaires ressemblant à des parasites du genre *Marteilia* dans le tissu conjonctif du pied

Institut français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
Etablissement public à caractère industriel et commercial

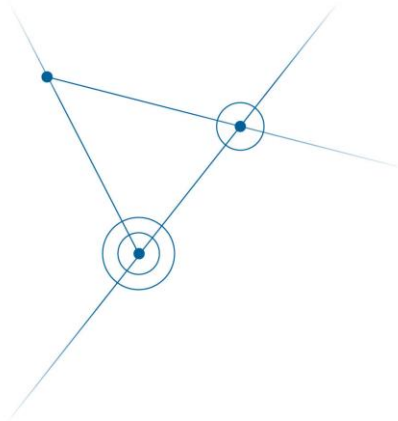
Station de La Tremblade

Ronce les Bains
17390 La Tremblade
France
+33 (0)5 46 76 26 10

Siège Social

155, rue Jean-Jacques Rousseau
92138 Issy-les-Moulineaux Cedex
France
R.C.S. Nanterre B 330 715 368
APE 7219Z
SIRET 330 715 368 00297
TVA FR 46 330 715 368
+33 (0)1 46 48 21 00

www.ifremer.fr



Cependant, il est à noter une localisation atypique de ce parasite dans l'individu de ce lot. En effet, les parasites du genre *Marteilia* sont des parasites de la glande digestive ; or, chez cet individu, ces parasites n'ont pas été retrouvés dans la glande digestive mais essentiellement dans les tissus conjonctifs du pied et du manteau. Une telle localisation a déjà été observée chez l'espèce *Marteilia refringens* infectant des moules issues de gisements naturels de Normandie et du Pas de Calais.

Des lésions de nécrose et d'infiltration hémocytaire des tissus conjonctifs du pied ont également été observées associées à la présence de ces parasites.

Analyses par hybridation *in situ* (HIS)

Afin de compléter les analyses précédentes, la technique d'hybridation *in situ* a été mise en œuvre sur les trois individus reçus.

Ces analyses ont été conduites en utilisant deux sondes : une ciblant la région 18S des parasites du genre *Marteilia* (Le Roux et al. 1999) et la seconde ciblant la région ITS de certains parasites du genre *Marteilia* (Le Roux et al. 2001).

Les protozoaires observés chez l'individu détecté infecté en histologie ont présenté un marquage spécifique dans les tissus conjonctifs du pied et du manteau et dans l'épithélium des branchies avec les deux sondes indiquant que ces parasites appartiennent au genre *Marteilia* (Figure 2).

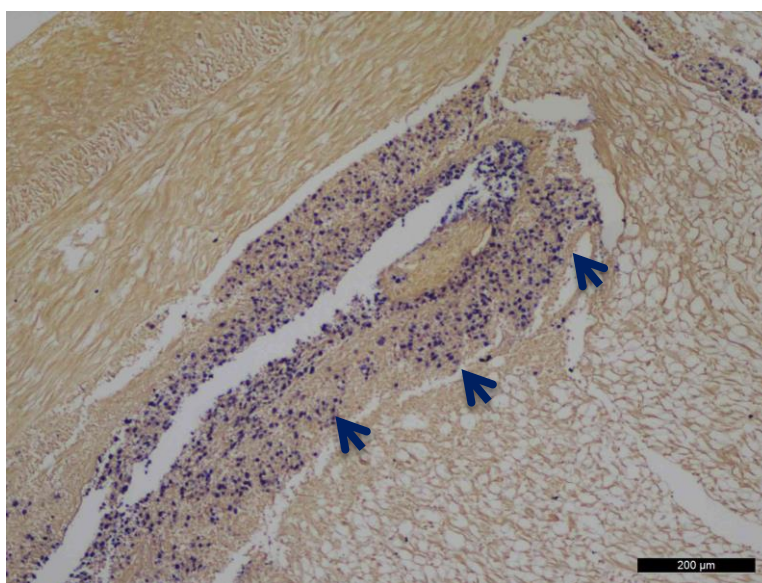
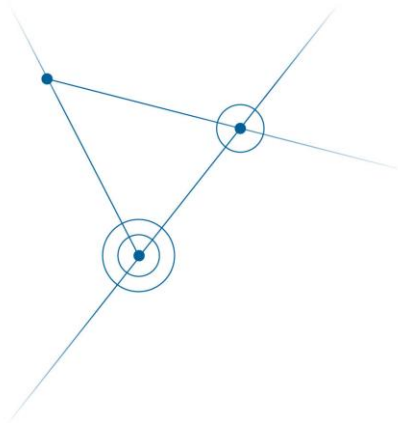


Figure 2 : Parasites présentant un marquage bleu/noir dans le tissu conjonctif du pied avec la sonde 18S



Aucun marquage n'a été observé chez les deux autres individus analysés.

