

Année universitaire : 2016-2017

Spécialité :

Ingénieur agronome

Spécialisation (et option éventuelle) :

*Sciences halieutiques et aquacoles –
Option Aquaculture*

Mémoire de fin d'études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Contribution à l'étude de la transmission de *Bonamia ostreae*, parasite protozoaire de l'huître plate européenne, *Ostrea edulis*

Par : Nicolas MÉROU



Soutenu à Rennes, le 15 septembre 2017

Devant le jury composé de :

Président :

Hervé Le Bris, *Professeur et Directeur de l'UMR ESE, AgroCampus Ouest*

Maître de stage :

Isabelle Arzul, *Cadre de recherche, Ifremer (absent)*

Enseignant référent :

Hervé Le Bris, *Professeur et Directeur de l'UMR ESE, AgroCampus Ouest*

Autres membres du jury (Nom, Qualité) :

- Elodie Réveillac, *Enseignant-chercheur en écologie halieutique, AgroCampus Ouest*

- Ségolène Calvez, *Maître de Conférences DGER, ONIRIS-INRA*

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Confidentialité

Non Oui si oui : 1 an 5 ans 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible ⁽¹⁾.

Date et signature du maître de stage ⁽²⁾ : le 30/08/2017



A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

Droits d'auteur

L'auteur⁽³⁾ **Mérou Nicolas**

autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement⁽⁴⁾

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

(Facultatif) accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-BY-NC-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

Date et signature de l'auteur : le 30/08/2017



Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement⁽⁴⁾

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3).Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

Remerciements

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier mes encadrantes de stage, Isabelle Arzul et Cyrielle Montaubin, pour leur disponibilité, leur implication, leurs conseils avisés, leur confiance, leur bonne humeur et surtout pour leur patience face à mes nombreuses questions, car il en a sûrement fallu ! Merci pour cette expérience enrichissante et très appréciable !

La liste exhaustive serait trop longue, mais un grand merci également à toute l'équipe du LGPMM, administratifs, chercheurs, doctorants, techniciens et post-doctorants : vous m'avez réservé un excellent accueil et avez tous fortement contribué à rendre cette expérience de stage encore plus intéressante.

Merci également à Jean Prou, chef de la station Ifremer de Ronce-les-Bains, et plus largement à l'Ifremer Centre Atlantique pour m'avoir permis d'effectuer mon stage de fin d'études au LGPMM.

Enfin, je remercie également mes référents universitaire, Hervé Le Bris et Elodie Réveillac, pour leur disponibilité et leurs conseils quant à la rédaction du présent rapport.

Liste des abréviations

(Par ordre alphabétique)

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ARNr : ARN ribosomal

B. ostreae : *Bonamia ostreae*

C. gigas : *Crassostrea gigas*

C. virginica : *Crassostrea virginica*

Ct : Cycle threshold

DL50 : Dose Létale 50%

HIS : Hybridation In Situ

LGPMM : Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins

MET : Microscopie Electronique à Transmission

O. edulis : *Ostrea edulis*

OIE : Organisation Internationale des Epizooties (Organisation Mondiale de la Santé Animale)

OsHV-1 : Oyster Herpes Virus type 1

OSPAR : OSlo and PARis conventions for the protection of the marine environment of the North East Atlantic

P. marinus : *Perkinsus marinus*

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDS : Particules Denses Structurées

SIR : Susceptible Infectious Recovered

UV : UltraViolets

Glossaire

(Par ordre alphabétique)

Activité 5'-exonucléasique : Pour une enzyme ADN polymérase, capacité à hydrolyser les acides nucléiques lors de la phase d'élongation, à partir de l'extrémité 5'.

Affinage : Etape du cycle de production de l'huître durant laquelle les individus adultes sont placés dans des bassins d'affinage (« claires »), dans le but d'en modifier les qualités organoleptiques, la taille, la couleur de la chair ou encore la dureté de la coquille.

Amplicon : Fragment d'ADN amplifié lors d'une réaction de PCR.

Apposition : Empreinte de tissus sur une lame porte-objet, par la réalisation d'une série de micropressions.

Cavité palléale : Chez les mollusques, espace interne délimité par les lobes du manteau.

Chambre exhalante : Chez les mollusques, région dorsale de la cavité palléale dans laquelle débouchent l'anus et le pore génital unique.

Cytologie : Etude morphologique des cellules.

Cytométrie en flux : Technique d'analyse permettant de caractériser et compter des particules en les faisant défiler devant le faisceau d'un laser.

Dénaturation : Lors d'une réaction de PCR, séparation des deux brins d'ADN / ARN.

Épithélium : Tissu fondamental composé de cellules juxtaposées disposées en une ou plusieurs couches et formant soit un revêtement externe (en surface de la peau) ou interne (en surface d'une muqueuse), soit une glande.

Épizootie : Maladie affectant brutalement un grand nombre d'animaux, dans une région donnée.

Follicule : Petite formation anatomique en forme de sac, délimitant une cavité sécrétrice ou excrétrice, ou englobant un organe.

Gonie : Cellule germinale mâle ou femelle peu différenciée et capable de se multiplier par mitoses.

Hémolymphe : Liquide circulatoire des invertébrés dont le rôle est analogue au sang et au liquide interstitiel des vertébrés.

Histologie : Etude morphologique des tissus.

Hybridation (amorces) : Lors d'une réaction de PCR, fixation des amorces sur leur séquence complémentaire.

Larve véligère : Chez l'huître, stade de développement pendant lequel la larve est munie d'un voile (précède le stade pédivéligère).

Larve pédivéligère : Chez l'huître, stade de développement pendant lequel la larve est munie d'un voile et est en capacité de se fixer sur le substrat aux moyens d'un pied ou un organe proche (précède le stade fixé).

Nucléole : Sous-compartiment cellulaire du noyau des cellules eucaryotes.

Parasite : Organisme qui évolue strictement aux dépens d'un organisme hôte d'une espèce différente, de façon permanente ou pendant une phase de son cycle vital.

Pathognomonique : Se dit d'un symptôme ou d'un signe spécifique d'une maladie.

Phagocytose : Propriété que possèdent certains protozoaires et certaines cellules (phagocytes) de capturer et d'ingérer des corps figurés (particules ou micro-organismes).

Plasmode : Structure cellulaire multinucléée.

Protozoaire : Protiste sans chlorophylle, généralement apte à ingérer des proies organisées à l'aide d'une « bouche », temporaire (amibiens) ou permanente (ciliés).

Schizogonie : Mode de multiplication asexuée des sporozoaires et de quelques autres protozoaires dans lequel le cytoplasme ne se partage en cellules qu'après multiplication des noyaux et des autres organites au sein d'un plasmode commun.

Stabuler (Stabulation) : Séjour et entretien d'animaux dans un espace dédié, temporairement ou d'une façon permanente.

Système immunitaire adaptatif : Désigne le système immunitaire reposant sur les lymphocytes (T et B). L'activation d'un lymphocyte en contact avec un antigène s'accompagne d'une expansion clonale (permettant d'amplifier la réponse immunitaire spécifique à l'antigène), et de la mise en place d'une réponse mémoire. C'est en cela que l'on parle d'immunité adaptative.

Système immunitaire inné : Comprend les cellules et les mécanismes permettant la défense de l'organisme contre les agents infectieux de façon immédiate, à l'inverse du système immunitaire adaptatif qui confère une protection plus tardive mais plus durable.

Ulcère : Perte de substance d'un revêtement épithélial, cutané ou muqueux, s'étendant plus ou moins aux tissus sous-jacents.

Ultrastructure : Concerne un domaine de dimensions qui se situe entre le domaine atomique - moléculaire et le domaine accessible au microscope optique. On étudie généralement ce domaine de dimensions par le biais de la microscopie électronique.

Zone intertidale : Se dit de l'espace côtier compris entre les limites extrêmes (minimales et maximales) atteintes par la marée.

Table des matières

Introduction	1
Partie 1. Etat de l'art.....	2
I. L'huître plate européenne, <i>Ostrea edulis</i>	2
1. Taxonomie	2
2. Anatomie et physiologie générale.....	2
3. Ecologie	3
4. Historique.....	4
5. Production	5
6. Intérêts économiques et écologiques.....	6
II. Le parasite <i>Bonamia ostreae</i>	6
1. Taxonomie	6
2. Structure	6
3. Distribution tissulaire.....	7
4. Spectre d'hôtes et espèces réservoir.....	8
5. Cycle parasitaire.....	8
III. L'infection d' <i>O. edulis</i> à <i>B. ostreae</i>	8
1. Définition et histoire	8
2. Symptômes et signes pathologiques	9
3. Diagnostic	9
4. Distribution géographique.....	9
5. Transmission de la maladie.....	10
6. Influence des facteurs biotiques et abiotiques.....	11
7. Méthodes de lutte et de prévention	11
IV. Un modèle conceptuel de transmission pour <i>Bonamia ostreae</i> ?	11
1. Compartiments	12
2. Paramètres	13

Partie 2. Matériel et méthodes	14
I. Matériel biologique	14
1. Sélection d’huîtres plates infectées à <i>Bonamia ostreae</i>	14
2. Suspension de <i>Bonamia ostreae</i> purifiés.....	15
II. Méthode : Détection de <i>Bonamia ostreae</i> dans l’eau par PCR en temps réel.....	15
1. Filtration sur membrane	15
2. Extraction d’ADN à partir des membranes.....	15
3. PCR en temps réel.....	16
III. Protocoles expérimentaux.....	17
1. Détermination du seuil limite de détection	17
2. Etude de la survie de <i>Bonamia ostreae</i> en dehors de son hôte.....	18
3. Suivi de l’excrétion de <i>Bonamia ostreae</i> en dehors de son hôte.....	18
Partie 3. Résultats	19
I. Détermination du seuil limite de détection de l’ADN de <i>Bonamia ostreae</i> dans l’eau.....	19
II. Etude de la survie de <i>B. ostreae</i> en dehors de son hôte	19
III. Suivi de l’excrétion de <i>B. ostreae</i> en dehors de son hôte	21
Partie 4. Discussions et conclusion	26
Perspectives	28
Références bibliographiques	29
Sitographie	31

Table des illustrations

Figure 1 : Anatomie d' <i>Ostrea edulis</i>	3
Figure 2 : Cycle de développement d' <i>Ostrea edulis</i>	3
Figure 3 : Évolution de la production d'huîtres en France entre 1900 et 2010.....	5
Figure 4 : Observations en microscopie photonique de formes intracellulaires et extracellulaires de <i>Bonamia ostreae</i> sur une apposition branchiale d' <i>Ostrea edulis</i>	6
Figure 5 : Observations en microscopie électronique de formes denses et claires de <i>B. ostreae</i> infectant un hémocyte d' <i>O. edulis</i>	7
Figure 6 : Dynamique d'infection de <i>B. ostreae</i> dans son hôte bivalve <i>O. edulis</i> : transmission, dispersion et influence des facteurs environnementaux	10
Figure 7 : Proposition d'un modèle conceptuel de transmission pour <i>Bonamia ostreae</i>	12
Figure 8 : Observations en microscopie photonique de champs représentatifs des niveaux d'infection établis lors de la lecture des appositions.....	14
Figure 9 : Observation en microscopie photonique de parasites purifiés sur une cellule de Malassez	15
Figure 10 : Schéma du principe de la PCR	16
Figure 11 : Schéma du principe de fonctionnement de la chimie TaqMan.....	17
Figure 12 : Droite standard établissant le lien mathématique entre une valeur de Ct obtenue en PCR en temps réel et un nombre de parasite détecté	19
Figure 13 : Droite standard établie pour l'expérience sur la survie de <i>B. ostreae</i> en dehors de son hôte	20
Figure 14 : Evolution de survie de <i>B. ostreae</i> en dehors de son hôte aux différents temps de prélèvement	20
Figure 15 : Droite standard établie pour l'expérience sur l'excrétion de <i>B. ostreae</i> en dehors de son hôte	21
Figure 16: Variation du taux d'excrétion individuel et temporel de <i>B. ostreae</i> par des huîtres plates <i>O. edulis</i> faiblement infectées.....	23
Figure 17 : Variation du taux d'excrétion de <i>B. ostreae</i> en fonction du niveau d'infection de l'hôte.....	24
Figure 18 : Variation du taux d'excrétion de <i>B. ostreae</i> en fonction de l'état de l'hôte.....	24
Figure 19 : Variation du taux d'excrétion de <i>B. ostreae</i> en fonction du poids de l'hôte	24
Figure 22 : Proposition d'un nouveau modèle conceptuel de transmission pour <i>B. ostreae</i> ...	28

Table des annexes

Annexe I : Taxonomie d' <i>Ostrea edulis</i> et <i>Bonamia ostreae</i>	I
Annexe II : PowerWater DNA Isolation Kit - Protocole	II
Annexe III : PCR Simplex <i>Bonamia sp.</i> - Cycle thermique et composition du mix réactionnel	III
Annexe IV : Composition des lots d'huîtres plates utilisés pour l'expérience sur la survie de <i>B. ostreae</i> en dehors de son hôte	IV
Annexe V : Etude de la survie de <i>B. ostreae</i> en dehors de son hôte - Schéma du protocole expérimental	V
Annexe VI : Caractéristiques des huîtres plates utilisées dans l'expérience sur l'excrétion de <i>B. ostreae</i> en dehors de son hôte	VI
Annexe VII : Etude de l'excrétion de <i>B. ostreae</i> en dehors de son hôte - Schéma du protocole expérimental	VII

Introduction

L'huître plate européenne *Ostrea edulis* est un mollusque bivalve endémique des côtes européennes. Consommée depuis l'Antiquité grâce à la pêche sur les gisements naturels, sa production a connu un essor considérable à partir de la Renaissance et les premières tentatives de captage naturel du naissain sont apparues en 1854, ouvrant ainsi les portes vers l'ostréiculture moderne. En raison de surpêche et de maladies telles que la marteiliose et la bonamiose, dues respectivement aux **parasites protozoaires** *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*, sa production est aujourd'hui réduite à des volumes extrêmement faibles. Qualifiée d'espèce ingénieuse de l'écosystème, *Ostrea edulis* est inscrite sur la liste de l'OSPAR (OSLO and PARIS conventions for the protection of the marine environment of the North East Atlantic) des espèces et habitats en déclin et/ou menacés. De plus, en raison de mortalités massives affectant la production d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* depuis 2008, les ostréiculteurs manifestent un regain d'intérêt pour cette espèce patrimoniale.

Des projets contribuant à relancer une production viable d'huîtres plates dans un souci de diversification des activités conchylicoles ont ainsi vu le jour et posent la question des moyens de luttés contre la marteiliose et la bonamiose. Ces moyens sont d'autant plus limités que l'huître plate est élevée en milieu ouvert et que l'éradication des stocks infectés est difficilement envisageable. Le contrôle de ces maladies repose donc essentiellement sur la prévention afin d'éviter et de limiter l'introduction et la transmission des parasites dans les populations. Des décennies de travaux sur *Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens* ont permis de mieux connaître la dynamique des parasites dans leurs hôtes bivalves et de développer des outils de détection de ces parasites dans les coquillages. Peu de données sont néanmoins disponibles concernant le comportement de ces parasites en dehors de leur hôte bivalve, en particulier *Bonamia ostreae*.

C'est dans ce cadre que s'inscrit mon stage de fin d'études, réalisé de février à juillet 2017 au Laboratoire de Génétique et de Pathologie des Mollusques Marins (LGPMM) de la station Ifremer de Ronce-les-Bains (17). Plus précisément, l'analyse bibliographique des données disponibles nous a permis de proposer un modèle conceptuel de transmission de *Bonamia ostreae* et d'aborder expérimentalement deux paramètres, la survie du parasite et son excrétion en dehors de son hôte, dans le cadre de la problématique suivante : *Comment étudier la transmission de Bonamia ostreae au sein d'une population d'huîtres plates Ostrea edulis ?*

Ce rapport présente les différents résultats obtenus au cours du stage, en proposant tout d'abord un état de l'art sur le sujet abordé, suivi par la présentation du matériel et méthodes associé aux expériences réalisées. Les différents résultats obtenus seront ensuite présentés, puis discutés dans le cadre de la conclusion. Enfin, une dernière partie permettra de proposer des perspectives afin d'améliorer ou préciser les résultats, à l'occasion d'expériences futures.

Partie 1. Etat de l'art

I. L'huître plate européenne, *Ostrea edulis*

1. Taxonomie

Ostrea edulis (Linnaeus, 1758), également connue sous le nom d'huître plate européenne, est un mollusque bivalve appartenant à l'ordre des Ostreida et à la famille des Ostreidae (MNHN, 2017). La taxonomie d'*Ostrea edulis* est présentée en annexe I.

2. Anatomie et physiologie générale

Elle dispose d'une coquille constituée de deux valves dont l'ouverture et la fermeture sont assurées par la contraction d'un grand muscle adducteur central (FAO, 2017). A l'instar des autres huîtres, *Ostrea edulis* dispose d'un système respiratoire, circulatoire, digestif, et reproducteur ainsi qu'un **système immunitaire** de type « inné », différent de celui des vertébrés (Duchêne et al., 2015).

L'huître plate européenne est un coquillage suspensivore planctonophage : elle se nourrit de la matière en suspension présente dans la colonne d'eau. Des branchies, constituées de filaments recouverts de cils vibratiles, assurent l'alimentation et la respiration via l'inhalation d'eau de mer, ainsi que l'élimination des déchets via son exhalation (Duchêne et al., 2015).

L'oxygène, capté par les branchies, est acheminé jusqu'aux organes par l'**hémolymphe** grâce aux battements du cœur. Une fois les organes atteints, l'**hémolymphe** est ramenée vers les branchies pour se réapprovisionner en oxygène ou vers la **chambre exhalante** pour éliminer les déchets récupérés au cours de la circulation (Duchêne et al., 2015).

Les particules alimentaires, également captées par les branchies, sont enduites de mucus et conduites jusqu'à la bouche, entourée de deux palpes labiaux. Par la suite, elles seront acheminées vers l'estomac par le biais d'un court œsophage où elles seront broyées avant d'être envoyées vers l'intestin dans lequel elles vont être en partie assimilées au cours de la digestion. Les parties non assimilées, comme les déchets ou les fèces, seront expulsées dans la **chambre exhalante** et rejetées dans le milieu extérieur par le biais d'un anus (Duchêne et al., 2015).

Ostrea edulis est un hermaphrodite asynchrone et protandre avec une sexualité consécutive rythmique. Généralement, elle démarre son activité sexuelle en tant que mâle puis alterne entre les deux sexes au cours de la saison de reproduction. Les organes reproducteurs sont ainsi constitués d'une gonade sexuelle indifférenciée, enveloppant la glande digestive. Cette gonade est constituée d'un réseau de **follicules**, dans lequel les **gonies** vont se multiplier et se différencier en spermatozoïdes ou en ovocytes, selon le sexe de l'animal (Duchêne et al., 2015).

L'immunité de l'huître plate européenne repose notamment sur les hémocytes, des cellules immunitaires circulantes polyvalentes impliquées notamment dans la défense, la réparation de lésions et l'élimination de corps indésirables par le biais de la **phagocytose** (Duchêne et al., 2015).

