

ETUDE DE LA DYNAMIQUE DU PARASITE *MARTEILIA REFRINGENS* AU SEIN DE LA POPULATION TUNISIENNE DE MOULES *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* ET L'HUITRE PERLIERE *PINCTADA RADIATA*

Refka ELGHARSALLI^{*1}, I. ARZUL², B. CHOELLET², Y. COURALEAU²
et N. ALOUI-BEJAOU¹

1/ Institut National Agronomique de Tunisie, 43, Avenue Charles Nicolle, 1082 Tunis, Tunisia.

2/ IFREMER, Laboratoire de Génétique et Pathologie, Avenue de Mus de loup, 17390 La Tremblade, France.

* refkagr@yahoo.fr

ملخص

دراسة دورة حياة الطفيلي *Marteilia refringens* لدى نوعين من ذات الصدفتين *Mytilus galloprovincialis* و *Pinctada radiata*: البحث عن حاملين محتملين للطفيلي *Marteilia refringens* ومحاولة فهم دورة حياته تمثل أولوية أكيدة والهدف من هذا البحث يتمثل في تحديد المخاطر لهذا الطفيلي. الكشف عن وجود *M. refringens* لدى المحار *Ostrea stentina* بتونس وسع عدد المصابين والحاملين لهذا المرض وبالتالي ازدياد الانتشار الجغرافي لهذا الطفيلي الذي يبدو أنه قادر على إصابة مجموعة واسعة من ذات الصدفتين. لدراسة إمكانية انتشار هذا الطفيلي داخل النظام البيولوجي، قمنا باختبار العمل على نوعين من ذات الصدفتين اللتان تتعايشان مع المحار *O. stentina* وهما بلح البحر *Mytilus galloprovincialis* والنوع الثاني *Pinctada radiata*. التحليل الجيني PCR أقيم على العينات التي تتميز بـADN الذي هو في حالة جيدة اثر القيام بتحليل PCR universel. في مرحلة أولى قمنا بتركيز على « ITS1 » وأظهرت النتيجة وجود العديد من الشرائط المتعددة اثر ذلك قمنا باختبار أكثر دقة يتمثل في « PCR nichée » وتم تحليل التسلسل الجيني MT1- MT2 والتسلسل الجيني MT1B-MT2B لمجموعة العينات المدروسة. النتيجة النهائية لهذه التحاليل انتهت بإسقاط فرضية اعتبار *M. galloprovincialis* و *P. radiata* يمثلان عنصر من دورة حياة الطفيلي وبالتالي تم إدراج المحل *O. stentina* فقط بقائمة الأنواع لذات الصدفتين المعرضة للعدوى بالطفيلي *Marteilia refringens*.

كلمات المفاتيح: *Marteilia refringens* - الطفيلي - المحار - ذات الصدفتين - دورة الحياة

RESUME

La recherche d'autres hôtes potentiels du parasite *Marteilia refringens* et la compréhension de son cycle de vie présente une priorité dans un objectif de gestion du risque de la marteiliosis. La détection du parasite *M. refringens* en Tunisie et chez l'huître, *O. stentina* élargit la gamme d'hôtes et la répartition géographique de ce parasite qui semble être capable d'infecter un large éventail d'espèces de bivalves. A cet effet, nous avons sélectionné deux espèces qui cohabitent avec l'huître *Ostrea stentina* pour l'étude de la transmission du parasite aux autres espèces faisant partie de l'écosystème étudié ; La moule *Mytilus galloprovincialis* et l'huître perlière *Pinctada radiata*. L'analyse de la PCR pour la détection de *Marteilia refringens* ciblant la région ITS -1 a porté sur les échantillons donnant des résultats positifs pour la PCR universelle. Les produits d'amplification obtenus étaient présentés avec des bandes multiples. Par la suite une deuxième PCR sur un total de 180 individus ont été analysés premièrement par la PCR MT1/MT2 et par la suite par une deuxième PCR MT1B/MT2B. Sur les 90 individus de *P. radiata* et 90 individus de *M. galloprovincialis* analysées, aucun individu n'a été détecté positif à l'infection par le parasite *Marteilia refringens*. Finalement, l'hypothèse de développement de *M. refringens* chez les deux hôtes potentiels, *M. galloprovincialis* et *P. radiata* est rejetée. Sur la base de nos résultats, seulement *O. stentina* devrait être incluse dans la liste des espèces sensibles à l'infection à *M. refringens*.