Analyses par PCR en temps réel

Deux PCR en temps réel ont été réalisées sur les tissus des trois individus reçus bien qu'un seul individu ait été trouvé infecté par des parasites du genre *Marteilia* en histologie. Une PCR en temps réel ciblait la région 18S des parasites du genre *Marteilia* (<https://www.eurl-mollusc.eu/SOPs>) et la seconde ciblait la région ITS du parasite réglementé *Marteilia refringens* (Carrasco et al.).

Une amplification a été observée sur les trois individus avec la PCR en temps réel spécifique des parasites du genre *Marteilia*.

En revanche aucune amplification n'a été observée sur les trois individus avec la PCR en temps réel spécifique de l'espèce réglementée *Marteilia refringens*.

Caractérisation du parasite du genre *Marteilia* par PCR et séquençage

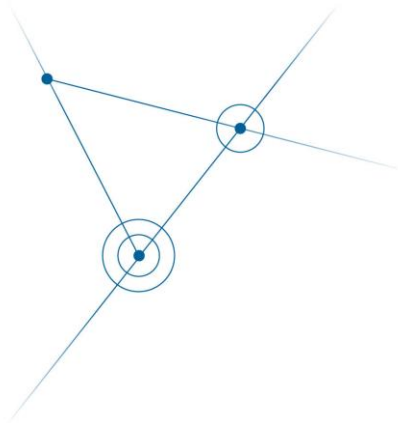
Afin de caractériser l'espèce parasitaire détectée, différentes analyses en PCR ont été réalisées sur les tissus des trois individus reçus (Tableau 1).

Numéro des individus	Parasite du genre <i>Marteilia</i> en histologie	Région 18S <i>Marteilia</i>		Région ITS <i>Marteilia</i>	Région IGS <i>Marteilia</i>
		Amorces SS2-SAS1	amorces Para1+fN-ParaGenDB et Para3+fN-Para2+rN	amorces M2A-M3AS	Amorces MT1-MT2 et MT1b-MT2b
19/094/01	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Positif
19/094/02	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif
19/094/03	Négatif	Négatif	Positif	Négatif	Négatif

Tableau 1 : Bilan des résultats d'analyses obtenus en histologie et par PCR

Dans un premier temps, des analyses en PCR ciblant la région 18S des parasites appartenant au genre *Marteilia* ont été réalisées en utilisant soit les amorces SS2-SAS1 de Le Roux et al. 1999 soit les amorces Para1+fN-ParaGenDB et Para3+fN-Para2+rN (PCR nichée) de Ward et al. 2016.

Aucune amplification n'a été observée avec les amorces SS2-SAS1 sur les trois individus analysés mais en revanche, une amplification a été obtenue avec les amorces Para1+fN-ParaGenDB et Para3+fN-Para2+rN pour 2 individus (Tableau 1).



Dans un second temps, les trois individus ont été analysés en PCR en utilisant les amorces M2A-M3AS de Le Roux et al. 1999 ciblant la région ITS de certains parasites appartenant au genre *Marteilia*. Aucune amplification n'a été observée.

Finalement, une PCR nichée ciblant la région IGS de certains parasites appartenant au genre *Marteilia* (amorces MT1-MT2 et MT1b-MT2b de López-Flores et al. 2004) a été réalisée. Une amplification a été obtenue pour 2 individus (Tableau 1).

Afin de confirmer que les produits de PCR obtenus avec les amorces ciblant les parasites du genre *Marteilia* étaient bien le résultat d'une amplification spécifique, les produits PCR obtenus pour les différents individus ont été séquencés.

Les séquences obtenues concernant une partie de la région 18S présentent 99% d'identité avec les espèces *Marteilia cochillia* et les espèces réglementées *M. refringens* (ou *M. refringens* type O) et *M. pararefringens* (ou *M. refringens* type M).

Le parasite détecté chez les coques semble très proche de ces espèces (Figure 3).