Un schéma résumant l'anatomie d'*Ostrea edulis* est présenté en figure 1.

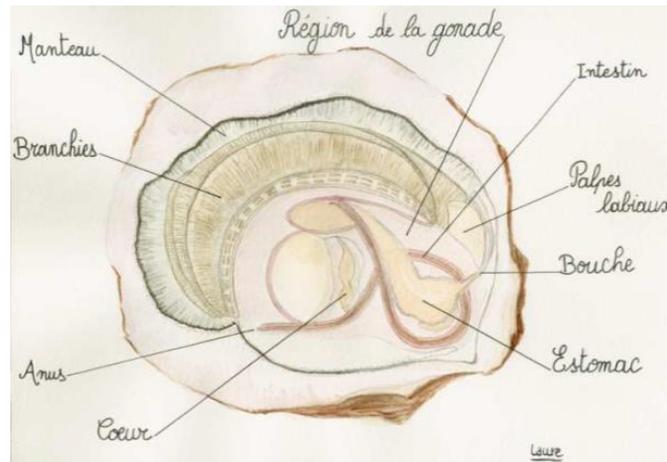


Figure 1 : Anatomie d'*Ostrea edulis* © L. Robigo (Duchêne et al., 2015)

3. Ecologie

Dans le milieu naturel, la reproduction des huîtres plates a lieu à la fin du printemps ou au début de l'été, lorsque la température de l'eau se situe entre 18 et 20°C. *Ostrea edulis* est une espèce larvipare : les spermatozoïdes expulsés par les mâles dans le milieu extérieur vont féconder les ovocytes dans la **cavité palléale** des femelles. Environ 8 à 10 jours après éclosion, les **larves véligères** sont expulsées dans la colonne d'eau où elles mèneront une vie planctonique pendant 10 à 20 jours en devenant des **larves pédivéligères** avant de se fixer définitivement sur le substrat : on dit que l'huître plate est une espèce sessile (figure 2). En moyenne, une huître plate peut vivre une dizaine d'année et mesurer jusqu'à 20 cm (Blanchet, 2005 ; Duchêne et al., 2015).

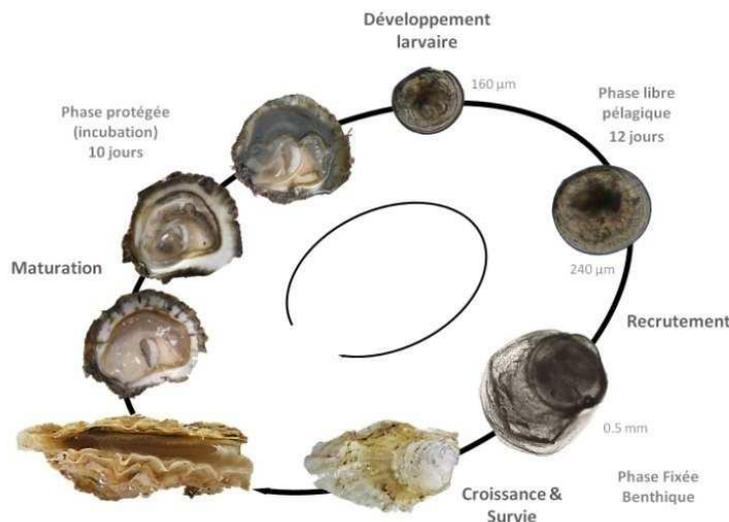


Figure 2 : Cycle de développement d'*Ostrea edulis* © S. Pouvreau et H. Cochet (Duchêne et al., 2015)

Les conditions physico-chimiques préférentielles d'*Ostrea edulis* ne sont à ce jour que partiellement connues. On sait néanmoins que la salinité optimale se situe en 30 et 35 g de NaCl/kg d'eau de mer, et que la température lui devient défavorable au-delà de 30°C. Bien que peu de données l'attestent, il semblerait que cette espèce préfère les environnements peu turbides, dont la quantité de matière en suspension ne dépasse pas les 50 mg/L. Elle est essentiellement retrouvée dans les eaux côtières, jusqu'à une profondeur de 20 à 40 m. Elle affectionne tout type de substrat mais notamment les substrats sableux, vaseux, graveleux ou rocheux (Blanchet, 2005 ; Lapegue et al., 2006).

Comme son nom vernaculaire l'indique, elle est endémique des côtes européennes, avec une aire de répartition allant de la Norvège jusqu'au bassin méditerranéen. Suite à des introductions pour des raisons aquacoles, elle est aujourd'hui également présente sur les côtes nord-est américaines, du Maine à l'île de Rhode, et en Afrique du Sud (FAO, 2017).

4. Historique

Les fouilles archéologiques menées sur les littoraux européens indiquent que l'huître plate européenne est consommée par l'Homme depuis la Préhistoire. Néanmoins, c'est dans l'Antiquité que l'on trouve les premiers récits de l'exploitation par la pêche des gisements naturels de cette espèce. A partir de la Renaissance, le commerce de l'huître plate se développe et se démocratise. La consommation de l'huître plate devient alors courante, la demande augmente et les premiers signes de surexploitation des gisements naturels se manifestent autour de 1750. Pendant près d'un siècle, les interdictions de pêche vont se succéder avec pour principal objectif de sauvegarder ces populations. C'est en 1854 que vont se développer les premières techniques de captage de naissains d'huître sur des collecteurs grâce au naturaliste Victor Coste (sur la base des travaux du commissaire à la pêche De Bon), permettant l'essor de l'ostréiculture moderne au XX^{ème} siècle (Hussenot et al., 2014).

Entre 1920 et 1927, un premier épisode de mortalité touchant les huîtres plates a été identifié en France, en Angleterre et en Hollande. Bien qu'aucun agent infectieux n'ait pu être mis en cause à cette époque, les scientifiques ont émis l'hypothèse qu'il s'agissait d'un parasite intracellulaire réduisant la capacité de contraction du muscle adducteur de l'huître, favorisant ainsi sa prédation. Suite à cette **épizootie**, *Ostrea edulis* est pratiquement décimée et la production s'oriente alors vers l'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819), accidentellement introduite sur les côtes françaises à la fin du XIX^{ème} siècle. Malheureusement, cette nouvelle espèce subira elle aussi une série d'**épizooties** à partir de 1966 provoquant sa disparition de nos côtes et forçant à l'introduction d'une nouvelle espèce, l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), qui représente aujourd'hui l'essentiel de la production française. En 2012, 1 130 tonnes d'huîtres plates ont été produites en France, contre 79 220 tonnes d'huîtres creuses (Duchêne et al., 2015).

En 1968, une nouvelle **épizootie** est détectée sur *Ostrea edulis* dans les élevages de l'Aber Wrach (Finistère, France). Causée par *Marteilia refringens* (Grizel et al., 1974), un parasite **protozoaire** appartenant à l'ordre des Paramyxida, cette maladie fut ainsi nommée « marteiliose », ou encore « maladie des Abers ». *Marteilia refringens* affecte la glande digestive des animaux en colonisant les **épithéliums** des palpes labiaux, de l'estomac et des tubules digestifs. Les huîtres infectées par le parasite ne présentent aucun signe extérieur. Cette parasitose est parfois associée à la décoloration de la masse digestive, mais l'observation du parasite dans la glande digestive reste le critère le plus symptomatique de la marteiliose (Grizel et al., 1974). La maladie peut être partiellement maîtrisée grâce à l'élevage en eaux profondes, qui permet de diminuer la transmission du parasite (Duchêne et al., 2015).

En 1979, une autre **épizootie** de l'huître plate européenne est identifiée à l'île Tudy (Finistère, France). Elle est causée par un autre parasite **protozoaire** appartenant quant à lui à l'ordre des Haplosporidia, *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1979). A ce titre, l'infection d'*Ostrea edulis* à *B. ostreae* est également appelée « bonamiose de l'huître plate européenne ». Contrairement à la marteiliose, l'infection à *B. ostreae* ne peut pas être maîtrisée par l'élevage en eaux profondes (Duchêne et al., 2015). Le parasite **protozoaire** *B. ostreae* et la bonamiose de l'huître plate européenne seront respectivement décrits plus en détails dans les sections II et III de l'état de l'art.

Ces **épizooties**, notamment la bonamiose et la marteillose, ont eu un impact sans précédent sur la production d’huître plate en Europe, provoquant une diminution drastique des volumes de productions. A titre d’exemple, en 1962, la France produisait environ 20 000 tonnes d’huîtres plates, contre environ 1 000 tonnes en 2012 (figure 3) (Besnard-Cochennec, 2001 ; Duchêne et al., 2015).

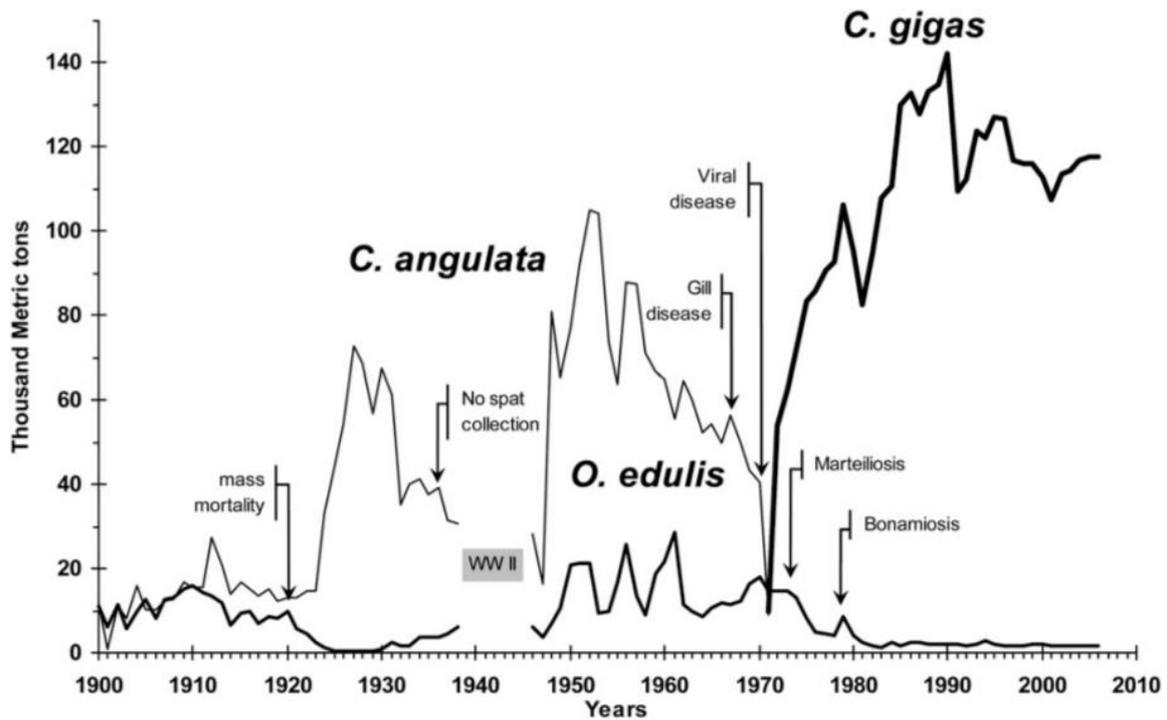


Figure 3 : Évolution de la production d’huîtres en France entre 1900 et 2010 (Buestel et al., 2009)

5. Production

L’élevage d’huître plate s’effectue principalement en milieu naturel : étangs d’eau salée, estuaires, estran, pleine mer, etc. (Blanchet, 2005).

L’approvisionnement en juvéniles se fait essentiellement par le captage du naissain dans le milieu naturel. Il s’effectue aux alentours de mai-juin, sur des collecteurs en coquilles de moules cuites (coquilles en tant que telles ou tubes remplis de coquilles en suspension) ou sur des plateaux recouverts de chaux, en **zone intertidale**. Des essais de production de naissain en écloserie ont également été entrepris mais à ce jour, le processus de reproduction n’est encore que partiellement maîtrisé (FAO, 2017).

Après sa fixation sur les collecteurs, le naissain passe par une étape de grossissement, où deux techniques de production peuvent être employées. La première technique est l’élevage en surélévation : elle fait intervenir des plateaux flottants, des filières, des lanternes, des cordes ou encore des paniers suspendus. Ces dispositifs d’élevage ont l’avantage d’être manipulables par les ouvriers, qui peuvent alors les débarrasser régulièrement du fouling, algues, et autres éléments indésirables. L’autre technique de grossissement est l’élevage à plat, dans laquelle le naissain, alors âgé d’un an, est semé directement par bateau sur un fond subtidal. La récolte des huîtres élevées de la sorte s’effectue essentiellement à la drague (FAO, 2017).

Après avoir été récoltées, les huîtres sont classées par tailles et passent par une étape d’**affinage** temporaire avant d’être commercialisées (FAO, 2017).

6. Intérêts économiques et écologiques

Malgré la persistance de la bonamiose et de la marteiliose, et la difficulté à atteindre les volumes de production du passé, les producteurs montrent depuis peu un regain d'intérêt pour l'huître plate européenne. En effet, depuis l'apparition d'épisodes de mortalités en 2008 sur *Crassostrea gigas*, les ostréiculteurs souhaitent se diversifier en réintégrant cette espèce patrimoniale, très appréciée pour son goût unique, dans leur production (Duchêne et al., 2015). Cette volonté de restauration des bancs naturels et de relance de la production est d'autant plus justifiée qu'il a été mis en évidence qu'*Ostrea edulis* était considérée comme une espèce ingénier de l'écosystème. En effet, elle favorise la création d'habitats favorables à l'installation de nouveaux organismes ainsi qu'à l'huître plate elle-même, contribuant ainsi à l'augmentation de la biodiversité dans son environnement proche (Smyth, Roberts, 2010).

Pour ces raisons, *Ostrea edulis* est inscrite sur la liste de l'OSPAR des espèces et habitats en déclin et/ou menacés, et bénéficie de projets de restaurations et de mesures de protection (Duchêne et al., 2015). Pour restaurer la production et les bancs naturels d'huîtres plates, des programmes de recherche ont également été initiés. A titre d'exemple, on peut citer le projet PERLE (Programme d'Expérimentation et de Recherche sur L'huître plate *Ostrea Edulis*), clôturé en 2014 et dont le principal objectif était de contribuer à relancer une production viable d'huîtres plates en Bretagne et à pérenniser cette production ancestrale (Hussenot et al., 2014).

II. Le parasite *Bonamia ostreae*

1. Taxonomie

Bonamia ostreae (Pichot et al., 1979) est un parasite **protozoaire** appartenant à l'ordre des Haplosporidia (WoRMS, 2017). Malgré l'absence de phase sporogonique, *B. ostreae* est classé dans l'ordre des Haplosporidia suite à l'observation de Particules Denses Structurées (PDS), que l'on peut rapprocher des haplosporomes, propres à ce taxon (Besnard-Cochennec, 2001 ; Blanchet, 2005). La taxonomie de *Bonamia ostreae* est présentée en annexe I.

2. Structure

En microscopie photonique, *Bonamia ostreae* apparaît sous la forme de petites cellules mesurant de 2 à 3 μm de diamètre, le plus souvent en position intracellulaire (figure 4A), et parfois en position extracellulaire (figure 4B).

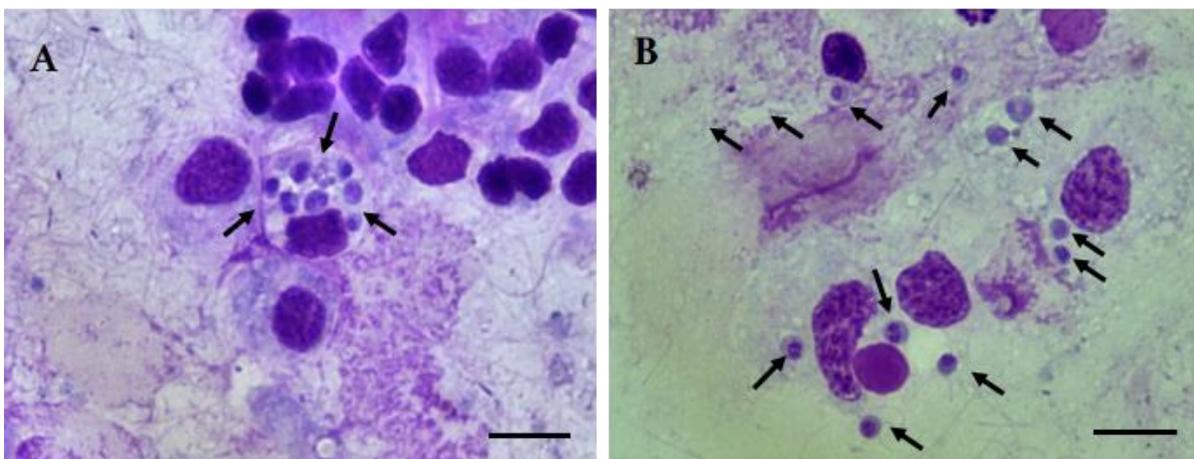


Figure 4 : Observations en microscopie photonique de formes intracellulaires (A) et extracellulaires (B) de *Bonamia ostreae* sur une apposition branchiale d'*Ostrea edulis* (photographies personnelles).

→ : *B. ostreae*. Echelle = 10 μm

En microscopie électronique, il est possible d'affiner la description du parasite en distinguant deux formes : les formes denses et les formes claires.

D'une manière générale, les formes denses sont plus répandues dans les tissus fortement parasités : elles renferment un cytoplasme riche en ribosomes, un noyau limité par deux membranes unitaires, constitué de matériel granuleux opaque aux électrons ainsi que des PDS de 130 à 170 nm de diamètre. Elles présentent également plusieurs mitochondries de grande taille (entre 0,5 et 1,8 μm de diamètre) dont les replis membranaires internes sont peu nombreux et en forme de crêtes. Enfin, il est également possible d'observer, suivant le plan de coupe la présence de corps denses de 0,5 μm de diamètre, sans structure apparente mais reconnus comme matériel de réserve (figure 5A).

Contrairement aux formes denses, les formes claires sont essentiellement retrouvées dans les tissus faiblement parasités. Elles mesurent de 2 à 4 μm de diamètre et présentent quelques différences structurales avec les formes denses, notamment un cytoplasme peu dense. Le noyau peut également présenter un **nucléole** volumineux localisé en périphérie. Les mitochondries sont quant à elles caractérisées par la présence de crêtes membranaires plus nettes et plus nombreuses. Par ailleurs, on note la présence d'un troisième type d'organelle, représenté par des formes membranaires refermées en saccules, observé uniquement chez les formes claires et morphologiquement assimilable à un appareil de Golgi. En revanche, la présence de PDS (de 130 à 200 nm de diamètre) est toujours relevée (figure 5B) (Besnard-Cochennec, 2001 ; Blanchet, 2005 ; Pichot et al., 1979).

Il est intéressant de noter que Pichot et al. (1979) ont interprété les formes denses et claires comme étant respectivement des formes de résistance et des formes végétatives du parasite.