Mots clés : *Marteilia refringens* – Dynamique de la population - Les bivalves – population tunisienne

ABSTRACT

Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* in the Tunisian population of *Mytilus galloprovincialis* and *Pinctada radiata*: The search for other potential hosts for the *Marteilia refringens* parasite and Elucidating the life cycle of this parasite is a priority in the management of the risk of marteiliosis. The detection of the *M. refringens* in the oyster *O. Stentina*, in Tunisia, enlarges the host range and geographical distribution of this parasite, which appears to be capable of infecting a wide range of bivalve species. For this reason, we selected two species that coexist with the *Ostrea stentina* oyster in order to study the transmission of the parasite to the other species which forming part of the ecosystem studied; The mussel *Mytilus galloprovincialis* and the pearl oyster *Pinctada radiata*. The PCR analysis targeting the ITS-1 region, was based on samples which have a positive results for universal PCR. The amplification products obtained were presented with multiple bands. Subsequently, a second PCR of a total of 180 individuals was analyzed firstly by the MT1 / MT2 PCR and subsequently by a second MT1B / MT2B PCR. Of 90 individuals of *P. radiata* and 90 individuals of *M. galloprovincialis* tested, no individuals were detected positive for infection by the parasite *Marteilia refringens*. Finally, the hypothesis of *M. refringens* infected the potential intermediate hosts, *M. galloprovincialis* and *P. radiata* is rejected. Based on our results, only *O. stentina* should be included in the list of susceptible species of *M. refringens* infection.

Keys words: *Marteilia refringens* – Dynamics - bivalves – Tunisian population

INTRODUCTION

L'aquaculture est marquée par des phases successives de développement de la production et des phases de déclin. Ces dernières peuvent être le résultat de la surexploitation des stocks ou de mortalités massives. La durabilité de cette activité nécessite la gestion des facteurs peuvent fragiliser cette production. Au regard de l'histoire de l'ostréiculture, les chutes de production majeures ont été causées par des maladies infectieuses. Les agents majeurs sont notifiés par l'Office International des Epizooties. Ces agents pathogènes pouvant entraîner la mort de leur hôte, tels que les protozoaires qui sont responsables d'importantes mortalités au sein des élevages d'huîtres plates *Ostrea edulis* (*Bonamia ostreae* et *Marteilia refringens*). Il est donc nécessaire d'identifier d'une façon spécifique ces agents et mettre en évidence des facteurs pouvant limiter le développement de la maladie. La marteiliose, ou maladie des Abers est la maladie causée par l'agent parasitaire *Marteilia refringens*. C'est un protozoaire parasite extracellulaire, de la glande digestive de l'huître *Ostrea edulis*. Les premières observations datent de la fin des années 60 et dénotent d'importantes mortalités touchant les élevages d'huîtres plates. Le parasite *M. refringens* a été étudié pendant près de trente ans. Pourtant des aspects de son cycle de vie et de sa taxonomie restent non clarifiés. La gestion du risque de cette maladie au sein des zones endémiques est confrontée à cette problématique. La recherche d'autres hôtes de *M. refringens*, et la compréhension du cycle du parasite présentent une priorité dans un objectif de gestion du risque de la marteiliose. Malgré les nombreuses études et hypothèses émises à ce sujet, de larges lacunes subsistent en particulier en ce qui concerne le mode de transmission du *M. refringens* qui reste inconnu. Le cycle de vie global du parasite reste incomplètement élucidé.

L'huître naine *O. stentina*, espèce sauvage, a ainsi été confrontée à des mortalités parmi les plus importantes de tous les cheptels d'huîtres. La prospection préliminaire réalisée durant l'année 2008, sur toutes les côtes tunisiennes a montré que les populations d'*O. stentina* n'ont survécu que dans la région de Monastir. Les résultats de la recherche de *M. refringens* chez les huîtres sauvages ont montré la présence du parasite *M. refringens* avec de fortes prévalences pouvant atteindre les 80% ((226bp, 156bp, 31bp) pour 92 sur 133 huîtres collectés en 2009 et 2010). La digestion enzymatique des produits amplifiés par Hhal (Le Roux *et al.*, 2001) a permis l'obtention de profils de restriction similaires à ceux obtenus pour *Marteilia refringens* de type «O» spécifique aux huîtres du genre *Ostrea* (Elgharsalli *et al.*, 2013). Ce parasite semble être impliqué dans le phénomène de mortalités observées sur les côtes

tunisiennes. La détection du parasite *M. refringens* en Tunisie et chez l'huître, *O. stentina* élargit la gamme d'hôtes et la répartition géographique de ce parasite qui semble être capable d'infecter un large éventail d'espèces de bivalves.