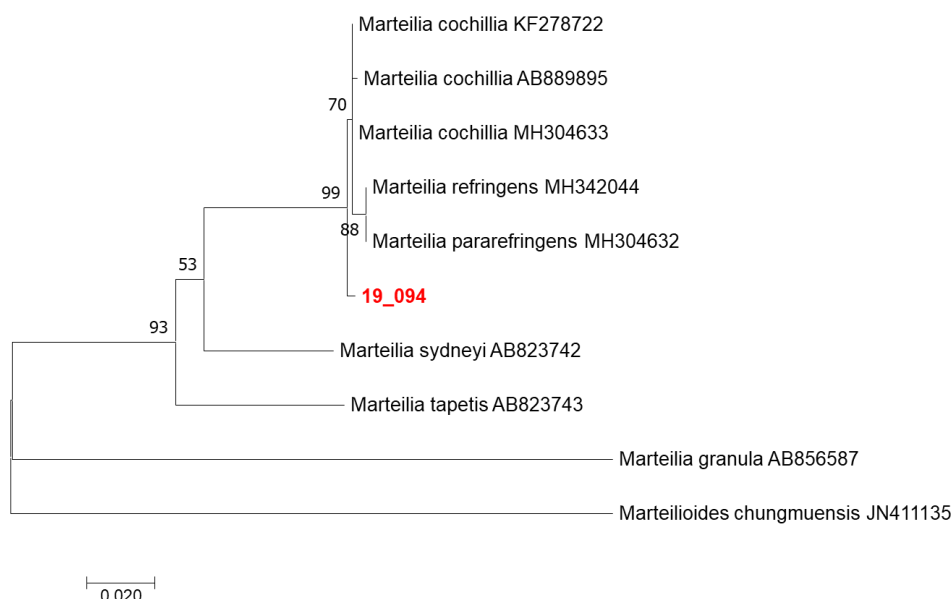


Figure 3 : Arbre phylogénétique sur une partie de la région 18S des parasites du genre *Marteilia* selon la méthode du « Maximum Likelihood » (Tamura K. and Nei M. 1993).

Institut français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
Etablissement public à caractère industriel et commercial

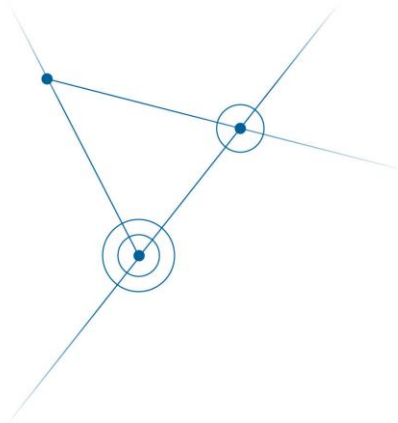
Station de La Tremblade

Ronce les Bains
17390 La Tremblade
France
+33 (0)5 46 76 26 10

Siège Social

155, rue Jean-Jacques Rousseau
92138 Issy-les-Moulineaux Cedex
France
R.C.S. Nanterre B 330 715 368
APE 7219Z
SIRET 330 715 368 00297
TVA FR 46 330 715 368
+33 (0)1 46 48 21 00

www.ifremer.fr



Sur la portion de la région IGS obtenue, les séquences obtenues présentent 99% d'identité avec l'espèce *Marteilia cochillia*.

Sur cette région, le parasite observé chez les coques est différent de l'agent réglementé *Marteilia refringens* ou *M. pararefringens* mais est apparenté au parasite *Marteilia cochillia* (Figure 4).