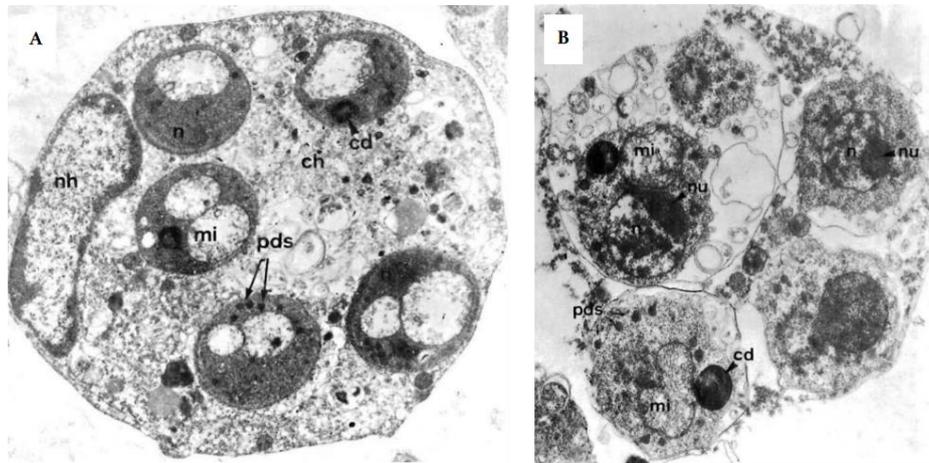


Figure 5 : Observations en microscopie électronique de formes denses (A) ($G \times 12400$) et claires (B) ($G \times 16000$) de *B. ostreae* infectant un hémocyte d'*O. edulis* : noyau de la cellule hôte (nh), noyau du parasite (n), mitochondrie (mi), particule dense structurée (pds), corps dense (cd), nucléole (nu) (Pichot et al., 1979)

3. Distribution tissulaire

Bonamia ostreae est un parasite essentiellement intrahémocytaire. De ce fait, l'infection à *B. ostreae* est souvent systémique et associée à une infiltration hémocytaire généralisée (Arzul, Carnegie, 2015). Néanmoins, il peut également être observé en position extracellulaire au niveau des **épithéliums** branchiaux ou de la glande digestive et en libre circulation dans l'**hémolymphe**, cette dernière forme étant sans doute associée à la lyse d'hémocytes surparasités (Blanchet, 2005).

4. Spectre d'hôtes et espèces réservoir

A ce jour, *Bonamia ostreae* est identifié comme un pathogène strict de l'huître plate. Il est retrouvé chez *Ostrea edulis* depuis la fin des années 1970 (Pichot et al., 1979) et a récemment été reporté en Nouvelle-Zélande chez une espèce proche, *Ostrea chilensis* (Lane et al., 2016).

En dehors de ses hôtes naturels, *Bonamia ostreae* a également été détecté chez huit espèces de macroinvertébrés benthiques ainsi que 19 échantillons de zooplancton, suggérant ainsi l'existence d'espèces réservoirs, potentiellement impliquées dans la transmission de la maladie (Lynch et al., 2007) (voir Partie III. 5.).

5. Cycle parasitaire

Au niveau intrahémocytaire, *B. ostreae* se multiplie selon un mode **schizogonique**, par divisions binaires simples (Besnard-Cochennec, 2001). Des formes **plasmodiales**, peu fréquentes, ont également été décrites, notamment chez les individus moribonds (Arzul, Carnegie, 2015). Il semblerait donc qu'il existe deux types de multiplication du parasite dans son hôte : le premier pouvant correspondre à un stade précoce de la maladie, avec la division binaire simple ; et le second pouvant correspondre à un mode de multiplication fugace ou à un développement explosif du parasite en fin de maladie, avec une multiplication à partir de **plasmodes** (Besnard-Cochennec, 2001).

Au niveau de l'hôte, les voies d'entrée et de sortie du parasite semblent reposer sur les **épithéliums** des organes palléaux, en particulier au niveau des branchies (Montes et al., 1994). Par ailleurs, il est possible de transmettre l'infection d'une huître infectée à une huître saine par cohabitation, ce qui confirme ainsi la non nécessité d'un hôte intermédiaire pour l'accomplissement du cycle parasitaire (Hervio et al., 1995).

III. L'infection d'*O. edulis* à *B. ostreae*

1. Définition et histoire

Communément appelée « bonamiose de l'huître plate européenne » et également connue sous le nom de « maladie hémocytaire de l'huître plate » ou encore « parasitose hémocytaire », l'infection à *Bonamia ostreae* n'entraîne pas d'altération organoleptique de l'huître. De plus, la consommation d'huître parasitée n'entraînant aucun méfait chez l'homme, la bonamiose n'est donc pas une zoonose (Blanchet, 2005). Elle est qualifiée d'**épizootie** en raison de son apparition soudaine et localisée sur une population définie (Encyclopædia Universalis, 2017).

Elle fut détectée pour la première fois en France en 1979 à l'île Tudy (Finistère, France) où de fortes mortalités ont été relevées et associées à un parasite jusqu'alors inconnu en France : *Bonamia ostreae*, dont l'introduction dans le pays serait due à des importations de naissain californien entre 1969 et 1986. Le parasite s'est ensuite rapidement propagé au sein des élevages français pour en atteindre la majeure partie vers la fin des années 1980. Par la suite, des échanges internationaux ont favorisé l'expansion du parasite vers de nombreux pays européens, mais également sur le continent nord-américain (Blanchet, 2005) et plus récemment en Nouvelle-Zélande (Lane et al., 2016).

Aujourd'hui, la bonamiose est une maladie à déclaration obligatoire auprès de l'Union Européenne et de l'Organisation Mondiale pour la Santé Animale (OIE).

2. Symptômes et signes pathologiques

Les seuls signes cliniques, non **pathognomoniques**, associés à l'infection à *Bonamia ostreae* sont une décoloration jaunâtre et/ou la présence d'**ulcères** perforants sur les branchies, la glande digestive et le manteau des animaux infectés (OIE, 2009). Les animaux moribonds présentent une coquille ouverte, dont la vitesse de fermeture au toucher est bien inférieure à celle d'animaux sains. Les animaux morts présentent quant à eux une coquille ouverte ne se refermant pas au toucher (Blanchet, 2005). D'une manière générale, la mort de l'hôte survient lorsque le niveau d'infection est élevé (Arzul, Carnegie, 2015).

3. Diagnostic

La bonamiose n'étant pas associée à des signes **pathognomoniques**, le seul moyen de la diagnostiquer reste le diagnostic microscopique ou moléculaire, réalisés à partir de tissus d'animaux vivants ou moribonds.

Le diagnostic microscopique repose sur deux approches :

- la **cytologie**, basée sur la lecture d'**apositions** de tissus cardiaques ou branchiaux colorées au Wright Giemsa (EURL for Molluscs Diseases, 2017).
- l'**histologie**, reposant sur l'observation de sections de tissus fixés en paraffine (branchies, glande digestive, manteau et gonade) colorées à l'hématoxyline éosine (EURL for Molluscs Diseases, 2017).

L'analyse **cytologique** a l'avantage de permettre un diagnostic rapide et éventuellement non léthal pour l'hôte. En revanche, il en résulte une détérioration des tissus, empêchant la description de la distribution tissulaire du parasite et des lésions associées à l'infection. A l'inverse, le diagnostic histologique respecte l'intégrité des tissus et permet de décrire la distribution tissulaire du parasite, ainsi que les lésions associées. Toutefois, cette technique est moins sensible (da Silva, Villalba, 2004) et est plus longue à mettre en œuvre que la **cytologie**. Les techniques histocytologiques requièrent une certaine expérience de la part de l'observateur (OIE, 2009) et ne permettent pas de distinguer les différentes espèces de parasites du genre *Bonamia*, en particulier *B. ostreae* et *B. exitiosa*, également présent dans certaines populations d'huîtres plates en Europe.

Le diagnostic moléculaire repose sur deux techniques : la réaction de polymérisation en chaîne ou polymerase chain reaction (PCR) et l'hybridation in situ (HIS). Elles sont basées sur la reconnaissance et la révélation d'une séquence d'acides nucléiques spécifique de *Bonamia ostreae* par l'utilisation combinée de sondes et/ou d'amorces. Ces techniques sont plus sensibles et plus spécifiques que les approches histocytologiques (OIE, 2009).

Enfin, la microscopie électronique à transmission (MET) peut également être utilisée pour une description **ultrastructurale** du parasite lorsque celui-ci est observé chez une nouvelle espèce ou que les manifestations de la maladie évoluent.

4. Distribution géographique

Depuis sa première déclaration en France en 1979, l'infection à *B. ostreae* est aujourd'hui détectée de nombreux pays d'Europe : France, Irlande, Italie, Pays-Bas, Portugal, Espagne, Royaume-Uni, (OIE, 2009) et également au Danemark (Madsen, Thomassen, 2015). Elle est aussi retrouvée sur le continent nord-américain, au Canada (Colombie-Britannique) et aux Etats-Unis (Californie, Maine et Washington) (OIE, 2009). Enfin, elle a récemment été identifiée en Nouvelle-Zélande, sur *Ostrea chilensis* (Lane et al., 2016).

5. Transmission de la maladie

Bonamia ostreae est un pathogène strict de l'huître plate. Il peut être retrouvé dans tous les stades de développement, de la larve à l'adulte, bien que les individus les plus âgés soient les plus touchés par les mortalités (Arzul, Carnegie, 2015). Son cycle parasitaire est direct : la transmission se fait d'huître à huître, par contact proche entre les coquillages ou après une phase de transport par les courants. De plus, le parasite peut profiter de la phase planctonique de la larve pour être dispersé (Arzul et al. 2011) (figure 6).

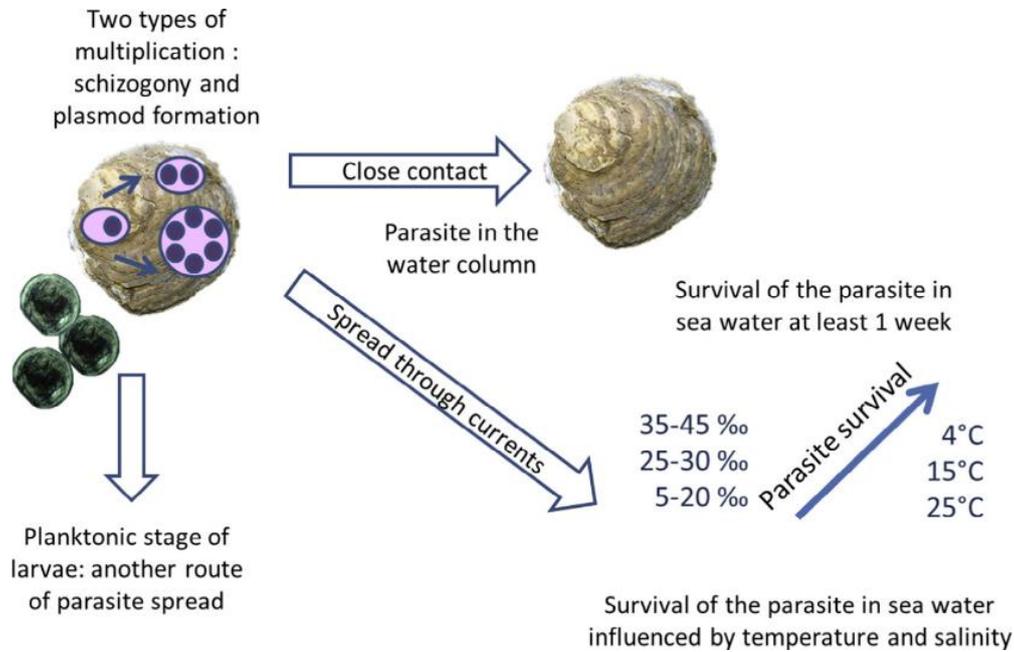


Figure 6 : Dynamique d'infection de *B. ostreae* dans son hôte bivalve *O. edulis* : transmission, dispersion et influence des facteurs environnementaux (Arzul, Carnegie, 2015)

Bien que le cycle parasitaire de *Bonamia ostreae* soit direct, il est possible que le parasite puisse emprunter des voies de propagation autres que celle reposant sur le contact entre individus proches. En effet, Lynch et al. (2007) ont pu détecter l'ADN de *B. ostreae* dans huit espèces de macroinvertébrés benthiques ainsi que 19 échantillons de zooplancton, et sont parvenus à transmettre le parasite à deux huîtres plates saines lors de leur cohabitation avec *Ophiothrix fragilis* (détecté positif à *B. ostreae*). Néanmoins, la corrélation entre la densité d'*Ostrea edulis* et la prévalence de l'infection à *B. ostreae* suggère que la dissémination et la survie du parasite dépendent essentiellement d'*O. edulis*, et que les autres organismes aquatiques sont peu impliqués dans le cycle parasitaire de *B. ostreae* (Arzul, Carnegie, 2015).

Par ailleurs, les courants marins, les bateaux ou le transfert d'autres espèces peuvent également intervenir dans la dissémination du parasite. Toutefois, dans ce cadre, le transfert d'huîtres infectées reste le moyen de propagation le plus important (Blanchet, 2005).

Enfin, il est important de noter que la bonamiose est associée à une période pré-patente de 3 à 5 mois pendant laquelle il est impossible de détecter un animal infecté en histologie (Blanchet, 2005). Toutefois, des données récentes (non publiées) semblent montrer qu'il est possible de détecter le parasite de manière plus précoce (18 jours après cohabitation) grâce aux techniques moléculaires (HIS).

6. Influence des facteurs biotiques et abiotiques

Bien que l'infection à *Bonamia ostreae* puisse toucher aussi bien les larves, le naissain que des individus adultes, les individus âgés (2+) semblent être les plus sensibles à la maladie (OIE, 2009). Par ailleurs, une fois qu'un individu est infecté, l'intensité de l'infection augmente avec l'âge et/ou la taille de l'animal, jusqu'à sa mort (Culloty, Mulcahy, 1996).

L'infection à *Bonamia ostreae* peut être contractée et transmise durant toute l'année. Néanmoins, une variation saisonnière existe, avec une augmentation de la prévalence à l'automne, jusqu'à l'atteinte d'un pic en hiver ou au début du printemps (Arzul, Carnegie, 2015 ; OIE, 2009). Par ailleurs, Engelsma et al. (2010) ont montré qu'*O. edulis* semblait être plus sensible à l'infection à *B. ostreae* après une période d'accès restreint à la nourriture et une période de basse salinité. Enfin, Arzul et al. (2009) ont montré que des températures basses (4°C et 15°C) ainsi que des salinités élevées (> 35 g/L) favorisaient la survie du parasite. Ainsi, sur une zone donnée, des températures basses et des salinités élevées dans l'eau en été induisent une prévalence de l'infection plus importante l'hiver suivant (OIE, 2009).

7. Méthodes de lutte et de prévention

L'ostréiculture étant une activité pratiquée en milieu ouvert, le traitement médicamenteux n'est pas envisageable. De plus, les huîtres ne disposant de **système immunitaire adaptatif**, l'utilisation de vaccins est également une voie sans issue (OIE, 2009). Enfin, l'infection à *Bonamia ostreae* pouvant se maintenir dans des gisements d'*Ostrea edulis* de faible densité, l'éradication de cette maladie reste très difficile à mettre en œuvre (Van Banning, 1987).

Ainsi, les moyens de lutte et de prévention reposent essentiellement sur les restrictions de transferts vers les zones indemnes, ce qui nécessite la mise en place de programme de surveillance de la maladie. En zones infectées, l'amélioration zootechnique, par la sélection génétique d'individus résistants (Naciri-Graven et al., 1998) ; et les pratiques d'élevage, notamment avec l'élevage en cohabitation de *O. edulis* et *C. gigas* (Carnegie, Cochenne-Laureau, 2004), permettent de réduire l'impact de la maladie.

Une meilleure compréhension du cycle parasitaire et des interactions du parasite avec son hôte reste nécessaire afin de proposer les mesures de gestion et de contrôle les plus adaptés.

IV. Un modèle conceptuel de transmission pour *Bonamia ostreae* ?

Les modèles épidémiologiques mathématiques s'avèrent très utiles pour synthétiser les connaissances disponibles au sujet d'une maladie, en y ajoutant une dimension quantitative. Ils permettent notamment d'analyser l'importance relative de différents facteurs influençant la dissémination et/ou la propagation d'une maladie au sein d'une population (Lupo et al., non publié). Ces modèles sont généralement centrés sur un agent infectieux et décrivent l'évolution de la pathologie au sein d'une population d'hôtes d'une manière spatiale ou temporelle, voire spatio-temporelle pour des modèles plus complexes.

Au niveau des maladies environnementales, le modèle de transmission de *Vibrio cholerae*, une bactérie responsable du choléra chez l'être humain, au sein d'une population humaine de Codeço (2001) est une référence. On parlera plus précisément ici de modèle compartimental « Susceptible Infectious Recovered » (SIR), du fait de l'évolution de la maladie au sein de la population à travers différents compartiments, chacun associé à un état l'hôte. Le transfert d'un compartiment à l'autre est fonction d'équations différentielles, faisant intervenir un (ou plusieurs) paramètre(s) choisi(s) arbitrairement mais restant biologiquement pertinent(s) (Lupo et al., non publié). Ces modèles ne sont pas exhaustifs : ils présentent une vision orientée de l'évolution d'une maladie au sein d'une population, dans le but de répondre à un objectif précis, comme par exemple l'étude de la transmission d'un pathogène au sein d'une population d'hôtes ou bien l'étude de la prolifération d'un pathogène dans un environnement donné.

2. Paramètres

- f = quantité d'eau de mer filtrée par l'huître
- λW = probabilité d'être infecté
- q_1 = temps minimal nécessaire pour passer de E à I_1
- q_2 = temps minimal nécessaire pour passer de I_1 à I_2
- q_3 = temps minimal nécessaire pour passer de I_2 à I_3
- r = temps minimal nécessaire pour passer de I_3 à D
- e_{i1} = taux d'excrétion d'un individu I_1
- e_{i2} = taux d'excrétion d'un individu I_2
- e_{i3} = taux d'excrétion d'un individu I_3
- e_d = taux d'excrétion d'un individu D
- εW = temps de survie du parasite dans l'eau de mer

Nous avons choisi de faire figurer trois états d'infection d'*Ostrea edulis*, faible (I_1), modéré (I_2) et fort (I_3) en partant de l'hypothèse que plus l'hôte est infecté, plus son taux d'excrétion de parasites est important. De plus, la littérature identifiant généralement la décomposition des tissus d'animaux morts infectés comme principale source de parasites (Arzul et al., 2009), nous avons choisi d'intégrer au modèle un compartiment associé aux animaux morts (D), avec un taux d'excrétion distinct. Toutefois, dans le but de conserver un modèle simple, nous avons choisi de ne considérer que la transmission de la maladie par le contact entre individus proches et de ne pas faire figurer sur le modèle les voies de transmission alternatives, notamment celles associées aux larves et aux autres organismes aquatiques.