La recherche d'autres hôtes de *M. refringens* et la compréhension de son cycle de vie présente une priorité dans un objectif de gestion du risque de la marteiliose. A cet effet, nous avons sélectionné deux espèces qui cohabitent avec l'huître *Ostrea stentina* pour l'étude de la transmission du parasite aux autres espèces faisant partie de l'écosystème étudié ; La moule *Mytilus galloprovincialis* : cette espèce a fait l'objet de différentes études parasitologiques (Robledo *et al.*, 1994) et il s'est avéré que *M. galloprovincialis* constitue l'hôte de *M. refringens* sans engendrer des mortalités notables. La deuxième espèce *Pinctada radiata* : la présence simultanée de ce Bivalve avec *O. stentina* dans plusieurs sites (Hammamet, Monastir, Bizerte) peut suggérer que l'espèce puisse, au même titre que *M. galloprovincialis*, être un hôte pour *M. refringens*. L'étude moléculaire relative à la recherche de *M. refringens* chez *P. radiata* nous permettra à la fois de vérifier cette hypothétique infection et de cibler une analyse parasitologique chez une autre espèce de Bivalve qui, n'a jusque là, fait l'objet d'aucune étude en ce qui concerne le parasite *M. refringens*.

MATERIEL ET METHODES

Station d'étude

La région de Monastir faisant partie de la plate-forme orientale tunisienne se situe à environ 150 Km au Sud de Tunis (Fig. 1). Cette région forme un cap qui appartient au sahel tunisien, il s'agit d'une région à paysage relativement plat (SIG, 2007). Les marées au niveau de cette zone ne dépassent pas une moyenne de 15 à 20 cm, et l'amplitude maximale enregistrée est de 45 cm. Le fond marin est dominé par du sable grossier avec des débris de coquillages et du gravier. Le pourcentage de vase ne dépasse pas 3% (Ben Dhiab, 2009). La température varie entre 13.5°C et 27°C. La salinité est en relation directe avec la pluviométrie et l'évaporation et est de l'ordre de 37.5‰. Le port de Monastir est un bassin artificiel semi-fermé, d'environ 227,800 m² situé au sud-est de la Méditerranée, plus précisément dans la baie de Monastir (35 ° 45 '29" N, 10 ° 50' 13" E, Fig. 1). La profondeur moyenne est de 3,5 m avec un maximum de 7 m. Dans ce milieu, les mollusques représentent l'embranchement le plus abondant suivi par des crustacés et des annélides. Cette baie présente une grande biodiversité et comprend, au moins, 44 espèces différentes parmi lesquelles *Bittium reticulatum* (gastéropodes), *Pinctada radiata* (bivalves), *Pinna nobilis* (bivalves) et *Sabellaria alveolata* (Annélides) (Irathni *et al.*, 2007).