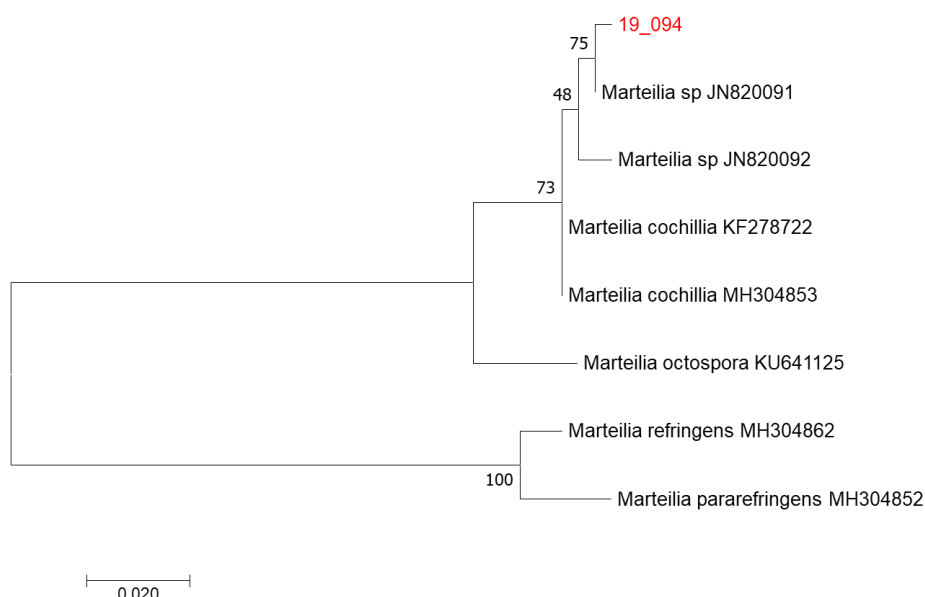


Figure 4 : Arbre phylogénétique sur une partie de la région IGS des parasites du genre *Marteilia* selon la méthode du « Maximum Likelihood » (Tamura K. and Nei M. 1993).

En conclusion, les analyses réalisées en histologie, PCR, HIS et séquençage confirment la présence d'un protozoaire du genre *Marteilia* chez les coques (*Cerastoderma edule*) issues du gisement naturel de Fort Mahon en baie d'Authie (Somme).

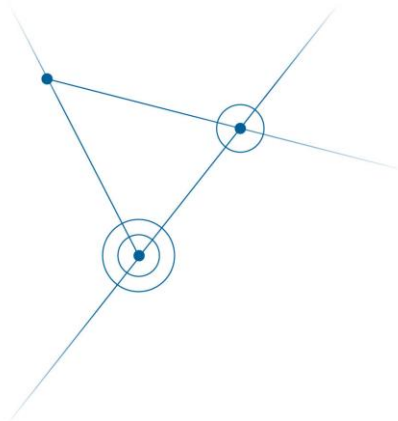
Ce parasite ne correspond pas à l'espèce réglementée *Marteilia refringens* mais est apparenté à l'espèce *Marteilia cochillia* sur la base de données de séquences disponibles. Cependant, il présente une localisation tissulaire atypique par rapport au parasite *Marteilia cochillia* décrit en Espagne.

Institut français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
Etablissement public à caractère industriel et commercial

Station de La Tremblade
Ronces les Bains
17390 La Tremblade
France
+33 (0)5 46 76 26 10

Siège Social
155, rue Jean-Jacques Rousseau
92138 Issy-les-Moulineaux Cedex
France
R.C.S. Nanterre B 330 715 368
APE 7219Z
SIRET 330 715 368 00297
TVA FR 46 330 715 368
+33 (0)1 46 48 21 00

www.ifremer.fr



2. Bilan et perspectives

Marteilia cochillia est un parasite protozoaire responsable de mortalités massives de coques en Espagne et est à l'origine du déclin des populations de coques espagnoles dans les secteurs où il a été détecté (Villalba et al. 2014).

Il est possible que le parasite détecté en baie d'Authie soit le même que celui décrit sur les côtes atlantiques de l'Espagne. Cependant, des analyses complémentaires notamment le séquençage d'autres régions du génome sont nécessaires pour confirmer les premiers résultats obtenus.

En France, des parasites du genre *Marteilia* ont déjà été décrits chez des coques dans différents secteurs en Bretagne (Comps 1975, Auffret and Poder 1987). Cependant, aucune caractérisation moléculaire de ces parasites n'a été réalisée et leurs détections n'ont pas nécessairement été associées à des mortalités de coques.

Le parasite détecté en baie d'Authie a été observé lors de hausses de mortalité de coques mais sur un seul individu en histologie. Il est probable qu'il ne soit pas responsable des mortalités observées sur ce secteur à cette période vu sa fréquence de détection. D'autres parasites (trématodes au stade sporocystes) ont été observés sur ce lot de coques à une très forte fréquence de détection (16 individus sur 20 analysés) et sont probablement responsables des mortalités constatées.

Cependant, il n'est pas possible en l'état actuel des connaissances de conclure sur son potentiel impact sur les coques françaises. Il serait donc souhaitable de recommander aux professionnels de ce secteur de ne réaliser aucun transfert de coques sur d'autres secteurs afin de limiter les risques de propagation de ce parasite.

En 2019, différents prélèvements de coques de ce secteur ont été réalisés par le LNR. Ces prélèvements ont été effectués dans le but de développer une technique plus sensible pour détecter la bactérie *Vibrio aestuarianus* chez les coques, bactérie qui est aussi à l'origine de mortalités de coques. Le LNR réalisera des analyses complémentaires sur ces échantillons notamment par PCR pour rechercher l'éventuelle présence de parasites du genre *Marteilia*.