Dans le cadre de ce rapport, ce modèle a constitué un aboutissement de l'état de l'art et nous a permis d'identifier des paramètres à étudier expérimentalement pour améliorer notre compréhension de la transmission de l'infection à *Bonamia ostreae*. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'étude de la survie et de l'excrétion du parasite en dehors de son hôte (paramètres entourés en rouge sur la figure 7). A terme, le modèle sera non seulement un outil intéressant pour synthétiser nos connaissances sur l'infection d'*O. edulis* à *B. ostreae* mais il permettra également de tester l'efficacité de mesures de gestion sur la transmission du parasite.

Partie 2. Matériel et méthodes

I. Matériel biologique

1. Sélection d'huîtres plates infectées à *Bonamia ostreae*

Pour mettre en place nos expériences, nous avons sélectionné des huîtres plates infectées à *Bonamia ostreae* à partir des animaux **stabulés** dans la salle d'élevage du LGPMM. Les huîtres plates utilisées provenaient de la région Bretagne (Brest, Quiberon, Trieux) et ont toutes été acclimatées au moins 3 jours dans la salle d'élevage avant la campagne de sélection.

Après anesthésie des animaux par immersion dans un bain de MgCl₂ (Suquet et al., 2010), les huîtres infectées ont été sélectionnées par l'observation en microscopie photonique d'**appositions** de biopsies branchiales colorées à l'Hémacolor® (Elgharsalli et al., 2013). Lors de la lecture des **appositions**, trois niveaux d'infections ont été déterminés : faible, modéré et fort, sur la base des critères présentés dans le tableau 1. La figure 8 présente des photographies d'observations microscopiques représentatives des niveaux d'infection établis.

Tableau 1 : Description des critères retenus pour déterminer les trois niveaux d'infection lors de la lecture des appositions

Infection	Description de l'apposition
Faible	Quelques parasites isolés (voire par 2 ou 3) avec de nombreuses zones vierges de parasite
Modérée	Au moins un parasite par section d'apposition parcourue
Forte	La plupart des champs observés présentent au moins 1 parasite. De nombreux parasites sont présents en intracellulaire

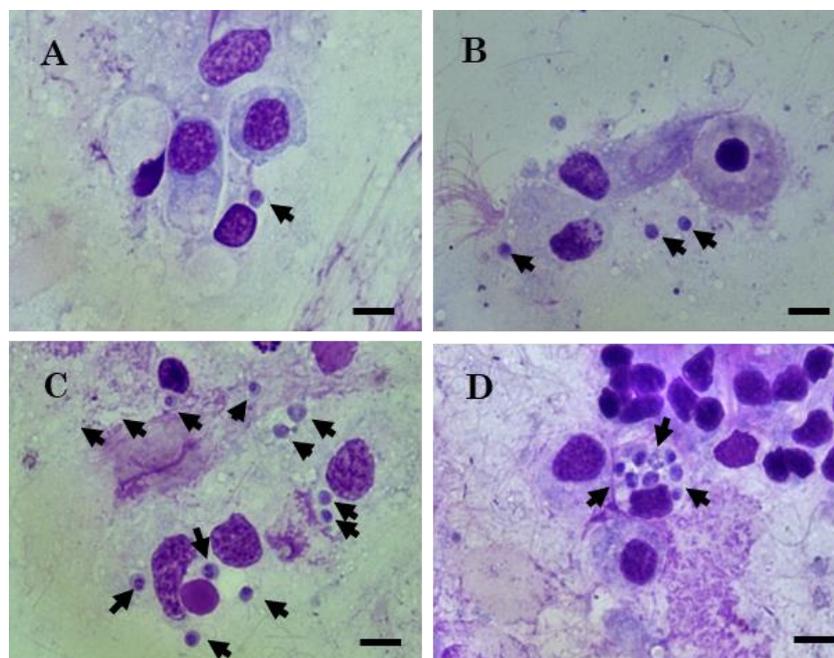


Figure 8 : Observations en microscopie photonique de champs représentatifs des niveaux d'infection établis lors de la lecture des appositions (photographies personnelles).

A : faible, B : modéré, C et D : fort. → : *B. ostreae*. Echelle : 10 µm

Finalement, sur les 338 huîtres plates analysées, 50 ont été identifiées comme étant infectées à *B. ostreae*. Parmi elles, 20 ont été identifiées comme faiblement infectées, 15 modérément, et 15 fortement infectées.

2. Suspension de *Bonamia ostreae* purifiés

La détermination du seuil de détection de l'approche utilisée pour détecter *Bonamia ostreae* dans l'eau de mer a nécessité une suspension de parasites purifiés. Celle-ci a été obtenue par purification sur gradients de sucrose des tissus d'une huître morte infectée à *B. ostreae*, selon le protocole établi par Mialhe et al. (1988). La pureté et la concentration de la suspension obtenue ont été évaluées par observation et comptage des parasites sur une cellule de Malassez (figure 9).

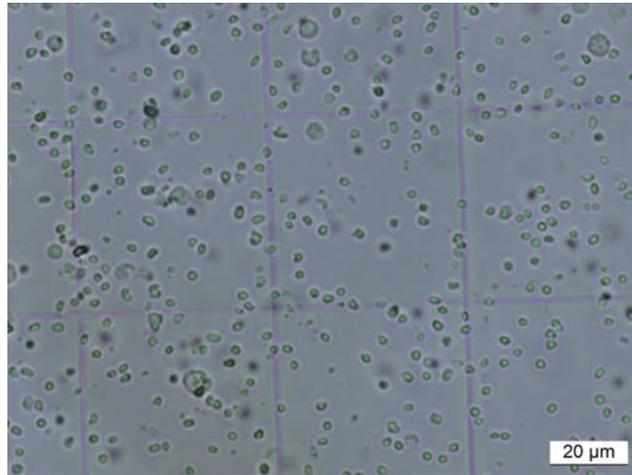


Figure 9 : Observation en microscopie photonique de parasites purifiés sur une cellule de Malassez
© C. Montaubin

II. Méthode : Détection de *Bonamia ostreae* dans l'eau par PCR en temps réel

Pour étudier la survie et l'excrétion de *Bonamia ostreae* en dehors de son hôte, nous avons utilisé une approche basée sur la filtration et l'analyse par PCR en temps réel, permettant de détecter et de quantifier *B. ostreae* à partir d'un échantillon d'eau de mer. Cette approche repose sur les trois étapes suivantes.

1. Filtration sur membrane

Les échantillons d'eau de mer ont tout d'abord été préfiltrés à 20 µm puis filtrés sur membranes de nitrocellulose (0,8 µm) ou polycarbonate (1 µm) en utilisant une rampe de filtration reliée à une pompe à vide. Des travaux précédents ont montré que les 2 types de membranes utilisées donnaient les mêmes résultats en terme de détection d'ADN de parasite (Hugel, 2016). Une fois la filtration terminée, les membranes ont été conservées à -80°C jusqu'à l'étape d'extraction.

2. Extraction d'ADN à partir des membranes

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir des membranes de filtration en utilisant le kit *PowerWater DNA Isolation Kit* (MOBIO ®), désormais distribué par QIAGEN ® en tant que *DNeasy PowerWater Kit*. Elle repose sur notamment sur les étapes suivantes (une version schématisée du protocole est présentée en annexe II) :

- 1) Les membranes sont placées dans une solution de lyse permettant la dégradation des parois cellulaires et la libération des acides nucléiques.
- 2) Une solution de précipitation est ajoutée afin d'éliminer les composants inorganiques, ainsi que les composants organiques qui ne sont pas des acides nucléiques.
- 3) Une solution saline est ajoutée afin de permettre la liaison spécifique des acides nucléiques sur une colonne de silice utilisée dans les étapes ultérieures.

4) Des lavages successifs sont effectués à partir de solutions alcooliques afin d'éliminer les résidus des solutions précédemment utilisées et purifier les acides nucléiques.

5) Les acides nucléiques sont finalement séparés de la colonne grâce à un tampon d'éluion, dans lequel ils seront conservés à 4°C ou à -80°C jusqu'à leur analyse.

Afin de vérifier l'absence de contamination inter-échantillon durant les manipulations, des « blancs d'extraction » (réactifs seuls) ont été intégrés dans chaque série d'extraction réalisée.

3. PCR en temps réel

La réaction de polymérisation en chaîne ou polymerase chain reaction (PCR) est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier spécifiquement une séquence d'acides nucléiques grâce à l'action conjointe d'un couple d'amorces sens et antisens spécifiques de cette séquence, d'une enzyme ADN polymérase et de nucléotides libres dans le milieu réactionnel. Cette amplification s'effectue par l'alternance cyclique de deux températures, généralement 95°C et 60°C, répétée n fois et permettant respectivement la **dénaturation** de l'ADN double brin et l'**hybridation** des amorces, suivi de la synthèse du brin complémentaire. A l'issue de la réaction de PCR, on obtient 2ⁿ copies de la séquence d'ADN cible (Saiki et al., 1988) (figure 10).

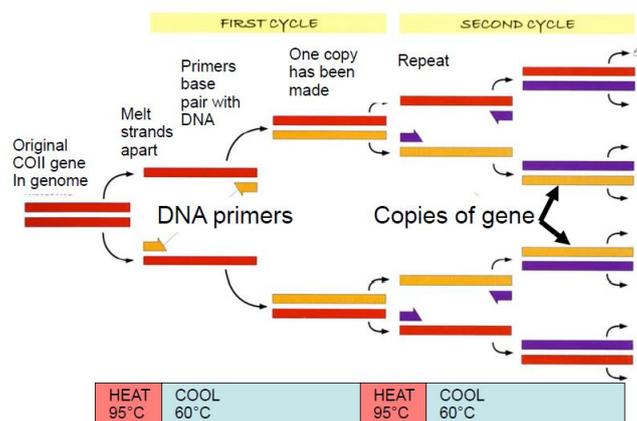


Figure 10 : Schéma du principe de la PCR (Saiki et al., 1985)

La PCR en temps réel est une méthode variante de la PCR décrite par Saiki et al. (1988). Elle est basée sur la détection et la quantification d'un composé fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'**amplicons** générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il est possible de suivre la réaction de PCR durant sa phase exponentielle et de déterminer la quantité initiale de la matrice originale cible. Le cycle seuil, ou Cycle threshold (Ct) est le cycle à partir duquel la fluorescence est détectée par l'appareil : il correspond à une quantité de matrice cible qu'il est possible de déterminer si une gamme de quantités de cible connues est incorporée à l'analyse.

Les deux principales approches utilisées pour la détection quantitative des **amplicons** sont les agents se liant à l'ADN double brin synthétisé (ex : SYBR Green I ®) et les sondes fluorescentes (ex : TaqMan ®). Pour nos analyses, nous avons utilisé la méthode TaqMan ®. Grâce à son **activité 5'-exonucléasique**, la Taq polymérase (ADN polymérase produite par la bactérie *Thermus aquaticus*) hydrolyse, durant l'étape d'élongation de la PCR, la sonde qui s'est hybridée sur l'**amplicon** (Poitras, Houde, 2002). L'hydrolyse de la sonde stimule le fluorochrome dont la fluorescence est alors captée par le thermocycleur. La figure 11 propose un schéma du principe de la chimie TaqMan.

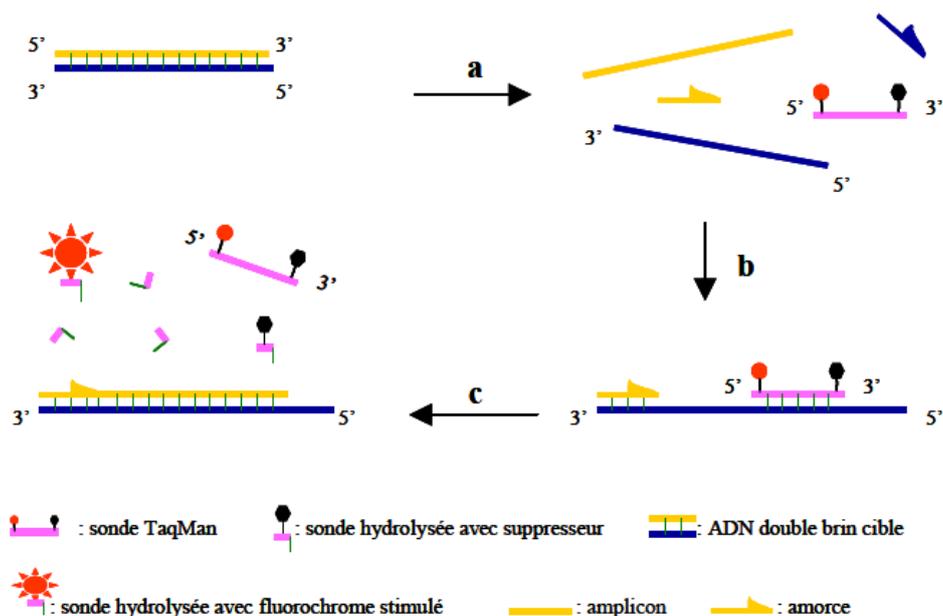


Figure 11 : Schéma du principe de fonctionnement de la chimie TaqMan (Poitras, Houde, 2002)

Dans le cadre de nos expériences, nous avons suivi la version simplex *Bonamia* du protocole de la PCR en temps réel multiplex *Bonamia / Marteilia*, actuellement en cours de validation au LGPMM. La séquence ciblée par les amorces correspondait à un fragment de 199 paires de bases (pb) de la séquence du gène codant pour l'ARNr 18S de *Bonamia sp.* Lors des essais de PCR en temps réel, les échantillons ont été analysés par un appareil Mx3000P (Stratagene ®) dans des plaques 96 puits contenant chacun 20 µl de mélange réactionnel de PCR et 5 µl de produits d'extraction (pur ou dilué à 5 ng d'ADN/µL). La composition du mélange réactionnel et le programme d'amplification sont présentés en annexe III.

Sur chaque plaque 96 puits, les échantillons ont systématiquement été déposés en duplicats. Pour valider les résultats des PCR et attester l'absence de contamination dans la manipulation, différents contrôles ont également été déposés sur chacune des plaques :

- un « contrôle mix », pour vérifier l'intégrité des réactifs utilisés dans la préparation du mélange réactionnel de PCR.
- un « contrôle dilution », pour vérifier l'absence de contamination des échantillons par l'eau utilisée pour réaliser les dilutions.
- un « contrôle positif », pour vérifier le bon fonctionnement de la réaction de PCR.
- un « blanc d'extraction », pour vérifier l'absence de contamination inter-échantillon durant l'extraction des acides nucléiques.

Au final, la réaction de PCR est validée si les blancs d'extraction, les contrôles mix et les contrôles dilution ne présentent aucune détection et si le contrôle positif est bien détecté positif.

III. Protocoles expérimentaux

1. Détermination du seuil limite de détection

Des travaux précédents ont permis de développer une approche permettant la détection de l'ADN de *Bonamia ostreae* dans l'eau de mer après filtration grâce à une analyse en PCR en temps réel (Hugel, 2016). Le seuil limite de détection de cette approche n'avait cependant pas été établi. Afin d'établir ce seuil, une gamme de dilutions a été préparée à partir d'une suspension de parasites purifiés (voir Partie 2. I. 2.).

La concentration en parasites de la suspension a été évaluée par comptage sur une cellule de Malassez puis ajustée à 5.10^5 *B. ostreae*/mL en eau de mer filtrée à $0,22\mu\text{m}$ (EDMF). Les dilutions suivantes ont ensuite été préparées en EDMF : 5.10^5 , 5.10^4 , 5.10^3 , 5.10^2 , 5.10^1 et 5 *B. ostreae*/mL ; et 2 mL de chacune de ces dilutions ont ensuite été filtrés sur une membrane de polycarbonate $1\mu\text{m}$. Chaque membrane contenait ainsi l'équivalent de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 ou 10^1 *B. ostreae*. Enfin, ces dernières ont été analysées en PCR en temps réel après extraction des ADN selon la méthode présentée dans les parties II.2. et II.3. Outre la définition du seuil limite de détection de notre approche (plus petite quantité de parasites détectée), cette gamme de dilution a été intégrée à chaque essai de PCR réalisé afin de quantifier le nombre de parasite détecté.

2. Etude de la survie de *Bonamia ostreae* en dehors de son hôte

Afin d'étudier la survie de *Bonamia ostreae* en dehors de son hôte au cours du temps, nous avons « ensemencé » deux litres d'eau de mer en parasites en y faisant **stabuler** des huîtres plates détectées infectées à *B. ostreae* (voir Partie 2. I. 1.) pendant 24h. Avant d'y introduire les animaux, l'eau de mer a préalablement été traitée aux UV afin de s'affranchir d'une éventuelle contamination initiale en parasite. Après 24h de **stabulation**, les huîtres ont été retirées et le volume d'eau « ensemencé » a été conservé dans un flacon de verre dans une étuve vitrée à 15°C . Une solution d'antibiotiques Streptomycine (2 451,2 U/mL) + Pénicilline G (11 035,32 U/mL) a été diluée au $1/1000^{\text{ème}}$ dans le volume d'eau ensemencé, immédiatement après le retrait des animaux, afin de limiter la prolifération bactérienne. Ce volume d'eau ensemencé a ensuite fait l'objet de prélèvements d'échantillons de 100 mL immédiatement, 1, 2, 7, 15 et 30 jours après retrait des animaux. Ces prélèvements ont été filtrés sur membranes $0,8 - 1\mu\text{m}$ et les filtres ont été analysés en PCR en temps réel après une étape d'extraction d'ADN (voir partie II. 2).

L'expérience a été réalisée trois fois à partir de trois lots d'huîtres plates, homogènes vis-à-vis du nombre d'animaux et de leur niveau d'infection. Une analyse en PCR en temps réel de l'eau de mer traitée aux UV a également été effectuée de manière à vérifier l'absence de contamination initiale. La composition des lots d'huîtres plates utilisés dans cette expérience est présentée en annexe IV. Un schéma détaillé du protocole expérimental est présenté en annexe V.

3. Suivi de l'excrétion de *Bonamia ostreae* en dehors de son hôte

L'excrétion de *Bonamia ostreae* en dehors de son hôte a été suivie individuellement dans le temps. Pour cela, des huîtres plates détectées infectées à *B. ostreae* (voir Partie 2. I. 1.) ont été **stabulées** individuellement dans 250 mL d'eau de mer. Tous les trois à quatre jours pendant un mois, les 250 mL d'eau de mer ont été filtrés sur membrane $0,8 - 1\mu\text{m}$ puis renouvelés pour chaque individu. Les membranes ont été analysées en PCR en temps réel après extraction d'ADN (voir partie II. 2.).

Les huîtres ont été **stabulées** dans des béciers plastiques contenant de l'eau de mer provenant de la salle d'élevage du LGPMM, c'est-à-dire traitée aux UV, filtrée sur deux filtres à sable (avant et après le traitement UV) et enrichie en phytoplancton (*Skeletonema sp.*, 200 L/h). Un bullage léger a été assuré dans chacun des béciers et ceux-ci ont été maintenus dans un bain marie à 15°C . Régulièrement, l'eau de mer utilisée pour **stabuler** les huîtres a été filtrée et analysée en PCR en temps réel afin de vérifier l'absence de contamination initiale en parasites. Les caractéristiques des huîtres plates utilisées dans cette expérience sont présentées en annexe VI. Un schéma détaillé du protocole expérimental est présenté en annexe VII.