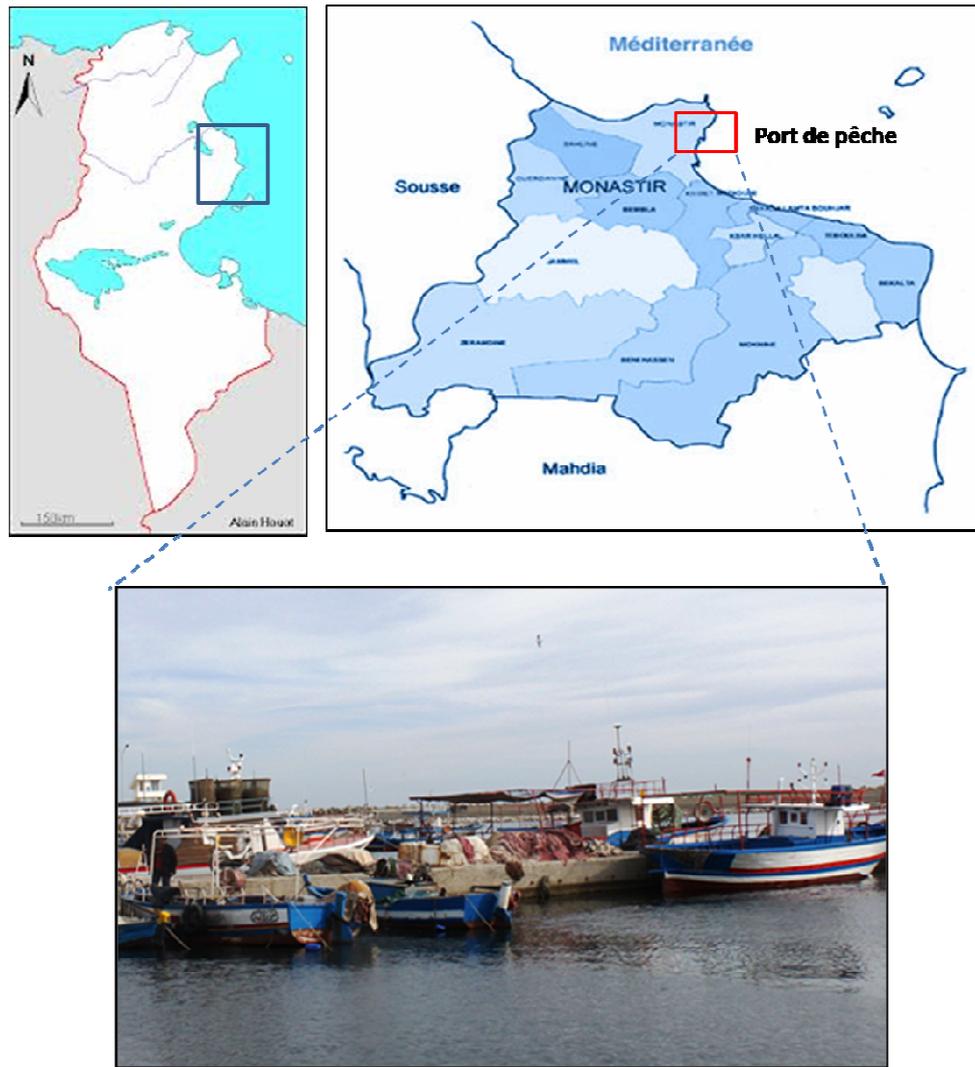


Figure 1. Situation géographique du port de Monastir

Prélèvement et conservation des échantillons

Afin d'évaluer si l'huître, *Ostrea stentina*, est un vecteur du parasite *Marteilia refringens*, nous avons recherché la présence d'ADN de ce parasite dans les glandes digestives de *Mytilus galloprovincialis* et de *Pinctada radiata* collectés durant l'année 2011 au niveau du port de Monastir. Le prélèvement de *Pinctada radiata* et de *Mytilus galloprovincialis* a été réalisé mensuellement d'avril à juin 2011 à raison de 30 individus par mois. Les échantillons de *P. radiata* ont été prélevés sur les gisements naturels par un plongeur à 5 m de profondeur. Les moules échantillonnées provenaient d'une même poche suspendue à 5 mètres sous la surface, près de l'entrée du port. Pour chaque individu, une section de la masse viscérale était fixée en formol 10% pour des analyses histologiques, et une section était conservée dans une solution d'éthanol 96% à -20°C pour des analyses moléculaires.

Une antérieure recherche a été effectuée dans les glandes digestives d'*O. stentina* au niveau de la même station d'étude durant les mois d'avril, mai et

juin de l'année 2009 et en mai 2010. Les huîtres sont ouvertes manuellement. La moitié a été fixée dans le liquide de Davidson puis incluse dans la paraffine et l'autre moitié a été congelée à -20°C. Les huîtres sont conservées afin d'être analysées au laboratoire de pathologie à la Tremblade (Ifremer- France).

Extraction d'ADN

Les tissus utilisés pour l'extraction de l'ADN sont conservés dans de l'éthanol 96% à 4°C. Après pesée et séchage, les échantillons sont broyés dans un tampon d'extraction (NaCl 100 mM, 10Mm Tris, pH :8.25 mM, EDTA Ph 8, SDS 0.5%) contenant de la protéinase K (100Ig/ml). Après une nuit d'incubation à 56°C, l'ADN est extrait selon le protocole du kit QIAamp de Quiagen. L'amplification est contrôlée après migration électrophorétique en gel d'agarose 1% dans du tampon TAE IX, coloration par l'agent intercalant bromure d'éthidium et visualisation des acides nucléiques aux UV.

Amplification de la PCR

Trois techniques moléculaires ont été utilisées pour la détection de l'ADN du parasite *Marteilia refringens*. Une PCR universelle est employée pour vérifier l'intégrité de l'ADN d'huître extraite et détecter une éventuelle présence d'inhibiteur. Une PCR ciblant la région ITS1 est utilisée pour amplifier le fragment ITS-1 de taille 411 bp (Le Roux *et al.*, 2001). Une PCR nichée ciblant la région IGS, PCR emboîtée ou *Nested PCR* constituée de deux étapes successives,

avec deux couples d'amorce différents (Lopez-flores *et al.*, 2004). Une amplification spécifique d'un fragment d'ADN par action de la Taq polymérase, d'amorces spécifiques, et de nucléotides dans un thermocycleur a été effectuée (Fig. 2). Le programme d'amplification de la PCR inclus une dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 5 min, 30 cycles à 94°C pendant 1 min, 55 °C pendant 1 min et une élongation pendant 1 min à 72°C avec un cycle d'extension final à 72°C pendant 10 min.