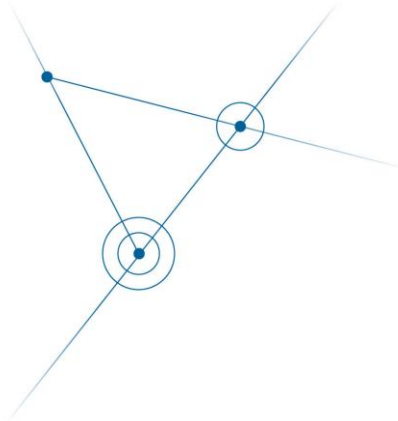
Copies : - DDTM 62
- LABOCEA

Institut français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
Etablissement public à caractère industriel et commercial

Station de La Tremblade
Ronces les Bains
17390 La Tremblade
France
+33 (0)5 46 76 26 10

Siège Social
155, rue Jean-Jacques Rousseau
92138 Issy-les-Moulineaux Cedex
France
R.C.S. Nanterre B 330 715 368
APE 7219Z
SIRET 330 715 368 00297
TVA FR 46 330 715 368
+33 (0)1 46 48 21 00

www.ifremer.fr



Références

Auffret, M. et M. Poder. 1987. Pathology of the main bivalve mollusc species from oyster rearing areas in Brittany (France). *Aquaculture* 67: 255-257.

Carrasco N., Voorbergen-Laarman M., Lacuesta B., Furones D., Engelsma M. Y., 2017. Application of a competitive real time PCR for detection of *Marteilia refringens* genotype “O” and “M” in two geographical locations: The Ebro Delta, Spain and the Rhine-Meuse Delta, the Netherlands. *Journal of Invertebrate Pathology* 49: 51-55.

Comps, M., H. Grizel, G. Tig, et J.L. Duthoit. 1975. Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule* L. (New parasites in the digestive gland of *Mytilus edulis* L. and *Cardium edule* L.). *Comptes Rendus Académie des Sciences de Paris, Série D281*: 179-181.

Le Roux, F., C. Audemard, A. Barnaud et F. Berthe. 1999. DNA Probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* 1: 588-597.

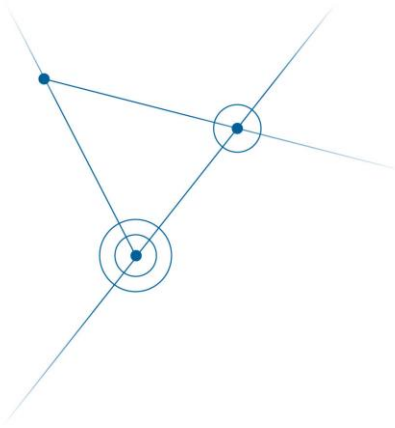
Le Roux, F., G. Lorenzo, P. Peyret, C. Audemard, A. Figueras, C. Vivarès, M. Gouy et F. Berthe. 2001. Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 449-454.

López-Flores, I., R. de la Herrán, M.A. Garrido-Ramos, J.I. Navas et M. Ruiz Rejón. 2004. The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology* 129: 411-419.

Tamura K., Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.

Villalba A, Iglesias D, Ramilo A, Darriba S, Parada JM, No E, Abollo E, Molares J, Carballed MJ., 2014. Cockle *Cerastoderma edule* fishery collapse in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain) associated with the protistan parasite *Marteilia cochillia*. *Dis Aquat Organ*. 109(1):55-80.

Ward GM, Bennett M, Bateman K, Stentiford GD, Kerr R, Feist SW, Williams ST, Berney C and Bass D (2016) A new phylogeny and environmental DNA insight into paramyxids: an increasingly important but enigmatic clade of



protistan parasites of marine invertebrates. *International Journal of Parasitology* 46, 605–619.

Institut français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
Etablissement public à caractère industriel et commercial

Station de La Tremblade

Ronce les Bains
17390 La Tremblade
France
+33 (0)5 46 76 26 10

Siège Social

155, rue Jean-Jacques Rousseau
92138 Issy-les-Moulineaux Cedex
France
R.C.S. Nanterre B 330 715 368
APE 7219Z
SIRET 330 715 368 00297
TVA FR 46 330 715 368
+33 (0)1 46 48 21 00

www.ifremer.fr