Partie 3. Résultats

I. Détermination du seuil limite de détection de l'ADN de *Bonamia ostreae* dans l'eau

Le seuil limite de l'approche utilisée pour détecter l'ADN de *Bonamia ostreae* dans un échantillon d'eau de mer a été déterminé par l'analyse en PCR en temps réel de trois séries d'extraction ADN, réalisées à partir de la gamme de dilution sur 1/4 de membrane. Pour chaque essai de PCR, le même contrôle positif été utilisé afin de servir par la suite de calibrateur inter-essai. En prenant en compte la concentration des solutions de la gamme en *Bonamia ostreae* et le volume d'échantillon filtré, et après avoir harmonisé les résultats entre les essais de PCR, il a été possible d'établir une corrélation entre une valeur de Ct et un nombre de parasites détecté (figure 12).

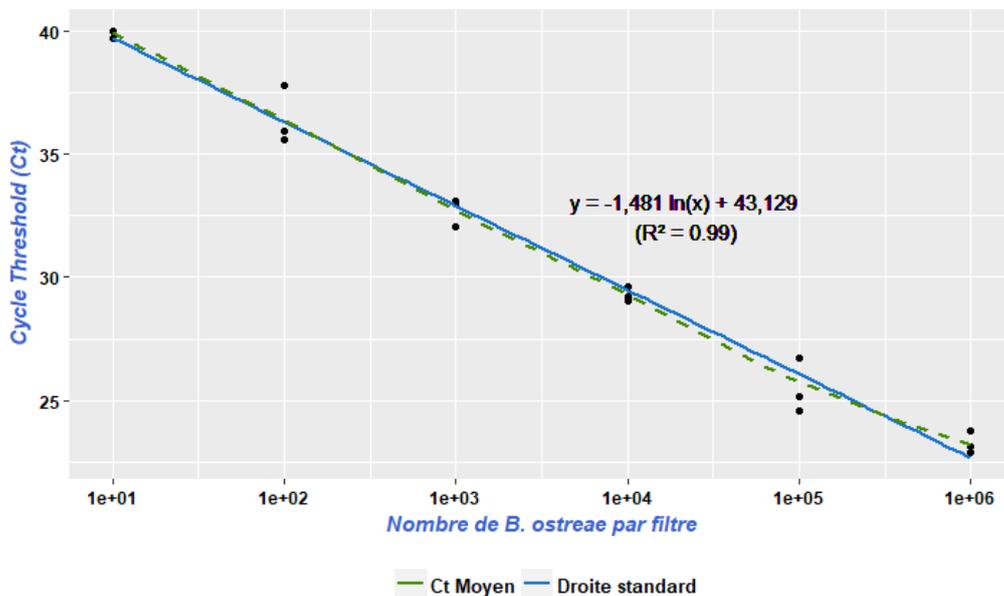


Figure 12 : Droite standard établissant le lien mathématique entre une valeur de Ct obtenue en PCR en temps réel et un nombre de parasite détecté via la fonction $y = -1,481 \ln(x) + 43,129$; où y correspond au Ct et x correspond au nombre de parasites.

Les premières analyses nous ont permis de constater que le seuil de détection était situé entre 100 et 10 *B. ostreae* par filtre. Afin de préciser ce seuil, la suspension d'ADN correspondant à 100 *B. ostreae* a été diluée à un équivalent de 60, 30 et 10 *B. ostreae*. L'analyse de six duplicats de ces nouveaux échantillons a permis d'obtenir les résultats suivants :

- 60 *B. ostreae* : détecté 6 fois sur 6
- 30 *B. ostreae* : détecté 5 fois sur 6
- 10 *B. ostreae* : détecté 2 fois sur 6

L'ensemble de ces résultats nous permet donc de conclure que le seuil de détection de l'ADN de *B. ostreae* dans l'eau est compris entre 10 et 30 parasites par filtre.

II. Etude de la survie de *B. ostreae* en dehors de son hôte

Afin d'évaluer la survie de *Bonamia ostreae* en dehors de son hôte, nous avons quantifié l'ADN parasitaire par PCR en temps réel, en duplicat et à partir d'1/4 de filtre pour chaque prélèvement réalisé au cours de l'expérience : J0, J1, J2, J7, J15 ou J30 après retrait des huîtres.

Pour cette expérience, trois groupes d'huîtres (lot 1, lot 2, lot 3) ont chacun été transférés successivement dans trois bacs contenant deux litres d'eau de mer traitée aux UV (bac A, bac B, bac C). Ainsi, pour chaque temps, un total de 9 échantillons a été analysé. De la même façon que précédemment, le même contrôle positif a été intégré dans chaque analyse en PCR afin de servir de calibrateur inter-essai. Une courbe standard (figure 13) a également été incluse dans chaque essai de PCR afin de calculer le nombre de parasites retenus sur chaque membrane de filtration. En tenant compte du volume filtré, il a finalement été possible de déterminer la concentration de l'échantillon en parasite au moment du prélèvement (en *B. ostreae* / mL). Les résultats obtenus sont présentés en figure 14.

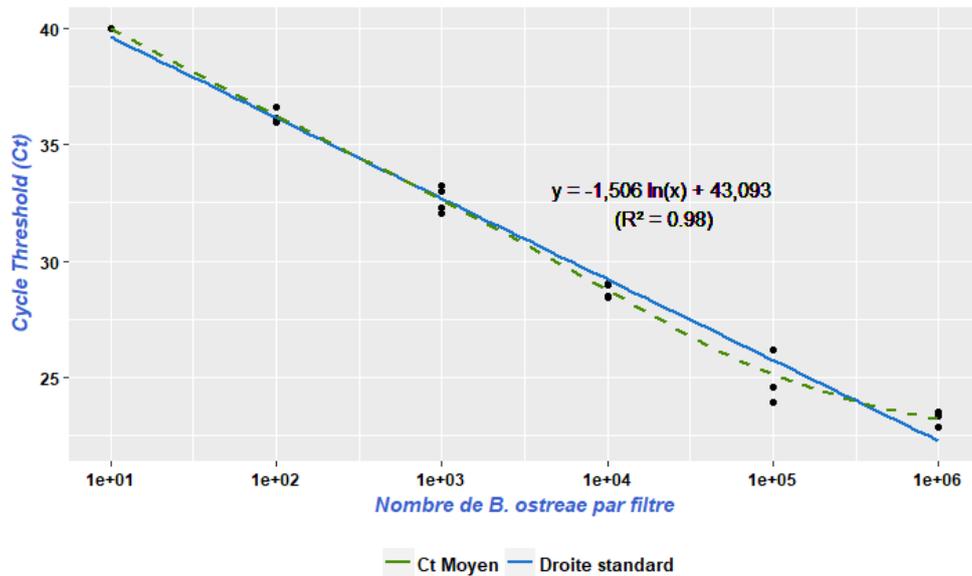


Figure 13 : Droite standard établie pour l'expérience sur la survie de *B. ostreae* en dehors de son hôte



Figure 14 : Evolution de survie de *B. ostreae* en dehors de son hôte aux différents temps de prélèvement (Lot 1 : n = 10 ; Lot 2 : n = 8 ; Lot 3 : n = 9). La survie du parasite est indiquée en rouge pour chaque prélèvement. Pour des raisons de lisibilité, les prélèvements J7, J15 et J30 ne sont pas présentés sur les graphes (plus aucune détection du parasite après le prélèvement J2)

Sur le lot 3, les écart-types sont importants, notamment pour les deux premiers prélèvements. Cependant, on constate sur les trois lots que l'ADN du parasite est détecté jusqu'à J2 et n'est plus détecté à J7. De plus, on remarque qu'après deux jours, entre 79,84% (lot 3) et 96,06% (lot 1) des parasites ne sont plus détectés, suggérant que la survie du parasite en eau de mer est d'environ 2 jours.

Pour les lots 1 et 3, la phase de mortalité semble essentiellement survenir entre J1 et J2, alors que pour le lot 2, 58,68% des parasites ne sont plus détectés dès J1.

III. Suivi de l'excrétion de *B. ostreae* en dehors de son hôte

Pour étudier l'excrétion de *Bonamia ostreae* en dehors de son hôte, nous avons quantifié l'ADN parasitaire par PCR en temps réel, en duplicat et à partir d'1/4 de filtre pour chaque prélèvement réalisé au cours de l'expérience. Ici encore, le même contrôle positif a été intégré dans chaque analyse en PCR, afin de servir de calibrateur inter-essai. Une courbe standard (figure 15) a également été incluse dans chaque essai de PCR afin de calculer le nombre de parasites retenus sur chaque membrane de filtration. En tenant compte du volume filtré et du nombre de jours d'excrétion, il a finalement été possible de déterminer le nombre de parasites excrétés par huître et par jour.

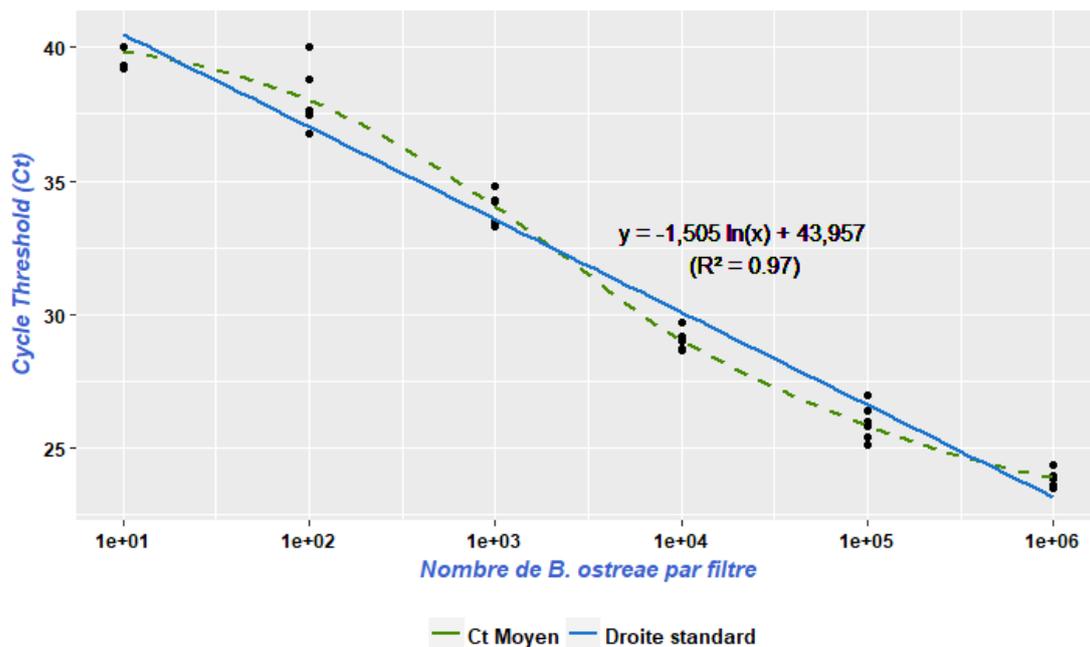


Figure 15 : Droite standard établie pour l'expérience sur l'excrétion de *B. ostreae* en dehors de son hôte

Pour cette expérience, l'excrétion de *B. ostreae* a été suivie individuellement à partir de 37 huîtres plates détectées infectées pendant quatre semaines, à raison de 2 prélèvements par semaine. Parmi les 37 animaux, 19 d'entre eux présentaient un niveau d'infection faible, 12 présentaient un niveau d'infection modéré et 6 présentaient un niveau d'infection fort. Le tableau 2 présente récapitulatif du déroulement de l'expérience.

Tableau 2 : Récapitulatif de l'expérience de suivi de l'excrétion de *B. ostreae* en dehors de son hôte bivalve.
Vert = individu vivant ; Rouge = individu mort ; Gris : prélèvement non réalisé

Individu	Diagnostic Bo	Semaine 1		Semaine 2		Semaine 3		Semaine 4	
		Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3	Prélèvement 4	Prélèvement 5	Prélèvement 6	Prélèvement 7	Prélèvement 8
1	+								
2	+								
8	+								
9	+								
11	+								
12	+								
17	+								
21	+								
23	+								
24	+								
31	+								
32	+								
33	+								
35	+								
38	+								
40	+								
43	+								
44	+								
46	+								
4	++								
16	++								
18	++								
25	++								
27	++								
36	++								
41	++								
42	++								
45	++								
47	++								
48	++								
49	++								
5	+++								
14	+++								
29	+++								
30	+++								
37	+++								
39	+++								

Compte tenu du déroulement de l'expérience, nous avons dans un premier temps choisi d'étudier l'excrétion de *B. ostreae* au niveau individuel (figure 16A) et temporel (figure 16B), en sélectionnant des individus disposant de séries temporelles complètes : 1 ; 11 ; 23 ; 24 ; 32 et 44 (tous étant faiblement infectés).

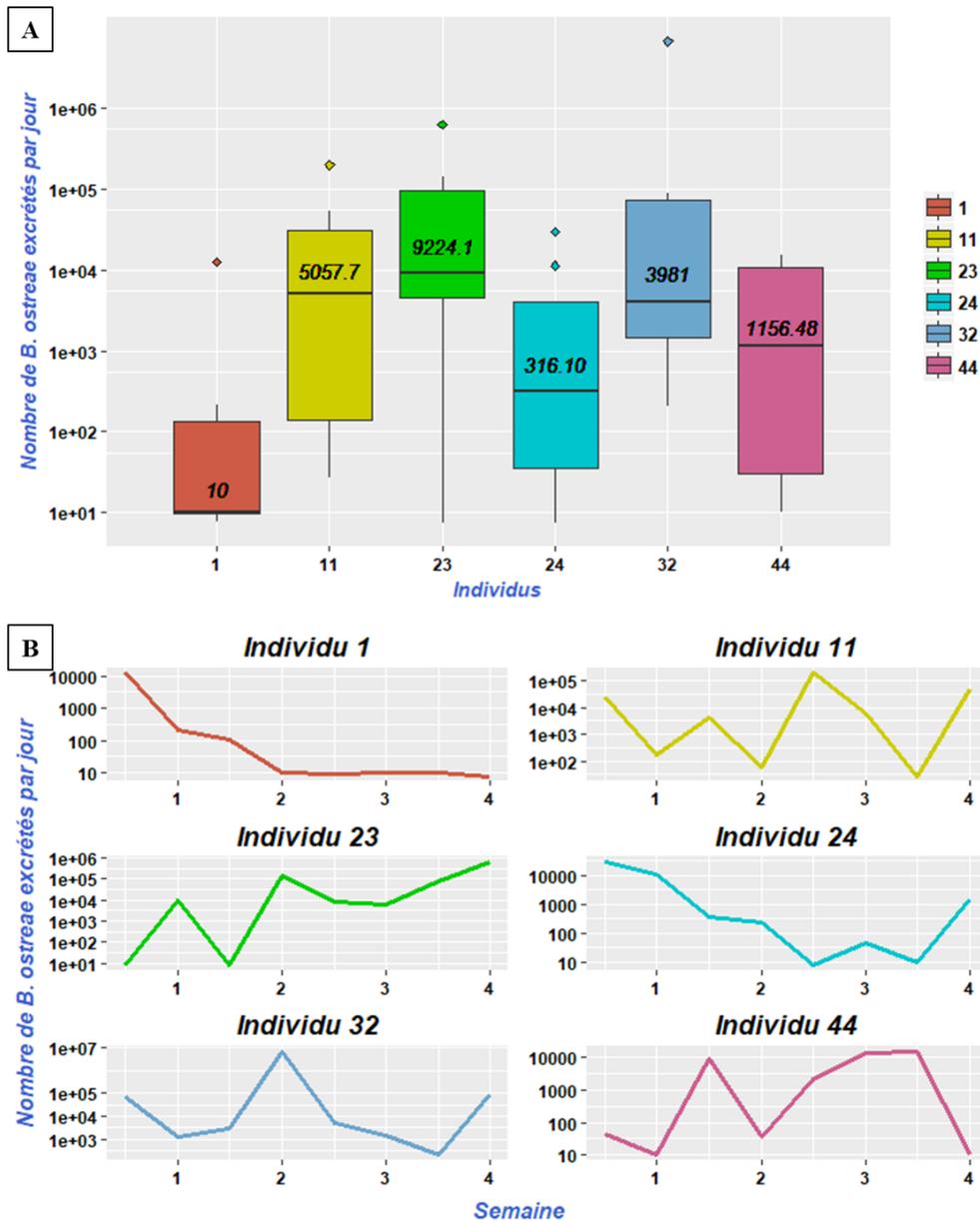


Figure 16: Variation du taux d'excrétion individuel (A) et temporel (B) de *B. ostreae* par des huîtres plates *O. edulis* faiblement infectées

Les résultats obtenus révèlent une variation importante du taux d'excrétion de *B. ostreae* entre les individus analysés (figure 18A), mais aussi au cours du temps pour un même individu (figure 18B). En effet, l'individu 32 présente par exemple un taux d'excrétion médian de 3981 *B. ostreae*/jour, variant de 205 à $6,6 \cdot 10^6$ *B. ostreae*/jour, tandis que l'individu 24 présente un taux d'excrétion médian de 316,10 *B. ostreae*/jour, variant de moins de 7,5 à $2,9 \cdot 10^4$ *B. ostreae*/jour.

Nous avons ensuite étudié le taux d'excrétion du parasite en dehors de son hôte selon le niveau d'infection de l'huître (faible, modéré ou fort) (figure 17), son statut (vivante ou morte) (figure 18) et son poids (utilisé ici comme un proxy de l'indice de condition) (figure 19), en considérant cette fois-ci l'ensemble des échantillons analysés.