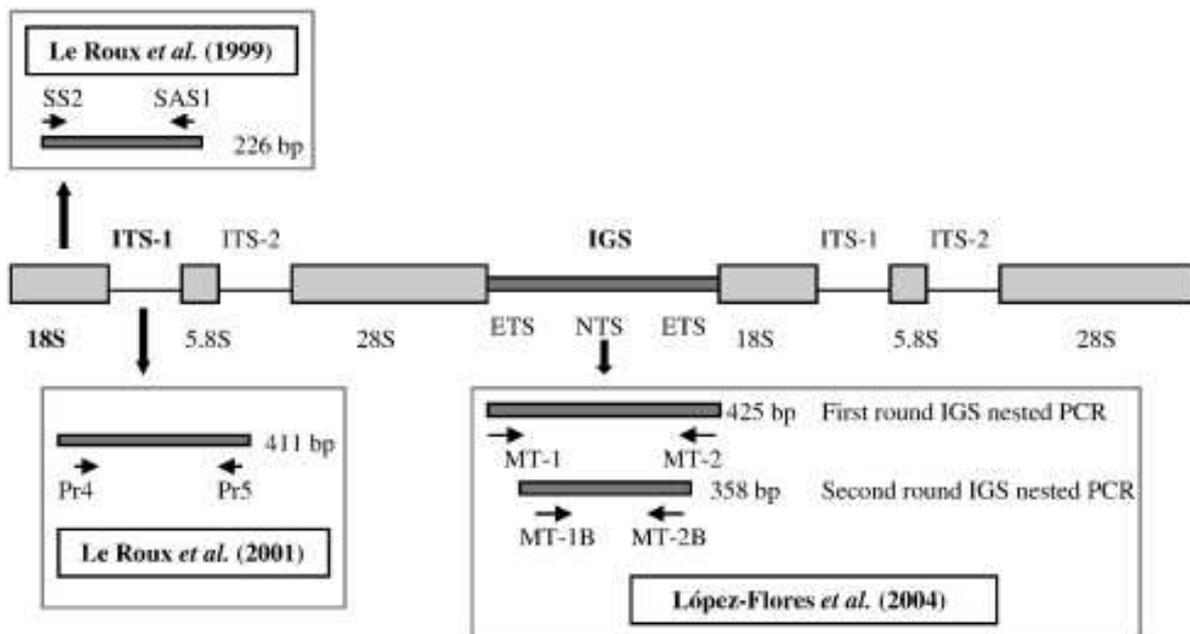


Figure 2. Une représentation schématique de l'ARN ribosomal avec les différentes régions génétiques étudiées dans cette étude (18S, ITS-1 et IGS)

RESULTATS

La PCR universelle

Un total de 180 individus ont été analysés en PCR universelle. Tous les individus ont présenté un produit d'amplification avec une taille attendue de 226 pb. Ces échantillons ont pu être analysés par la suite, en PCR spécifique (avec les amorces M2A-M3AS) et également avec la PCR nichée ciblant la région IGS.

La PCR ITS-1

L'analyse de la PCR pour la détection de *Marteilia refringens* ciblant la région ITS -1 a porté sur les

échantillons donnant des résultats positifs pour la PCR universelle (Fig. 3). L'interprétation des résultats n'a pas été aussi aisée qu'en PCR universelle, en particulier lorsque les produits d'amplification obtenus étaient présentés avec des bandes multiples. En effet, tous les échantillons des deux Bivalves *M. galloprovincialis* et de *P. radiata* testés, ont présenté des bandes multiples (produits de la PCR non attendus). Ces échantillons ont été analysés une deuxième fois en modifiant les concentrations des amorces et des échantillons par une dilution au 1/2 mais, sans avoir des résultats interprétables (Fig. 4). Alors, une deuxième PCR a été utilisée, celle de la PCR nichée.