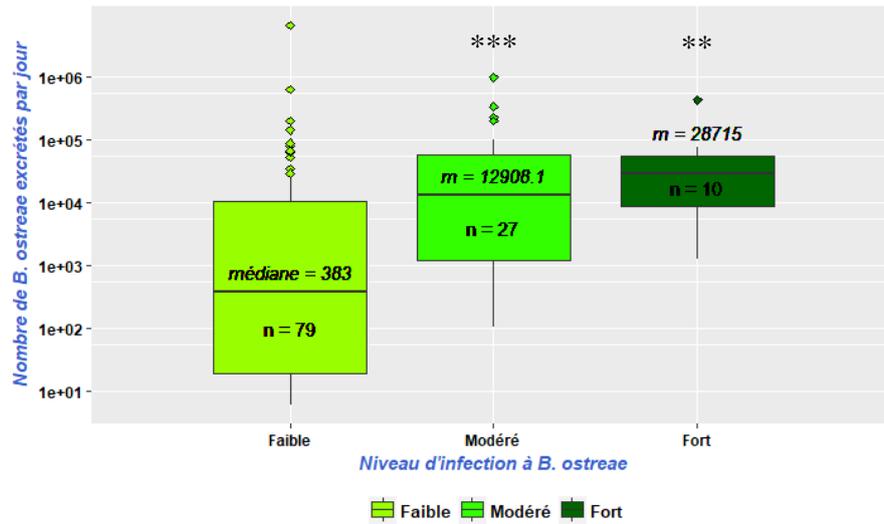


Figure 17 : Variation du taux d'excrétion de *B. ostreae* en fonction du niveau d'infection de l'hôte

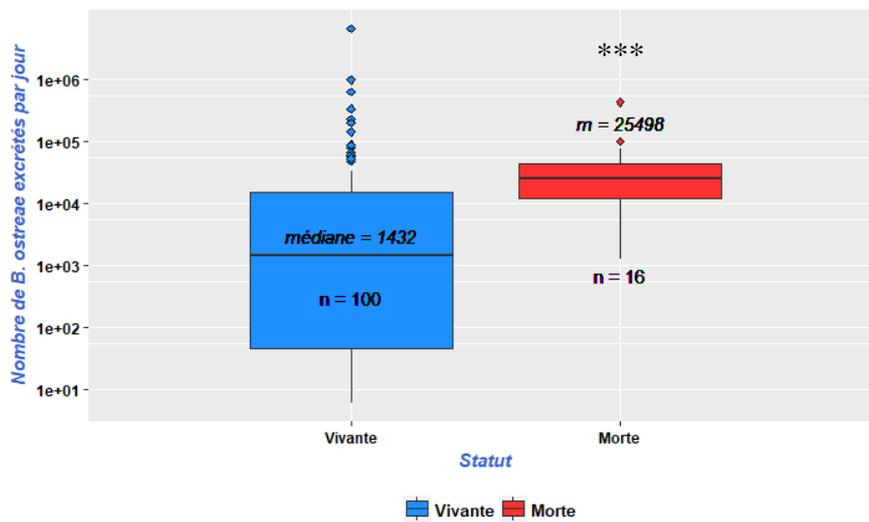


Figure 18 : Variation du taux d'excrétion de *B. ostreae* en fonction de l'état de l'hôte

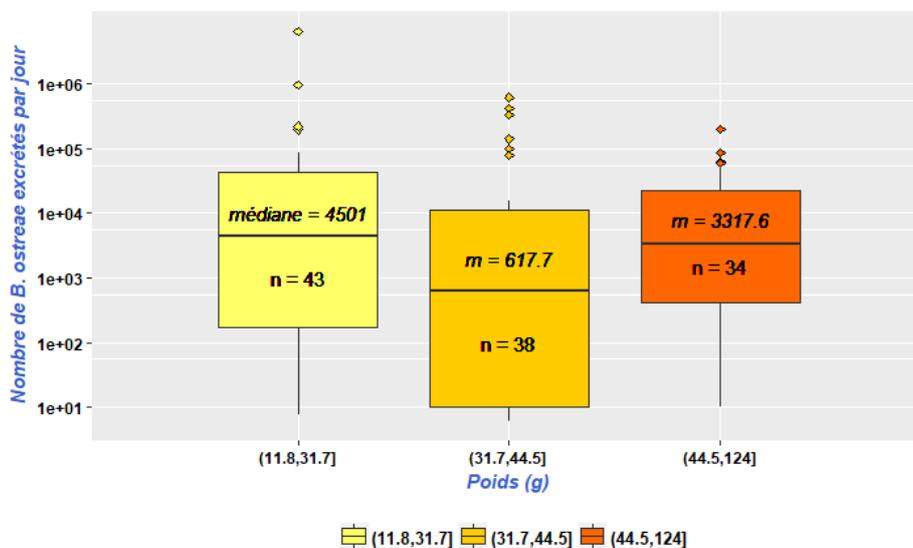


Figure 19 : Variation du taux d'excrétion de *B. ostreae* en fonction du poids de l'hôte

Les différents groupes d'huîtres présentant à la fois des valeurs extrêmes et des effectifs différents, nous avons utilisé le test statistique de *Wilcoxon-Mann-Whitney* pour tester l'influence de l'état de l'hôte (deux groupes) et *Kruskal-Wallis* pour tester l'influence du niveau d'infection et du poids (trois groupes) sur le taux d'excrétion de *B. ostreae* en dehors de son hôte.

Les résultats présentés sur les figures 19, 20 et 21 mettent en évidence une différence significative du taux d'excrétion de *B. ostreae* en fonction du niveau d'infection ($p\text{-value} = 4,371.10^{-5}$, *Kruskal-Wallis*) et du statut de l'hôte ($p\text{-value} = 6,439.10^{-4}$, *Wilcoxon-Mann-Whitney*). Plus précisément, le taux d'excrétion des huîtres faiblement infectées est significativement différent de celui des huîtres modérément ($p\text{-value} = 2,3.10^{-4}$, *Wilcoxon-Mann-Whitney*) et fortement ($p\text{-value} = 1,7.10^{-3}$, *Wilcoxon-Mann-Whitney*) infectées. Il n'y a pas de différence significative du taux d'excrétion entre les individus modérément et fortement infectés ($p\text{-value} = 0,3528$, *Wilcoxon-Mann-Whitney*). Enfin, le taux d'excrétion de *B. ostreae* ne semble pas dépendre du poids de son hôte ($p\text{-value} = 0.1007$, *Kruskal-Wallis*).

Ainsi, plus l'huître est infectée, plus son taux d'excrétion du parasite est élevé. De même, la quantité de parasite excrété est plus importante chez les individus morts. En revanche, il est intéressant de noter que ces conclusions à l'échelle du groupe d'huîtres ne se vérifient pas systématiquement à l'échelle individuelle. En effet, si les taux d'excrétion médian sont significativement différents entre les niveaux d'infection faible - modéré, faible - fort et les statut vivant - mort, on remarque que certaines huîtres vivantes faiblement infectées peuvent excréter ponctuellement davantage de parasites que des huîtres vivantes fortement infectées, ou mortes.

Partie 4. Discussions et conclusion

L'approche utilisée pour détecter *Bonamia ostreae* dans l'eau de mer présente un seuil limite de détection compris entre 30 et 10 *B. ostreae* par filtre. De plus, le bon ajustement de la droite standard de régression aux données expérimentales ($R^2 = 0,9916$) nous offre la possibilité de quantifier *B. ostreae* dans l'eau de mer.

Notre seuil de détection s'avère plus élevé que celui établi par Audemard et al. (2004) sur une approche de PCR en temps réel SYBR Green I® permettant la détection de *Perkinsus marinus* dans l'eau (seuil limite : $3,3 \cdot 10^{-2}$ parasites). En revanche, il est plus faible que celui établi par Lee et al. (2011) dans leur approche de PCR en temps réel TaqMan permettant la détection de *Pseudomonas aeruginosa* (une bactérie Gram – potentiellement pathogène de l'homme) dans l'eau (seuil limite : 330 CFU). A l'instar de Robert et al. (2009) et Skovhus et al. (2004), il pourrait être intéressant de préciser notre seuil limite de détection en quantifiant, par une approche similaire faisant intervenir des plasmides, le nombre minimal de copies de gène cible pouvant être détectés. Par ailleurs, la non détection ($Ct = 40$) n'est pas synonyme de l'absence de parasite dans l'échantillon. En effet, comme nous avons pu le voir via le seuil de détection, lorsque que le Ct est égal à 40, on peut au mieux dire qu'il y avait moins de 30 parasites sur la membrane de filtration, et donc moins de $30/V$ *B. ostreae*/mL d'échantillon au moment du prélèvement (V étant le volume d'échantillon filtré).

Pour ce qui est de l'étude de la survie de *B. ostreae* en dehors de son hôte, les résultats obtenus ont montré qu'une fois le parasite excrété, son ADN restait détectable dans l'eau de mer pendant 2 jours. On peut d'ores et déjà noter que ces conclusions sont similaires à celles établies par Arzul et al. (2009) lors de leur étude par **cytométrie en flux** de la survie de parasites purifiés en eau de mer filtrée à $0,22 \mu\text{m}$. On peut également dire que le temps de survie de *B. ostreae* en dehors de son hôte est assez court. A titre d'exemple, *Perkinsus marinus* parvient à survivre au moins 2 semaines en dehors de son hôte (Bidegain et al., 2017) tandis que des expérimentations en cours sur OsHV-1, un virus herpès associé à d'importantes mortalités d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*, ont mis en évidence une survie du virus dans l'eau de mer d'environ 24h.

En outre, il est important de noter que l'approche utilisée dans nos expériences ne permet pas d'étudier la survie à proprement parler. En effet, l'ADN est un bon indicateur de la présence du parasite mais ne nous renseigne pas concernant son statut, vivant ou inactivé. Une approche comparable ciblant l'ARN parasitaire nous aurait par exemple permis de tester la présence de parasites vivants. Les résultats obtenus suggèrent cependant que l'ADN du parasite se dégrade rapidement dans l'eau de mer. Ainsi, cette approche reste intéressante, notamment lorsqu'on souhaite contrôler la présence ou l'absence du parasite dans une zone donnée. En effet, si l'ADN parasitaire est détecté dans un prélèvement d'eau de mer, cela signifie que le parasite a été excrété au maximum 2 jours auparavant, et donc qu'un gisement d'huîtres plates infecté se situe à proximité du lieu de prélèvement.

Concernant l'étude du taux d'excrétion de *B. ostreae* en dehors de son hôte, plusieurs conclusions ont pu être établies. Tout d'abord, nous avons pu voir qu'il existait une variation temporelle et individuelle importantes du taux d'excrétion du parasite.

Si l'on se fie aux résultats de l'étude de la corrélation entre « taux d'excrétion » et « niveau d'infection », « état de l'hôte » et « poids de l'hôte », on s'aperçoit que le taux d'excrétion médian est significativement différent selon le niveau d'infection et selon le statut de l'individu. Cependant, ces conclusions à l'échelle du groupe d'huîtres ne se vérifient pas systématiquement à l'échelle individuelle et nous avons pu voir que certaines huîtres vivantes faiblement infectées pouvaient excréter ponctuellement d'avantage de parasites que des huîtres vivantes fortement infectées ou mortes.

Ces résultats nuancent les conclusions proposées dans la littérature. En effet, pour *B. ostreae*, il est souvent admis qu'un plus grand nombre de parasite est excrété/relargué lors de la décomposition des tissus d'animaux morts (Arzul et al., 2009), de même que pour *P. marinus* (Bushek et al., 2002). Cependant, nous avons bâti nos conclusions sur ce point en recherchant l'ADN parasitaire dans l'eau de **stabulation** des animaux morts, alors débarrassée des tissus en décomposition. Il serait donc intéressant de compléter notre étude par la quantification de parasites au cours de la décomposition des tissus d'huîtres infectées.

Par ailleurs, Hervio et al. (1995) ont identifié, par injection, une DL50 (dose nécessaire pour obtenir 50% de mortalité) de 80 000 parasites pour l'infection d'*O. edulis* à *B. ostreae*. On peut penser qu'avec un taux d'excrétion parfois bien supérieur à cette DL50 (plus de 1.10^6 parasite par jour), certains individus vivants peuvent apporter une contribution non négligeable à la transmission de la maladie au sein du gisement.

Enfin, nous avons également pu noter un impact de la biopsie sur la survie des animaux, en particulier pour les individus modérément et fortement infectés. La mort rapide (entre trois jours et une semaine après le début de l'expérience) de ces animaux a malheureusement réduit le nombre de données pour ces catégories d'individus et peut avoir biaisé certaines conclusions sur la corrélation entre « taux d'excrétion » et « niveau d'infection » de l'hôte.

Perspectives

Nous avons montré au travers de notre expérience sur la survie de *B. ostreae* en dehors de son hôte que l'ADN du parasite est détecté jusqu'à deux jours en eau de mer et n'est plus détecté après sept jours. Afin de préciser le temps de survie du parasite excrété, il apparaît nécessaire de réitérer l'expérience proposée sur 7 jours, en augmentant la fréquence de prélèvements, par exemple deux fois par jour. Comme précédemment évoqué (voir Partie 4.), la détection d'ADN ne permet pas de conclure quant au statut vivant ou inactivé du parasite. Il serait donc pertinent de coupler la détection d'ADN à la détection d'ARN parasitaire. Enfin, les résultats obtenus peuvent varier en fonction des facteurs biotiques comme la présence de phytoplancton et des facteurs abiotiques comme la température, la salinité ou le pH. Il serait donc intéressant de tester l'influence de ces facteurs sur la survie du parasite excrété.

Dans le cadre de l'étude de l'excrétion de *B. ostreae* en dehors de son hôte, des mortalités ont particulièrement touché les huîtres modérément et fortement infectées après la biopsie. Ces mortalités ont réduit les effectifs de notre étude et peuvent avoir biaisé nos conclusions. Nous souhaiterions donc reconduire l'expérience en faisant en sorte d'obtenir plus de données pour les individus modérément et fortement infectés. Par ailleurs, *B. ostreae* ayant un temps de survie de deux jours en dehors de son hôte, il serait également judicieux d'effectuer les prélèvements tous les deux jours au maximum, et non tous les trois à quatre jours.

Enfin, les expériences menées sur la survie et l'excrétion de *B. ostreae* en dehors de son hôte ont apporté des éléments de compréhension de la transmission de la maladie, et plus largement, du cycle parasitaire de *B. ostreae*. Par ailleurs, les résultats obtenus nous permettent d'améliorer notre modèle conceptuel (figure 22) en supprimant les compartiments associés aux niveaux d'infection de l'hôte. En effet, même si le niveau d'infection semble avoir un effet significatif sur le taux d'excrétion moyen de parasites, nous avons vu que cette différence n'était pas systématiquement observée au niveau individuel. Nous proposons donc de regrouper les compartiments I_1 , I_2 , et I_3 (figure 8) en un seul compartiment « I ». En revanche, nous conservons le compartiment « D » associé aux animaux morts, ces derniers contribuant manifestement différemment à la transmission de la maladie.

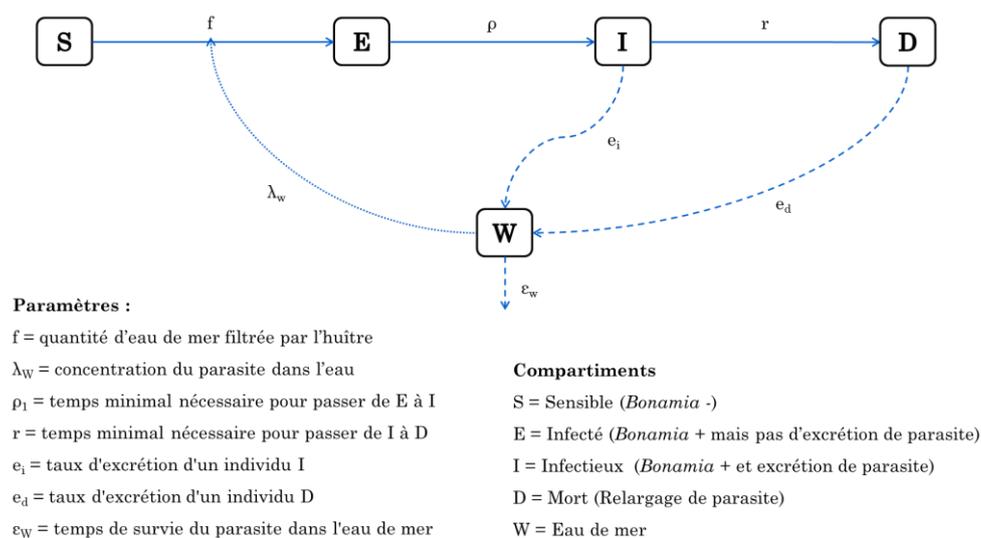


Figure 20 : Proposition d'un nouveau modèle conceptuel de transmission pour *B. ostreae*

La meilleure compréhension de la transmission de la maladie permet de proposer un modèle plus précis. À terme, cet outil permettra la simulation de scénarii de gestion des populations d'huîtres plates pour un meilleur contrôle de la maladie, par exemple, tester l'impact de différentes densités de production sur la transmission de la maladie.

Références bibliographiques

- ADL, Sina M., SIMPSON, Alastair G. B., LANE, Christopher E., LUKEŠ, Julius, BASS, David, BOWSER, Samuel S., BROWN, Matthew W., BURKI, Fabien, DUNTHORN, Micah, HAMPL, Vladimir, HEISS, Aaron, HOPPENRATH, Mona, LARA, Enrique, LE GALL, Line, LYNN, Denis H., MCMANUS, Hilary, MITCHELL, Edward A. D., MOZLEY-STANRIDGE, Sharon E., PARFREY, Laura W., PAWLOWSKI, Jan, RUECKERT, Sonja, SHADWICK, Laura, SCHOCH, Conrad L., SMIRNOV, Alexey et SPIEGEL, Frederick W., 2012. The Revised Classification of Eukaryotes. In : *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1 septembre 2012. Vol. 59, n° 5, p. 429-514. DOI 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x.
- ARZUL, I, GAGNAIRE, B, BOND, C, CHOLLET, B, MORGA, B, FERRAND, S, ROBERT, M et RENAULT, T, 2009. Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 27 mai 2009. Vol. 85, p. 67-75. DOI 10.3354/dao02047.
- ARZUL, Isabelle et CARNEGIE, Ryan B., 2015. New perspective on the haplosporidian parasites of molluscs. In : *Journal of Invertebrate Pathology*. octobre 2015. Vol. 131, p. 32-42. DOI 10.1016/j.jip.2015.07.014.
- AUDEMARD, C., REECE, K. S. et BURRESON, E. M., 2004. Real-Time PCR for Detection and Quantification of the Protistan Parasite *Perkinsus marinus* in Environmental Waters. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 novembre 2004. Vol. 70, n° 11, p. 6611-6618. DOI 10.1128/AEM.70.11.6611-6618.2004.
- BESNARD-COCHENNEC, Nathalie, 2001. *Bonamia ostreae*, parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis* : sa position taxonomique parmi les parasites du groupe « microcell », analyses des interactions hôte/parasite chez plusieurs populations d'huîtres plates [en ligne]. S.l. : Université de La Rochelle. [Consulté le 22 juin 2017]. Disponible à l'adresse : <http://archimer.ifremer.fr/doc/00211/32223/30671.pdf>.
- BIDEGAIN, G., POWELL, E. N., KLINCK, J. M., HOFMANN, E. E., BEN-HORIN, T., BUSHEK, D., FORD, S. E., MUNROE, D. M. et GUO, X., 2017. Modeling the transmission of *Perkinsus marinus* in the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. In : *Fisheries Research*. février 2017. Vol. 186, Part 1, p. 82-93. DOI 10.1016/j.fishres.2016.08.006.
- BIDEGAIN, Gorka, POWELL, Eric N., KLINCK, John M., BEN-HORIN, Tal et HOFMANN, Eileen E., 2016. Marine infectious disease dynamics and outbreak thresholds: contact transmission, pandemic infection, and the potential role of filter feeders. In : PARK, A. (éd.), *Ecosphere*. avril 2016. Vol. 7, n° 4, p. e01286. DOI 10.1002/ecs2.1286.
- BLANCHET, Estelle, 2005. *La bonamiose de l'huître plate Ostrea edulis : bilan des connaissances actuelles, analyse des données collectées en France de 1989 à 2004, mesures de lutte et perspectives*. S.l. : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- BUESTEL, Dominique, ROPERT, Michel, PROU, Jean et GOULLETQUER, Philippe, 2009. History, status, and future of oyster culture in France. In : *Journal of Shellfish Research*. 2009. Vol. 28, n° 4, p. 813-820.
- BUSHEK, David, FORD, Susan E. et CHINTALA, Marnita M., 2002. Comparison of in vitro-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. III. Fecal elimination and its role in transmission. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 4 octobre 2002. Vol. 51, n° 3, p. 217-225. DOI 10.3354/dao051217.
- CARNEGIE, Ryan B. et COCHENNEC-LAUREAU, Nathalie, 2004. Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. In : *Aquatic Living Resources*. octobre 2004. Vol. 17, n° 4, p. 519-528. DOI 10.1051/alr:2004055.
- CODEÇO, Cláudia Torres, 2001. Endemic and epidemic dynamics of cholera: the role of the aquatic reservoir. In : *BMC Infectious Diseases*. 2001. Vol. 1, p. 1. DOI 10.1186/1471-2334-1-1.
- CULLOTY, Sarah C. et MULCAHY, Maire F., 1996. Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. In : *Aquaculture*. 10 septembre 1996. Vol. 144, n° 1, p. 53-63. DOI 10.1016/S0044-8486(96)01290-2.
- DA SILVA, P.Mirella et VILLALBA, Antonio, 2004. Comparison of light microscopic techniques for the diagnosis of the infection of the European flat oyster *Ostrea edulis* by the protozoan *Bonamia ostreae*. In : *Journal of Invertebrate Pathology*. février 2004. Vol. 85, n° 2, p. 97-104. DOI 10.1016/j.jip.2003.12.010.
- DUCHÊNE, Julie, BERNARD, Ismael et POUVREAU, Stephane, 2015. Vers un retour de l'huître indigène en rade de Brest. In : *Espèces*. 2015. n° 16, p. 51-57.

- ELGHARSALLI, Refka, ALOUI-BEJAOUI, Nejla, SALAH, Hedi, CHOLLET, Bruno, JOLY, Jean-Pierre, ROBERT, Maeva, COURALEAU, Yann et ARZUL, Isabelle, 2013. Characterization of the protozoan parasite *Marteilia refringens* infecting the dwarf oyster *Ostrea stentina* in Tunisia. In : *Journal of Invertebrate Pathology*. février 2013. Vol. 112, n° 2, p. 175-183. DOI 10.1016/j.jip.2012.11.004.
- ENGELSMA, My, KERKHOFF, S, ROOZENBURG, I, HAENEN, Olm, VAN GOOL, A, SISTERMANS, W, WIJNHOFEN, S et HUMMEL, H, 2010. Epidemiology of *Bonamia ostreae* infecting European flat oysters *Ostrea edulis* from Lake Grevelingen, The Netherlands. In : *Marine Ecology Progress Series*. 23 juin 2010. Vol. 409, p. 131-142. DOI 10.3354/meps08594.
- GRIZEL, Henri, COMPS, Michel, BONAMI, Jean-Robert, COUSSERANS, F., DUTHOIT, Jean-Louis et LE PENNEC, Marie-Annick, 1974. Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. In : *Science et Pêche*. 1974. n° 240, p. 7-30.
- HERVIO, D., BACHERE, E., BOULO, V., COCHENNEC, N., VUILLEMIN, V., LE COGUIC, Y., CAILLETAUX, G., MAZURIE, J. et MIALHE, E., 1995. Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae*: application in the selection of parasite-resistant oysters. In : *Aquaculture*. 1995. Vol. 132, n° 3-4, p. 183-194.
- HUGEL, Cécile, 2016. *Contribution to the development of a real-time RT-PCR tool for the detection of the protozoan parasites Marteilia refringens and Bonamia ostreae outside their hosts*. Internship report. S.I.
- HUSSENOT, Mathieu, POUVREAU, Stephane, DUCHÊNE, Julie, FREULON, Henry, ARZUL, Isabelle et LAPEGUE, Sylvie, 2014. Synthèse PERLE. Programme d'Expérimentation et de recherche sur L'huître plate *Ostrea Edulis*. In : [en ligne]. 2014. [Consulté le 5 juin 2017]. Disponible à l'adresse : <http://archimer.ifremer.fr/doc/00249/36060/34610.pdf>.
- LANE, Hs, WEBB, Sc et DUNCAN, J, 2016. *Bonamia ostreae* in the New Zealand oyster *Ostrea chilensis*: a new host and geographic record for this haplosporidian parasite. In : *Diseases of Aquatic Organisms*. 11 février 2016. Vol. 118, n° 1, p. 55-63. DOI 10.3354/dao02960.
- LAPEGUE, Sylvie, BEAUMONT, A., BOUDRY, Pierre et GOULLETQUER, Philippe, 2006. European flat oyster-*Ostrea edulis*. In : *GENINPACT-Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native population. A European network, WPI workshop Genetics of domestication, breeding and enhancement of performance of fish and shellfish* [en ligne]. S.I. : s.n. 2006. [Consulté le 20 juin 2017]. Disponible à l'adresse : <http://archimer.ifremer.fr/doc/2006/acte-3321.pdf>.
- LEE, C.S., WETZEL, K., BUCKLEY, T., WOZNIAK, D. et LEE, J., 2011. Rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated water and aerosols targeting *gyrB* gene using real-time PCR: *Ps. aeruginosa* detection from water and aerosols. In : *Journal of Applied Microbiology*. octobre 2011. Vol. 111, n° 4, p. 893-903. DOI 10.1111/j.1365-2672.2011.05107.x.
- LUPO, Coralie, TRAVERS, Marie-Agnès, TOURBIEZ, Delphine et EZANNO, Pauline, non publié. *Modeling the transmission dynamics of Vibrio aesturianus infection in Pacific oysters, Crassostrea gigas, using experimental infection data*.
- LYNCH, S.A., ARMITAGE, D.V., COUGHLAN, J., MULCAHY, M.F. et CULLOTY, S.C., 2007. Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. In : *Experimental Parasitology*. avril 2007. Vol. 115, n° 4, p. 359-368. DOI 10.1016/j.exppara.2006.09.021.
- MADSEN, Lone et THOMASSEN, Helena Elisabeth Hou, 2015. First detection of *Bonamia ostreae* in native flat oysters from the limfjord in Denmark. In : *17th International Conference on Diseases of Fish And Shellfish*. 2015. p. 92-92.
- MIALHE, Eric, BACHÈRE, Evelyne, CHAGOT, Dominique et GRIZEL, Henri, 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. In : *Aquaculture*. 15 juillet 1988. Vol. 71, n° 4, p. 293-299. DOI 10.1016/0044-8486(88)90198-6.
- MONTES, J., ANADÓN, R. et AZEVEDO, C., 1994. A Possible Life Cycle for *Bonamia ostreae* on the Basis of Electron Microscopy Studies. In : *Journal of Invertebrate Pathology*. 1 janvier 1994. Vol. 63, n° 1, p. 1-6. DOI 10.1006/jipa.1994.1001.

- NACIRI-GRAVEN, Y., MARTIN, A.-G., BAUD, J.-P., RENAULT, T. et GERARD, A., 1998. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. In : *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 1998. Vol. 224, n° 1, p. 91–107.
- NIELSEN, Mette, HANSEN, Benni Winding et VISMANN, Bent, 2017. Feeding traits of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, and the invasive Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. In : *Marine Biology* [en ligne]. janvier 2017. Vol. 164, n° 1. [Consulté le 20 juillet 2017]. DOI 10.1007/s00227-016-3041-5. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/s00227-016-3041-5>.
- OIE, 2009. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals : Chapter 2.4.3. Infection with Bonamia ostreae*. 6th. Paris : OIE. ISBN 978-92-9044-758-0.
- PICHOT, Yves, COMPS, Michel, TIGE, Gilbert, GRIZEL, Henri et RABOUIN, Marie-Agnes, 1979. Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. In : *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*. 1979. Vol. 43, n° 1, p. 131–140.
- POITRAS, Elyse et HOUDE, Alain, 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. In : *Reviews in biology and biotechnology*. 2002. Vol. 2, n° 2, p. 2–11.
- ROBERT, Maeva, GARCIA, Céline, CHOLLET, Bruno, LOPEZ-FLORES, Inmaculada, FERRAND, Sylvie, FRANÇOIS, Cyrille, JOLY, Jean-Pierre et ARZUL, Isabelle, 2009. Molecular detection and quantification of the protozoan *Bonamia ostreae* in the flat oyster, *Ostrea edulis*. In : *Molecular and Cellular Probes*. décembre 2009. Vol. 23, n° 6, p. 264-271. DOI 10.1016/j.mcp.2009.06.002.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. et ERLICH, H. A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In : *Science*. 29 janvier 1988. Vol. 239, n° 4839, p. 487-491. DOI 10.1126/science.2448875.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K., HOORN, G. T. et ARNHEIM, N., 1985. Polymerase chain reaction. In : *Science*. 1985. Vol. 230, p. 1350–1354.
- SKOVHUS, T. L., RAMSING, N. B., HOLMSTROM, C., KJELLEBERG, S. et DAHLLOF, I., 2004. Real-Time Quantitative PCR for Assessment of Abundance of *Pseudoalteromonas* Species in Marine Samples. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 avril 2004. Vol. 70, n° 4, p. 2373-2382. DOI 10.1128/AEM.70.4.2373-2382.2004.
- SMYTH, D. et ROBERTS, D., 2010. The European oyster (*Ostrea edulis*) and its epibiotic succession. In : *Hydrobiologia*. 1 novembre 2010. Vol. 655, n° 1, p. 25-36. DOI 10.1007/s10750-010-0401-x.
- SUQUET, Marc, ARAYA, Ricardo Gonzales, LEBRUN, Luc, QUEAU, Isabelle, MINGANT, Christian et ROBERT, Ren?, 2010. Anaesthesia and gonad sampling in the European flat oyster (*Ostrea edulis*). In : *Aquaculture*. octobre 2010. Vol. 308, n° 3-4, p. 196-198. DOI 10.1016/j.aquaculture.2010.09.001.
- VAN BANNING, P., 1987. Further results of the *Bonamia ostreae* challenge tests in Dutch oyster culture. In : *Aquaculture*. 1987. Vol. 67, n° 1-2, p. 191–194.

Sitographie

Toma B., Encyclopedia Universalis, 2017. Epizooties. [En. Ligne.]. Disponible sur : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/epizooties/> (Consulté le 25/07/2017)

EURL for Molluscs Diseases, European Union Reference Laboratory, 24/06/2011. *Bonamia* sp.. [En. Ligne.]. Disponible sur : <http://www.eurl-mollusc.eu/Main-activities/Tutorials/Bonamia-sp> (Consulté le 25/07/2017)

Gouletquer, P., FAO, Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, 2004-2017. Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées. *Ostrea edulis*. [En Ligne]. Disponible sur http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea_edulis_fr/en (Consulté le 24/07/2017)

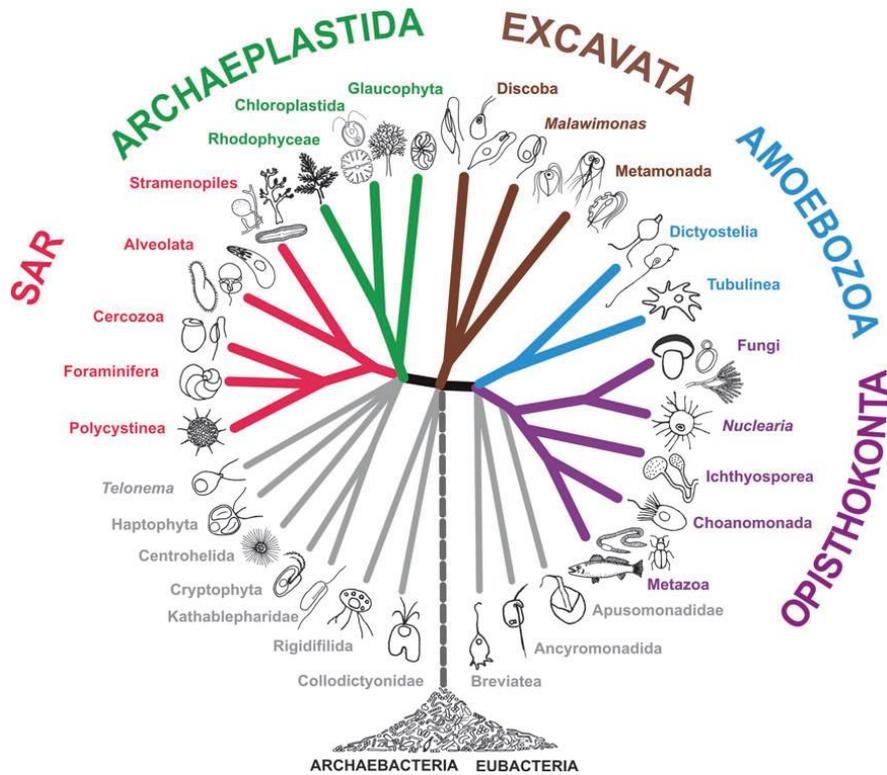
Noël P., MNHN, Muséum National d'Histoire Naturelle, 2003-2017. Inventaire National du Patrimoine Naturel. *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758. [En. Ligne.]. Disponible sur : https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/64422 (Consulté le 24/07/2017).

Vandepitte L., WoRMS, World Register of Marine Species, 31/03/2010. *Bonamia ostreae* Pichot, Comps, Tigé, Grizel & Rabouin, 1980 [En. Ligne.]. Disponible sur <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=246871> (Consulté le 25/07/2017)

Annexe I : Taxonomie d'*Ostrea edulis* et *Bonamia ostreae*

- **Domaine** : Biota
- **Règne** : Animalia
- **Sous-Règne** : Eumetazoa Bütschli, 1910
- **Infra-Règne** : Bilateria Haeckel, 1874
- **Infra-Règne** : Protostomia Grobben, 1908
- **Cladus** : Lophotrochozoa Halanych, Bacheller, Aguinaldo & Liva, 1995
- **Phylum** : Mollusca Linnaeus, 1758
- **Classe** : Bivalvia Linnaeus, 1758
- **Sous-Classe** : Pteriomorphia Beurlen, 1944
- **Ordre** : Ostreida Férussac, 1822
- **Super-Famille** : Ostreioidea Rafinesque, 1815
- **Famille** : Ostreidae Rafinesque, 1815
- **Sous-Famille** : Ostreinae Rafinesque, 1815
- **Genre** : *Ostrea* Linnaeus, 1758
- └ **Espèce** : *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758

*Taxonomie d'*Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) (MNHN, 2017)*

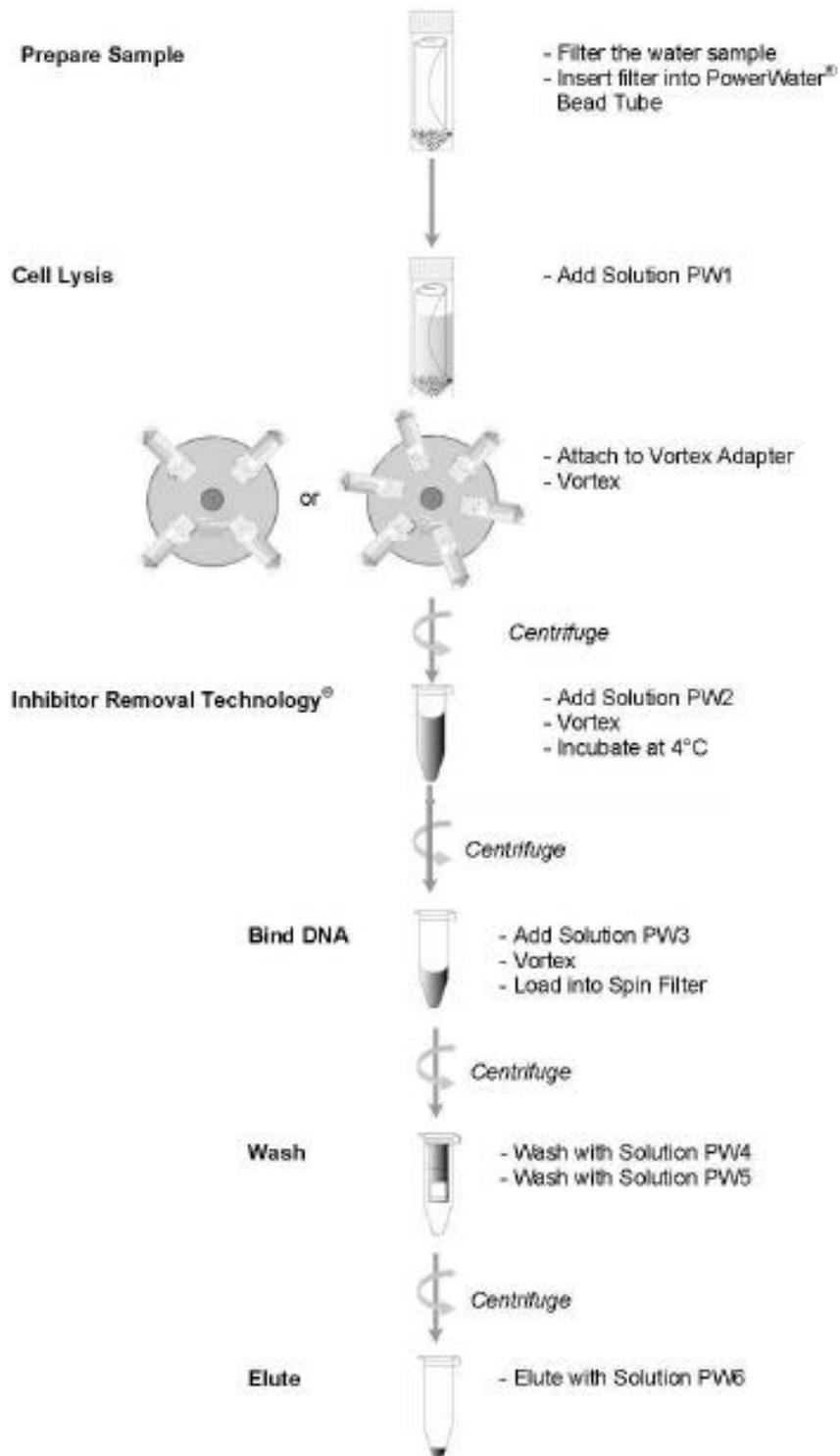


- Rhizaria
 - Cercozoa
 - Ascetosporea
 - Haplosporida
 - Bonamia, Haplosporidium, Microcytos, Minchinia, Urosporidium.