Figure 3. Amplification par PCR de fragment de gène 18S et contrôle de la spécificité par Southern Bolt. Les produits de PCR sont détectés sur un gel d'agarose additionné de bromure d'éthidium. Les ADN analysés (de 1 jusqu'à 9) proviennent de l'huître *Ostrea stentina*, (M) marqueur de taille, (T-) contrôle négatif, (T+) contrôle positif

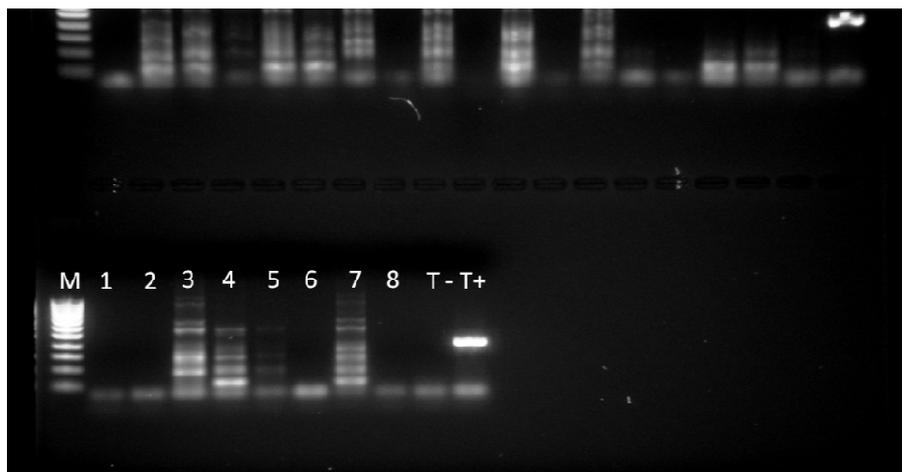


Figure 4. Amplification par PCR de fragment de gène ITS1 et contrôle de la spécificité par Southern Bolt. Les produits de PCR sont détectés sur un gel d'agarose additionné de bromure d'éthidium. (A) Les ADN analysés (de 3 jusqu'à 8) proviennent de moules, (M) marqueur de taille, (T-) contrôle négatif, (T+) parasite *Marteilia* purifié à partir de moules.

PCR nichée

Au total, 180 individus ont été analysés premièrement par la PCR MT1/MT2 et par la suite par une deuxième PCR MT1B/MT2B. Sur les 90 individus de *P. radiata* et 90 individus de *M. galloprovincialis* analysées, aucun individu n'a été détecté positif à l'infection par le parasite *Marteilia refringens*.

Taux de prévalence du parasite *Marteilia refringens* chez la population d'huîtres de Monastir

L'étude des prévalences dans notre étude, montre un niveau d'infection très élevé (atteint 100%) dans les populations infectées d'huîtres dès le début de l'étude. En effet, elle varie entre 100% et 93.33%

durant les mois de février-mars et 70% à 38.46% durant le mois de juin et octobre (Tab.1). Une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *HhaI* permet de discriminer le produit PCR obtenu avec les amorces M2S/M3AS correspondant à *Marteilia maurini* et/ou *Marteilia refringens*. 10 µl de produit PCR sont digérés dans 20 µl contenant 2 µl de tampon 10X de l'enzyme et 1 µl d'enzyme à 37°C pendant 1 H. Le produit de digestion est analysé sur un gel d'agarose à 2%. L'amplification est contrôlée après migration électrophorétique en gel d'agarose 2% dans du tampon TAE IX, coloration par l'agent intercalant bromure d'éthidium et visualisation des acides nucléiques aux UV.

Tableau I. Identification des parasites à partir d'extraits d'ADN d'échantillons de l'huître *Ostrea stentina* collectés saisonnièrement au port de Monastir. Identification de *Marteilia refringens* par PCR en utilisant deux amorces M2A-M3AS et MT1 MT2.

Date	Février 2009	Avril 2009	Juin 2009	Octobre 2009
Identification du parasite <i>Marteilia refringens</i>				
PCR M2A-M3AS	30 + / n= 30	28 + / n=30	21 + / n=30	5 + / n=13
RFLP M2A-M3AS	30 + / n= 30	28 + / n= 30	21 + / n= 30	5+ / n=13
Digestion <i>HhaI</i>	<i>M.refringens O</i>	<i>M.refringens O</i>	<i>M.refringens O</i>	<i>M.refringens O</i>
PCR MT1-MT2	29 + / n= 30	29 + / n= 30	25 + / n=30	0 + / n=13

DISCUSSION

Les huîtres *O. stentina* sont présentes à l'état naturel dans le port de Monastir. Le *Marteilia refringens* type « O », originaires de l'huître, a été détecté avec des prévalences atteignant 80% chez les huîtres sauvages du port de Monastir (Elgharsalli et al., 2013). On peut classer le port de Monastir dans les zones dites lourdement infectées. En effet Balouet *et al.*, (1979) qualifient les zones où le taux d'infection est supérieur à 40% comme des zones « à haut risque ». Il apparait que, plus la population est anciennement infectée, plus la prévalence est élevée Barnaud (1998). La marteiliose ne disparaît donc pas et conserve « le capital cumulé » des années précédentes. Barnaud (1998) a signalé que l'infection d'une population se fait majoritairement la première année entre un et deux mois et que la prévalence définitive est quasiment atteinte dès les premières semaines d'infection et n'augmente pas jusqu'à l'infection de l'année suivante. Les résultats de la PCR ITS-1 et IGS suggèrent une implication possible de *M. refringens* dans la mortalité de l'huître *O. stentina*. Le but de la présente étude n'était pas de caractériser le parasite dans l'hôte *O. stentina*, mais pour mieux évaluer la dynamique du parasite sur la population d'huîtres en Tunisie en se basant sur des outils moléculaires.

En ce qui concerne la nécessité d'une hôte intermédiaire afin d'accomplir le cycle du parasite au sein de son hôte, Lopez-flores *et al.* (2008) ont noté la présence des différents stades connus du parasite *M. refringens* y compris le stade de « mature sporulation » suggérant que le parasite *M. refringens* est apte à compléter l'infection dans l'hôte. Par contre, Roubal *et al.*, (1989) ont montré que les spores matures de *M. sydneyi* se détachent de son hôte *Crassostrea gigas*, couplés à des sporontes intactes et représentent le stade infectieux de l'hôte intermédiaire. Quant au parasite *Marteilioides chungmuensis* qui infecte l'hôte *Crassostrea gigas*, les cellules infectieuses ont été détectées au niveau des cellules de l'épithélium des tubules digestifs. Les parasites matures sont libérés par la suite de l'hôte à partir du canal des organes génitaux (Ioth *et al.*, 2004; Kleeman *et al.*, 2002). La détection des phases

initiales de *M. refringens* infectieux dans l'épithélium des branchies et le manteau de *M. galloprovincialis* suggère que le stade parasitaire « libre-flottante », a été acquis par l'alimentation du bivalve à partir de processus de filtration, qui vient en contact avec des branchies et les palpes, tel que proposé par Kleeman *et al.*, (2002). Cette hypothèse implique que le parasite est libéré à partir de son hôte intermédiaire dans son milieu environnant sous la forme flottante.

La connaissance du mode de transmission inter-hôtes du parasite donnerait une clef pour la régulation du parasite. Cette connaissance passera bien évidemment par l'analyse des espèces qui peuvent être des hôtes intermédiaires potentiels. Il est possible que *Marteilia refringens* se développe chez une espèce autre que l'huître *Ostrea stentina*. En effet, des travaux ont identifié le copépode *Paracartia grani* comme hôte intermédiaire potentiel (Audemard *et al.*, 2002). Le parasite était présent chez les adultes femelles ainsi que chez les copépodites (juvéniles) avec des taux d'infection plus faibles. Ainsi que d'autres essais conduits par Carrasco *et al.*, (2007) dans le Delta de l'Ebre suggèrent l'implication de deux nouveaux hôtes intermédiaires potentiels, *Oithona sp.* et *Harpatocoida Acartia discaudata*. Quel que soit les essais de transmission expérimentale mises en place, il n'a jamais été permis d'infecter expérimentalement des animaux sains. Il en découle selon Berthe *et al.* (1998) l'hypothèse relative à l'existence d'un ou plusieurs hôtes intermédiaires dans le cycle du parasite (cycle hétéroxène). Des travaux effectués par Berthe *et al.* (1998) ont suggéré l'existence d'un cycle complexe, employant un ou plusieurs hôtes intermédiaires. Des cycles ont ainsi été proposés par Grizel (1985), décrivant les différents stades du développement du parasite dans l'huître avec incertitude sur le rôle des stades observés dans la multiplication et la dissémination du parasite. Audemard *et al.* (2002) ont signalé la présence d'un hôte intermédiaire, le copépode *Paracartia grani* qui est impliqué dans le cycle de vie de *M. refringens*.

Les résultats de notre étude montrent que le parasite *M. refringens* n'a pas été détecté chez les échantillons de *M. galloprovincialis* et de *P. radiata* alors qu'il a été présent chez l'huître *O. stentina*. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces deux

espèces sont plus résistantes que l'huître *O. stentina* au parasite. Il est également possible que l'absence du parasite chez les deux bivalves soit liée à des conditions environnementales particulières. La présence de *Marteilia refringens* chez l'espèce *P. radiata* n'a jamais été identifiée par des travaux antérieurs. Par contre, la présence de *Marteilia* chez les moules a été montrée par Carrasco *et al.* (2007) à partir des essais réussis d'infection des moules par du zooplancton infecté (Carrasco *et al.*, 2008). D'autres travaux ont conforté l'hypothèse de deux types de parasite M et O présentant une spécificité pour leur hôte préférentiel; les moules et les huîtres, ce qui expliquerait l'absence de *Marteilia refringens* chez les moules du port de Monastir. De plus, la mise en relation des moules infectées avec des huîtres saines n'a pas permis la transmission du parasite (Berthe *et al.*, 1998).

CONCLUSION

L'étude de la dynamique du parasite dans les populations de deux bivalves étudiées suggère qu'il n'y a aucune implication de ces deux espèces dans le cycle de vie du parasite. Finalement, l'hypothèse de développement de *M. refringens* chez les deux hôtes potentiels, *M. galloprovincialis* et *P. radiata* est rejetée. Sur la base de nos résultats, seulement *O. stentina* devrait être incluse dans la liste des espèces sensibles à l'infection à *M. refringens*.

REFERENCES

- Audemard C, Le Roux F., Barnaud A., Collins C., Sautour B., Sauriau P-G, De Montaudouin X., Coustau C., Combes C., Berthe F., 2002. Needle in a haystack: involvement of the copepoda *Paracartia grani* in the life-cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. *Parasitology*. 124, 315-323.
- Barnaud G., 1998. Conservation des zones humides, concepts et méthodes appliqués à leur caractérisation. Coll. Patrimoines Naturels, vol. 34., Paris. 451p.
- Ben Dihad N., 2009. Etude de la croissance de *Dicentrarchus labrax* en plein mer. Biotechnologie marine, PFE, ISBM.
- Berthe F.C.J., Pernas M., Zerabib N., Haffner P., Thebault A., Figueras A.J., 1998. Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special consideration of its life cycle. *Dis. Aquat. Org.* 34:135-144.
- Carrasco N. Arzul I. Berthe F. C. J. and M. D., 2008. *In situ* hybridization detection of initial infective stages of *Marteilia refringens* (Paramyxea) in its host *Mytilus galloprovincialis*. *J. Fish Diseases*. 31, 153-157.
- Elgharsalli R., Aloui-Bejaoui N., Salah H., Chollet B., Joly J.P, Robert M., Couraleau Y., Arzul I., 2013. Characterization of the protozoan parasite *Marteilia refringens* infecting the dwarf oyster *Ostrea stentina* in Tunisia. *J. Inv. Patho.* (112) 175-183.
- Grizel H., 1985. Études des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* L. et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier, France, 145 pp.
- Itoh H., Tatsumi T., Sakamoto T., Otomo K., Toyomasu T., Kitano H., Ashikari M., Ichihara S., Matsuoka M., 2004. A rice semi-dwarf gene, *Tan-Ginbozu (D35)*, encodes the gibberellin in biosynthesis enzyme, *entkaurene oxidase*. *Plant. Mol. Biol.* 55.
- Ikram I. Sabiha T.Z and Oum Kalthoum B.H., 2007. Etude de la faune associée à l'espèce invasive *Pinctada radiata* sur le littoral nord et est de la Tunisie. *Rapp. Comm. int. Mer Medit.* 38, 503.
- Kleeman S.N., Adlard R.D., & Lester R.J.G., 2002. Detection of the initial infective stages of the protozoan parasite *Marteilia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* and their development through to sporogenesis. *International Journal for Parasitology*. 32, 767-784.
- Le Roux F, Lorenzo G, Peyret P, Audemard C, Figueras A, Vivares C, Gouy M, Berthe F., 2001. Molecular Evidence for the Existence of Two Species of *Marteilia* in Europe. *J. Euk. Microbio.* 48, 449 - 454.
- López-Flores I., Robles F., Valencia J.M., Grau A., Villalba A., de la Herrán R. M.A., Garrido-Ramos, C. Ruiz-Rejón, M. Ruiz-Rejón and J.I. Navas., 2008. Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and *in situ* hybridisation in *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain). *Dis. Aquat. Org.* 82, 79-87.
- Robledo J.A.F., Caceres-Martinez, J., Figueras, A. (1994). *Marteilia refringens* in mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) beds in Spain. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. 14, 61-63.
- Roubal F.R., Masel J. and Lester R.J.G., 1989. Studies on *Marteilia sydneyi*, agent of QX disease in the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*, with implications for its life cycle. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 40 (2), 155-167.