*Taxonomie de *Bonamia ostreae* (Adl et al., 2012)*

Annexe II : PowerWater DNA Isolation Kit - Protocole

PowerWater® DNA Isolation Kit



Annexe III : PCR Simplex *Bonamia sp.* - Composition du mélange réactionnel et programme d'amplification

Composition du mélange réactionnel	
<i>Réactif</i>	<i>Concentration finale</i>
MasterMix Ultrafast	1X
Amorce Bosp2_18S_F	0,3 µM
Amorce Bosp2_18S_R	0,5 µM
Bosp2_18S_IN HEX	0,3 µM
H ₂ O Milli-Q	Qsp 20 µL

20 µL du mix PCR sont répartis dans les tubes de PCR

5 µL d'ADN extrait (5 ng/µL ou pur) sont ajoutés dans chaque tube

Séquence des amorces

Bosp2_18S_F 5' CAGGATGCCCTTAGATGCTC 3'

Bosp2_18S_R 5' GTACAAAGGGCAGGGACGTA 3'

Bosp2_18S_IN 5' TTGACCCGGCTTGACAAGGC 3' (HEX-BHQ- 1)

Programme d'amplification

Les cycles d'amplification sont réalisés dans un thermocycleur en temps réel (Mx3000P, Stratagène®) selon le protocole suivant :

- Dénaturation initiale : 3 minutes à 95 °C

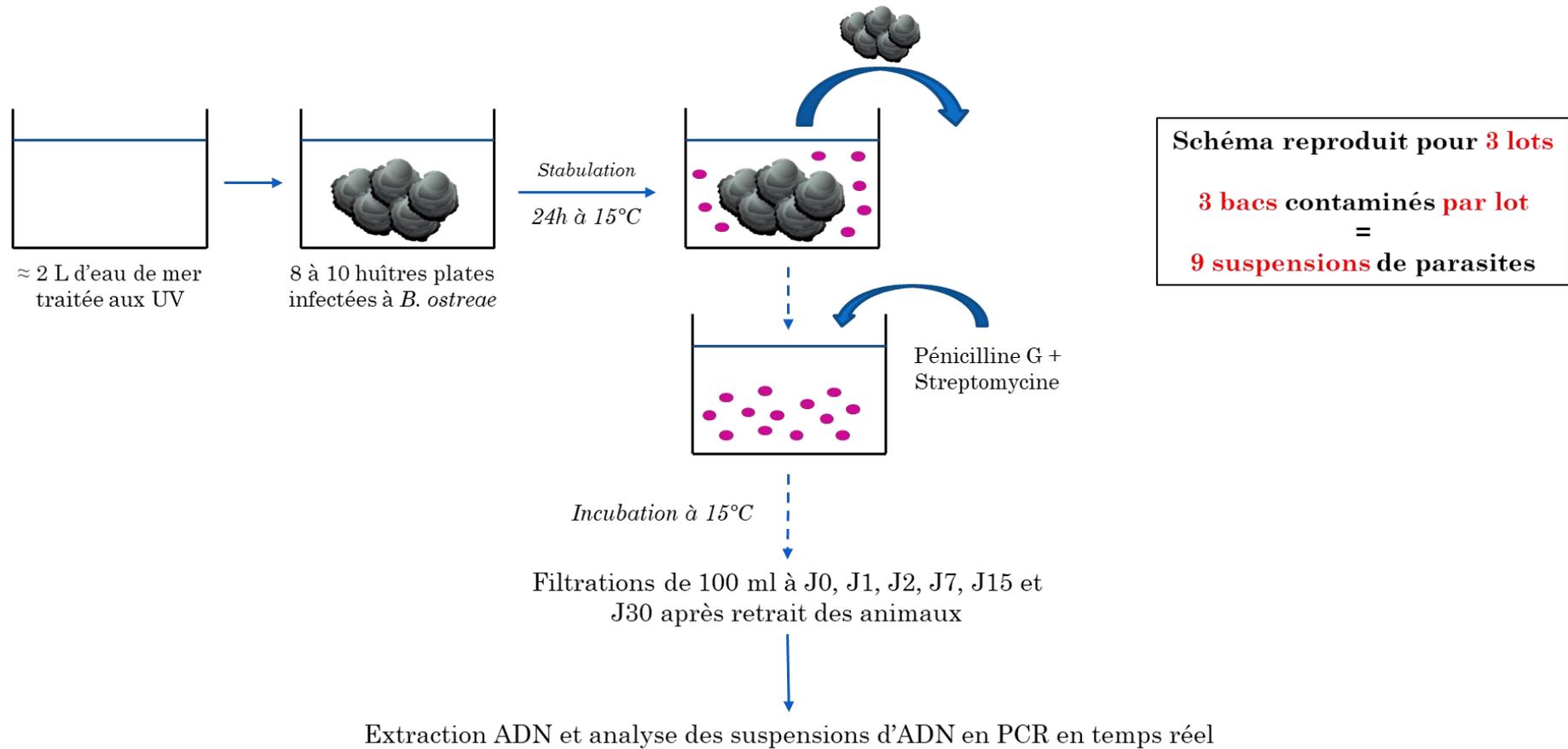
- Amplification : 40 cycles (15 secondes à 95 °C et 60 secondes à 60 °C)

La fluorescence est enregistrée à chaque fin de cycle avec le filtre HEX pour la détection de *Bonamia sp.*

*Annexe IV : Composition des lots d'huîtres plates utilisés pour l'expérience sur la survie de *B. ostreae* en dehors de son hôte*

	Provenance	Screening	Individu	Entrée le	Sortie le	Macroscopie				Diagnostic Bonamia
						Poids (g)	Longueur (cm)	Largeur (cm)	Epaisseur (cm)	
Lot 1	Brest	1	6	19/03/2017	22/03/2017					++
	Brest	1	8	19/03/2017	22/03/2017	33,69	6,24	4,83	1,54	+
	Brest	1	9	19/03/2017	22/03/2017	34,96	5,39	4,46	1,54	+
	Brest	1	11	19/03/2017	22/03/2017					+
	Brest	1	12	19/03/2017	22/03/2017	41,76	6,64	4,92	2,33	++
	Brest	1	19	19/03/2017	22/03/2017	38,08	5,88	4,75	2,28	+++
	Brest	1	22	19/03/2017	22/03/2017					+++
	Brest	1	26	19/03/2017	22/03/2017					+++
	Brest	1	86	19/03/2017	22/03/2017	18,32	5,26	4,63	0,85	+
	Brest	1	88	19/03/2017	22/03/2017	17,89	5,13	4,49	0,89	+
Lot 2	Trieux	2	2	26/03/2017	29/03/2017					+++
	Trieux	2	3	26/03/2017	29/03/2017	19,89	4,88	4,33	1,69	+
	Trieux	2	8	26/03/2017	29/03/2017	31,72	5,46	4,34	1,53	+
	Trieux	2	11	26/03/2017	29/03/2017					++
	Trieux	2	16	26/03/2017	29/03/2017	26,12	5,28	4,72	1,51	+++
	Brest	2	47	26/03/2017	29/03/2017					+++
	Brest	2	56	26/03/2017	29/03/2017	62,23	6,16	6,72	2,38	++
	Brest	2	54	26/03/2017	29/03/2017	57,14	7,1	6,36	1,6	+
Lot 3	Brest	3	1	02/04/2017	05/04/2017	54,9	6,64	5,84	1,77	++
	Brest	3	2	02/04/2017	05/04/2017					+++
	Brest	3	3	02/04/2017	05/04/2017					+++
	Trieux	3	16	02/04/2017	05/04/2017	16,61	4,73	4,25	1,22	+
	Trieux	3	29	02/04/2017	05/04/2017					++
	Quiberon	3	50	02/04/2017	05/04/2017	32,05	5,93	5,89	1,57	+
	Quiberon	3	59	02/04/2017	05/04/2017	25,23	4,51	3,71	1,52	+
	Quiberon	3	60	02/04/2017	05/04/2017	30,14	5,29	4,44	1,54	++
	Quiberon	3	61	02/04/2017	05/04/2017					++

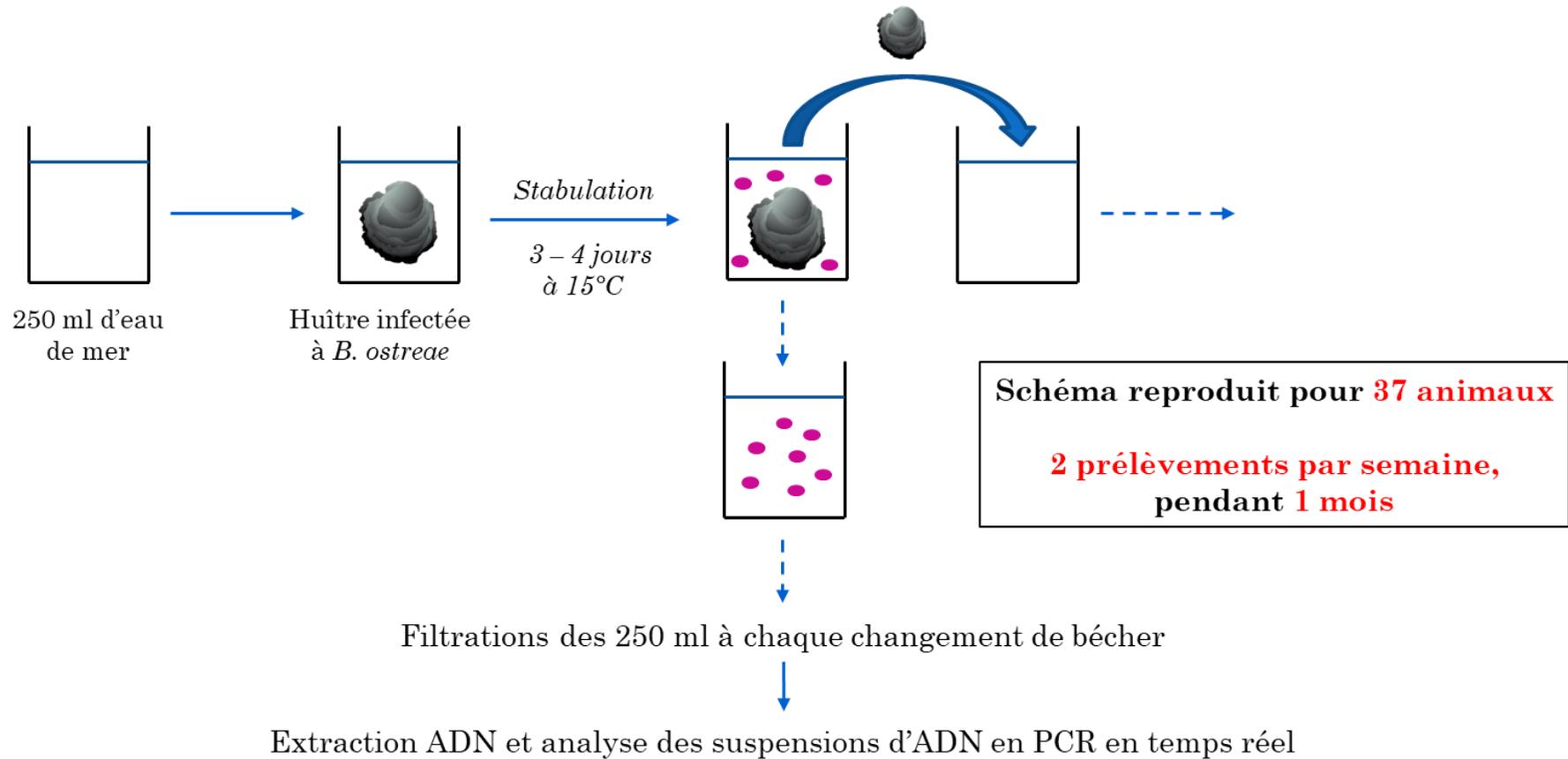
Annexe V : Etude de la survie de *B. ostreae* en dehors de son hôte - Schéma du protocole expérimental



Annexe VI : Caractéristiques des huîtres plates utilisées dans l'expérience sur l'excrétion de B. ostreae en dehors de son hôte

Provenance	Screening	Individu screening	Individu expérience	Poids (g)	Longueur (cm)	Largeur (cm)	Epaisseur (cm)	Diagnostic Bonamia
Brest	1	8	1	33,69	6,24	4,83	1,54	+
Brest	1	9	2	34,96	5,39	4,46	1,54	+
Brest	1	12	4	41,76	6,64	4,92	2,33	++
Brest	1	19	5	38,08	5,88	4,75	2,28	+++
Brest	1	86	8	18,32	5,26	4,63	0,85	+
Brest	1	88	9	17,89	5,13	4,49	0,89	+
Trieux	2	3	11	19,89	4,88	4,33	1,69	+
Trieux	2	8	12	31,72	5,46	4,34	1,53	+
Trieux	2	16	14	26,12	5,28	4,72	1,51	+++
Brest	2	56	16	6223	6,16	6,72	2,38	++
Brest	2	54	17	57,14	7,1	6,36	1,6	+
Brest	3	1	18	54,9	6,64	5,84	1,77	++
Trieux	3	16	21	16,61	4,73	4,25	1,22	+
Quiberon	3	50	23	32,05	5,93	5,89	1,57	+
Quiberon	3	59	24	25,23	4,51	3,71	1,52	+
Quiberon	3	60	25	30,14	5,29	4,44	1,54	++
Brest	4	76	27	123,8	8,04	8,46	2,79	++
Brest	4	80	29	26,73	5,07	4,5	1,77	+++
Brest	4	81	30	71,85	6,89	7,16	2,41	+++
Brest	4	87	31	113,81	8,93	6,82	2,54	+
Brest	4	95	32	11,84	8,62	7,74	2,83	+
Brest	4	104	33	60,28	7,24	6,8	2,36	+
Brest	5	8	35	63,39	7,32	6,5	2,62	+
Brest	5	12	36	44,2	5,73	5,36	2,42	++
Brest	5	14	37	33,21	6,07	4,89	1,8	+++
Quiberon	5	18	38	64,14	6,69	7,16	2,23	+
Quiberon	5	36	39	37,89	5,98	5,51	1,68	+++
Quiberon	5	21	40	71,96	6,29	6,43	2,29	+
Quiberon	5	41	41	114,66	7,43	7,53	2,5	++
Brest	6	54	42	38,79	6,06	5,46	1,87	++
Inconnu 1	6	69	43	33,94	6,3	5,81	1,16	+
Inconnu 1	6	83	44	44,49	6,42	5,91	1,84	+
Inconnu 2	6	85	45	94,31	8,08	7,03	2,6	++
Inconnu 2	6	86	46	40,17	5,62	5,72	1,77	+
Inconnu 2	6	89	47	74,18	6,81	7,08	2,51	++
Inconnu 2	6	92	48	52,27	5,49	5,58	2,09	++
Inconnu 2	6	94	49	93,33	7,09	6,81	2,86	++

Annexe VII : Etude de l'excrétion de *B. ostreae* en dehors de son hôte - Schéma du protocole expérimental



	<p>Diplôme : Ingénieur agronome Spécialité : Sciences Halieutiques et Aquacoles Spécialisation / option : Aquaculture Enseignant référent : Hervé Le Bris</p>
<p>Auteur(s) : Nicolas MEROU Date de naissance* : 17 mai 1994</p>	<p>Organisme d'accueil : LGPMM, Station Ifremer de Ronce-les-Bains Adresse : Avenue de Mus de Loup, Ronce-les-Bains, 17390 La Tremblade</p>
<p>Nb pages : 56 Annexes : 7</p>	
<p>Année de soutenance : 2017</p>	<p>Maître de stage : Isabelle Arzul</p>
<p>Titre français : Contribution à l'étude de la transmission de <i>Bonamia ostreae</i>, parasite protozoaire de l'huître plate européenne, <i>Ostrea edulis</i></p> <p>Titre anglais : Contribution to the study of the transmission of <i>Bonamia ostreae</i>, a protozoan parasite of the European flat oyster, <i>Ostrea edulis</i></p>	
<p>Résumé (1600 caractères maximum) :</p> <p><i>Ostrea edulis</i> est une espèce d'huître endémique des côtes européennes. Depuis la fin des années 1960, elle est frappée par deux épizooties réduisant encore aujourd'hui la production à des volumes extrêmement faibles : la marteillose et la bonamiose, dues respectivement aux parasites protozoaires <i>Marteilia refringens</i> et <i>Bonamia ostreae</i>. Néanmoins, les ostréiculteurs montrent depuis peu un regain d'intérêt pour cette espèce patrimoniale, récemment qualifiée d'espèce ingénieuse de l'écosystème. L'infection d'<i>O. edulis</i> à <i>B. ostreae</i> ayant encore aujourd'hui un impact considérable sur la production, des projets de recherche s'intéressent aux interactions hôte/parasite/environnement ainsi qu'à son cycle parasitaire. L'analyse bibliographique des données disponibles nous a permis de proposer un modèle conceptuel de la transmission du parasite et d'identifier des paramètres clés que nous avons choisis d'étudier expérimentalement : la survie de <i>B. ostreae</i> et son excrétion en dehors de son hôte. Les résultats obtenus ont montré l'intérêt de notre approche de filtration et analyse en PCR en temps réel pour détecter et quantifier le parasite à partir d'un échantillon d'eau de mer. L'étude de sa survie a révélé que l'ADN de <i>B. ostreae</i> restait détectable dans l'eau de mer pendant 2 jours. L'étude de l'excrétion du parasite a permis de mettre en évidence une variation individuelle et temporelle du taux d'excrétion, ainsi qu'une corrélation entre le taux d'excrétion et le niveau d'infection (faible, modéré, fort) ou le statut (vivant ou mort) de l'hôte. Nos résultats nous ont également permis d'améliorer notre modèle conceptuel, et de proposer de nouveaux protocoles expérimentaux pour améliorer notre compréhension de la transmission de la maladie.</p>	
<p>Abstract (1600 caractères maximum) :</p> <p><i>Ostrea edulis</i> is a native European oyster species. Since the late 1960s, it has been struck by two epizootic diseases, which are still reducing production to extremely low volumes : marteiliosis and bonamiosis, respectively caused by the protozoan parasites <i>Marteilia refringens</i> and <i>Bonamia ostreae</i>. Nevertheless, oyster farmers have recently shown a renewed interest in this native species, recently described as a keystone species in the coastal ecosystem. As bonamiosis still have a considerable impact on production, research projects focus on host / parasite / environment interactions and its parasitic cycle. The bibliographic analysis of the available data allowed us to propose a conceptual transmission model of <i>B. ostreae</i> and to identify key parameters that we have chosen to study experimentally : survival and excretion of the parasite outside its host. Our results have shown the value of our approach of filtration and real-time PCR analysis to detect and quantify the parasite from a sea water sample. The study of its survival revealed that the DNA of <i>B. ostreae</i> remain detectable in seawater for 2 days. The study of the excretion of the parasite revealed an individual and temporal variation in the excretion rate, as well as a correlation between the excretion rate and the level of infection (low, moderate, high) or the status (living or dead) of the host. Our results also allowed us to improve our conceptual model, and to propose new experimental protocols to improve our understanding of the transmission of the disease.</p>	
<p>Mots-clés : <i>Bonamia ostreae</i>, <i>Ostrea edulis</i>, PCR en temps réel, survie, excrétion, modèle compartimental</p>	
<p>Key Words : <i>Bonamia ostreae</i>, <i>Ostrea edulis</i>, Real-time PCR, survival, excretion, compartmental model</p>	

* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires