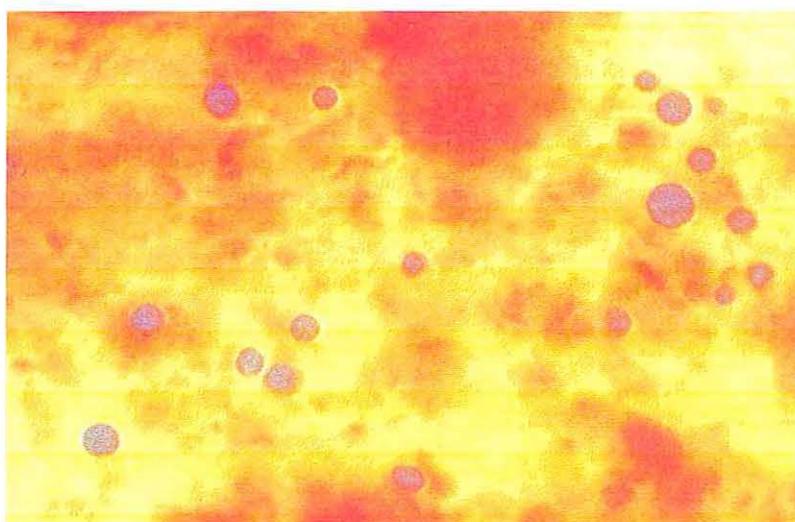


**Diagnostic quantitatif de *Perkinsus atlanticus*  
(Apicomplexa, Perkinsea) chez les palourdes  
*Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum***



Octobre 1996 - Mai 1997



**Manuela Almeida**  
IFREMER  
Laboratoire de Génétique, Aquaculture  
et Pathologie  
B.P. 133  
17390 La Tremblade

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 02717

## REMERCIEMENTS

*Je tiens d'abord à remercier le professeur Maria Teresa Divis et Francisco Ruano pour avoir contacté le laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie de l'IFREMER, La Tremblade, où j'ai eu le plaisir de réaliser ce travail.*

*J'adresse également mes remerciements à Jean Pierre Flassch et André Gérard pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.*

*Toute ma gratitude à Franck Berthe qui a bien voulu diriger mon travail et pour ses conseils, sa patience et son amitié.*

*Merci à toute l'équipe du laboratoire, spécialement, Philippe Haffner, Anne Thébault, Nathalie Cochenec, Bruno Cholet, Cécile Lipart et Zuinggang Xue, qui, chacun dans son sujet, m'ont aidé à progresser au long de mon stage.*

*Je veux remercier Viviane Boulo pour son aide et son accueil dans le laboratoire DRIM de Montpellier pendant une semaine.*

*Enfin, un grand merci à tous les membres de la "stagiaire liste" (Angélique, Arnaud, Bénédicte, Bertrand, Catherine, Christophe, Franck, Guenaelle, Hélène, Isabelle, Marie, Michaël, Nicolas, Patrick, Sophie, Stéphane, Xavier), pour leur soutien et leur agréable compagnie. Et je ne pourrais pas oublier d'exprimer un très particulier merci à David pour son aide au labo, sa bonne humeur et pour les bons moments passés ensemble.*

## Résumé:

Le protozoaire parasite *Perkinsus atlanticus* (Azevedo, 1989) est une des causes des chutes de production des palourdes *Ruditapes decussatus* et *R. Philippinarum* cultivées au Portugal, en Espagne et en Italie. Des modèles d'infection de *Perkinsus* ont été déjà réalisés, par reproduction expérimentale de la maladie, pour étudier le rôle de la densité des palourdes, de la température et de la salinité sur le déroulement de la Perkinsiose.

L'objectif de ce travail a été de développer une technique de diagnostic quantitative pour optimiser l'évaluation de l'intensité d'infection et détecter faibles infections des palourdes par *P. atlanticus*. Le principe de cette technique consiste à cultiver tous les tissus de la palourde en milieu thioglycolate, suivi d'une lyse à l'hydroxide de sodium, coloration au Lugol des parasites et quantification sur des filtres de cellulose. Les résultats positifs ont été évalués en utilisant des anticorps monoclonaux, préparés par Goggin (1991).

Les parasites ont été purifiés et les différents stades de son cycle de développement ont été cultivés *in vitro*.

Ce parasite, en routine, est diagnostiqué par histologie ou incubation des branchies en milieu thioglycolate. Pourtant, des travaux déjà réalisés indiquent que *Perkinsus* se trouve dans plusieurs tissus (branchie, manteau, rein, pied, gonades, intestin et glande digestive). Les différentes méthodes de diagnostic disponibles ont été comparées en ce qui concerne à leurs sensibilités et spécificités.

Les résultats suggèrent que la technique de culture de toute la palourde fourni des données satisfaisantes pour la quantification du taux d'infection (nombre de parasites par gramme de tissu de palourde) et pour déterminer un niveau minimal qui permet d'éviter les résultats faux positifs. Pourtant, cette méthode peut être améliorée par l'utilisation complémentaire de sondes spécifiques pour détecter des cellules parasitaires sur des filtres.

Les résultats suggèrent aussi que les méthodes utilisées en routine ne sont pas assez sensibles pour détecter des faibles niveaux d'infection.

# INDEX

	Pag.
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	1
<b>II. LA PERKINSIOSE</b>	
1. Evolution de la connaissance sur la Perkinsiose .....	2
2. Les espèces du genre <i>Perkinsus</i> .....	3
3. Cycle de développement de <i>Perkinsus atlanticus</i> .....	4
4. Symptômes, lésions et réaction de la palourde à la Perkinsiose .....	8
<b>III. MATERIEL ET METHODES</b>	
1. Culture et purification de <i>Perkinsus atlanticus</i> .....	10
2. Méthodes de diagnostic .....	10
2.1. Frottis frais .....	11
2.2. Diagnostic quantitatif (culture totale de la palourde) .....	11
2.3. Culture des branchies .....	12
2.4. Histologie .....	13
2.5. Immunologie .....	13
2.5.1. Préparation des macrophages et décongélation des hybridomes .....	13
2.5.2. Récupération des anticorps .....	14
2.5.3. Immunofluorescence .....	14
2.5.4. Immunopéroxydase .....	14
2.6. Extraction d'ADN de <i>Perkinsus atlanticus</i> .....	15
<b>IV. RESULTATS</b>	
1. Mise au point de la quantification avec solution de Lugol .....	16
2. Comparaison des différentes techniques sur les animaux d'Algarve .....	16
3. Comparaison des différentes techniques sur les animaux d'Irlande .....	17
4. Choix d'une valeur seuil .....	17
5. Spécificité de la coloration au Lugol .....	18
6. Application sur le lot de La Tremblade .....	19
<b>V. DISCUSSION</b> .....	20
<b>VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	21

## I. INTRODUCTION

Le développement de l'Aquaculture a déterminé le progrès de la Pathologie, comme moyen de contrôler l'expansion des maladies infectieuses et de réduire ses impacts sur les espèces de poissons et mollusques cultivées (Dear, 1989). Ce contrôle est spécialement important, car, pour le succès commercial de cette activité, on augmente les densités, favorisant ainsi le développement des maladies et infections parasitaires (Perkins, 1986).

De toutes les maladies des mollusques, celles dues aux protistes sont les plus étudiées dans la mesure où les protozoaires sont associés à des mortalités massives qui se traduisent par des chutes de production et des pertes économiques notables (Perkins, 1993).

Cette étude a rapport à une maladie de la palourde *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* - la Perkinsiose - et qui produit de graves problèmes, surtout dans les élevages du Portugal (Ruano, 1989; Azevedo, 1989a,b), d'Espagne (Figueras *et al.*, 1992; Navas *et al.*, 1992), d'Italie (DaRos et Canzonier, 1986; Ceschia *et al.*, 1991) et de France (Goggin, 1991). Le cycle de développement de l'agent pathogène responsable pour cette epizootie a été étudié par Azevedo (1989b), qui l'a-identifié comme une nouvelle espèce du genre *Perkinsus* - *Perkinsus atlanticus*.

Quelques travaux de reproduction expérimentale de l'infection ont été réalisés dont l'objectif était de déterminer le rôle des paramètres physiques et chimiques (température, salinité, pH, oxygène dissout) (Auzoux-Bordenave *et al.*, 1995) et de la densité et taille des palourdes (Ruano et Vigario, 1991; Almeida, 1995) sur l'intensité et le taux d'infection.

Le parasite, en routine, est diagnostiqué par histologie ou par culture des lamelles branchiales en milieu thioglycolate suivie de coloration au Lugol; toutefois, on a reconnu qu'une méthode de diagnostic quantitative était nécessaire pour optimiser l'évaluation de l'intensité d'infection et détecter les infections commençant ou faibles, notamment dans le cadre du modèle expérimental.

Ainsi, l'objectif de ce travail a été établi: développer un protocole de diagnostic quantitatif de *P. atlanticus*, adapté de la technique décrite par Fisher et Olivier (1996) pour diagnostiquer *P. marinus* chez la huître *Crassostrea virginica*, qui consiste en cultiver tous les tissus en milieu thioglycolate, et, ensuite, comparer les différentes méthodes.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Pathologie - IFREMER - La Tremblade (France), dans le cadre de ma deuxième année de Master of Aquaculture, Université d'Algarve (Portugal). La suite des travaux consistera en induire artificiellement la maladie sur des palourdes saines, c'est à dire, sans *Perkinsus*, provenant d'une zone indemne (Irlande), afin de déterminer quelle est la concentration de parasites nécessaire pour que la maladie soit détectable et quelle est la dose létale.

## II. LA PERKINSIOSE

### 1. Evolution de la connaissance sur la Perkinsiose

Reichenow (1940 *in* Vilela, 1951) a mentionné l'existence de sporozoaires parasites dans 17 espèces différentes de lamellibranches. La plupart des sporozoaires parasites de ces mollusques était groupée dans la sous-classe Telosporidea (genres *Pseudoklossia* et *Nematopsis*) et Acnidosporidea (genre *Haplosporidea*) (Vilela, 1951).

Au delà de ces parasites connus, Vilela (1951) indique qu'il a trouvé encore d'autres, mais non identifiés, qu'il appelle microparasites. Les premières descriptions de parasitoses chez la palourde ont été faites pour cet auteur, avec l'identification de *Haplosporidium tapetis*.

Pendant les années 50, une epizootie qui causait une grande mortalité de l'huître *C. virginica* a commencé et Makin, Owen et Collier (1950) ont identifié l'agent pathogène responsable comme *Dermocystidium marinum* (Sindermann et Rosenfield, 1967).

Postérieurement, Makin et Ray (1966) ont suggéré que cet agent était du genre *Labyrinthomyxa* et, en 1978, une détermination taxonomique plus précise a permis à Levine de classer comme une espèce du genre *Perkinsus* - *Perkinsus marinus* (Sindermann, 1990).

Le genre *Perkinsus* a 4 espèces décrites et reste le seul genre de la classe Perkinsasida (Levine, 1978). L'inclusion de cette classe dans le phylum Apicomplexa est controversée (Canning, 1986 *in* Goggin et Barker, 1993). D'après Levine (1988), il y a deux classes dans le phylum Apicomplexa: Perkinsasida et Sporozasida. Il suggère que *Perkinsus* est le plus primitif des Apicomplexa et était inclus dans ce phylum, parce que son sporange est similaire aux gametocystes de gregarine, avec un tube de décharge qui ressemble au sporoducte de ces organismes (Levine, 1988 *in* Goggin et Berker, 1993). Les zoospores de *Perkinsus* ont un complexe apical qui est la caractéristique qui distingue les apicomplexens, mais la différence c'est qu'ils sont biflagellés (comme certains champignons) et ils ont une vacuole antérieure (Perkins, 1976). Gajadhar *et al.* (1991) suggèrent qu'on donne trop d'importance au complexe apical, comme caractère déterminant la position phylogénétique; Vivier (1982) indique aussi que *Perkinsus* est plus proche des champignons que des Apicomplexa. Alternativement, Gunderson *et al.* (1986) suggèrent que *Perkinsus* peut être un groupe intermédiaire entre les flagellés et les apicomplexens. Plus récemment, Wolters (1991) a proposé que *Perkinsus* peut faire la liaison entre les apicomplexans non-flagellés et les dinoflagellés.

Le travail de Goggin et Barker (1993) permet de clarifier ces controverses et indique que ce parasite est phylogénétiquement plus proche des dinoflagellés et des apicomplexens coccidiens et piroplasmes que des champignons ou des flagellés.

## 2. Les espèces du genre *Perkinsus*

Les parasites du genre *Perkinsus* ont été historiquement associés à des épisodes de mortalités de mollusques; ils ont été recensés sur plus de 30 espèces de mollusques dans le monde (Goggin et Lester, 1987; Perkins, 1988). Par contre, Rodriguez *et al.* (1994) répertorient 67 espèces de mollusques (bivalves, sauf 4 espèces de gastéropodes) infestées dans des zones tempérées, subtropicales et tropicales à travers le globe.

Il y a 4 espèces qui sont classées en fonction de l'identité de l'hôte et sa localisation géographique et/ou tissulaire ainsi que pour son apparence et morphologie en histologie. Pourtant, ces caractéristiques ne sont pas suffisantes pour assurer une vraie discrimination des espèces de *Perkinsus* (Goggin, 1994), car, par exemple, les *Perkinsus* isolés à partir de mollusques d'Australie sont très infectieux et sont transmis expérimentalement à d'autres mollusques de genres différents et situés à d'autres latitudes. De plus, leurs tailles peuvent varier en fonction de l'hôte (Goggin *et al.*, 1989).

L'espèce la plus étudiée est *P. marinus*, parasite de la huître creuse, *Crassostrea virginica*; cet agent pathogène est classé, pour l'Office International des Epizooties (OIE) comme communicable, de grande importance socio-économique, donc significative dans le commerce international de coquillages (Code OIE, 1995). *P. marinus* se trouve dès la côte atlantique des Etats Unis (Craig *et al.*, 1989; Wilson *et al.*, 1990) jusqu'au Golfe du Mexique (Fisher *et al.*, 1992, Burreson *et al.*, 1994; Ray, 1996).

*P. olseni* parasite l'abalone *Haliotis rubra* et *H. laevigata* (Code OIE, 1995) d'Australie, produisant des pustules sur la chair, ce qui réduit sa valeur commerciale, ainsi que les clams *Tridacna crocea* et plusieurs d'autres espèces de mollusques, car il est très infectieux (Goggin et Lester, 1995; Goggin, 1996).

*P. karlssoni* parasite *Argopecten irradians* de la côte est du Canada et des Etats Unis (McGladdery *et al.*, 1991; McGladdery *et al.*, 1993). La position taxonomique de ce parasite est encore controversée, parce que la forme et la structure des prezoosporanges et le mouvement des zoospores ne sont pas similaires avec le genre *Perkinsus*; Goggin *et al.* (1996) ne considèrent pas *P. karlssoni* comme une espèce de ce genre.

La première fois, en 1978, on a diagnostiqué un agent étiologique similaire à *P. marinus* dans les palourdes *Ruditapes decussatus* de la Laguna Veneta (nordest d'Italie), qui a provoqué des mortalités massives. On a aussi détecté *Perkinsus* dans une autre lagune de cette zone chez *R. philippinarum* (Ceschia *et al.*, 1991). Le même parasite a été aussi trouvé en Espagne, sur la côte de Huelva (Navas *et al.*, 1992) et dans la Ria de Vigo (Figueras *et al.*, 1992). En Portugal, depuis 1983, on a détecté des mortalités massives des palourdes cultivées dans la Ria Formosa et autres zones de la côte sud (Chagot *et al.*, 1986; Ruano, 1989).

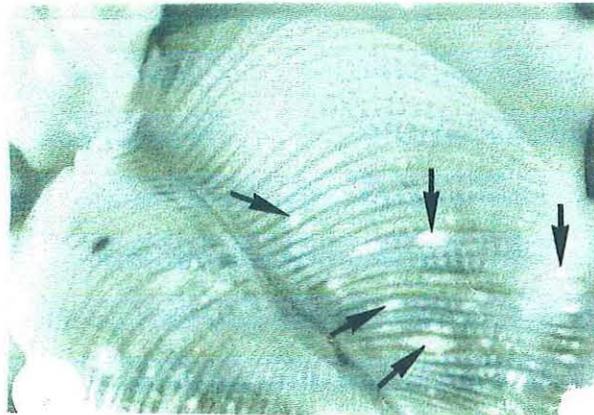
Comme conséquence de cette mortalité, des analyses ont été réalisées et, après des études détaillées du cycle de développement du parasite, Azevedo, en 1989, l'a identifié comme une nouvelle espèce - *Perkinsus atlanticus*.

### 3. Cycle de développement de *Perkinsus atlanticus*

Le cycle de développement de *P. atlanticus* a été décrit par Azevedo (1989 a,b; 1991), en microscopie électronique et études cytochimiques et *in vitro*. Domart *et al.* (1992) ont étudié aussi le cycle de ce parasite, par culture *in vitro*.

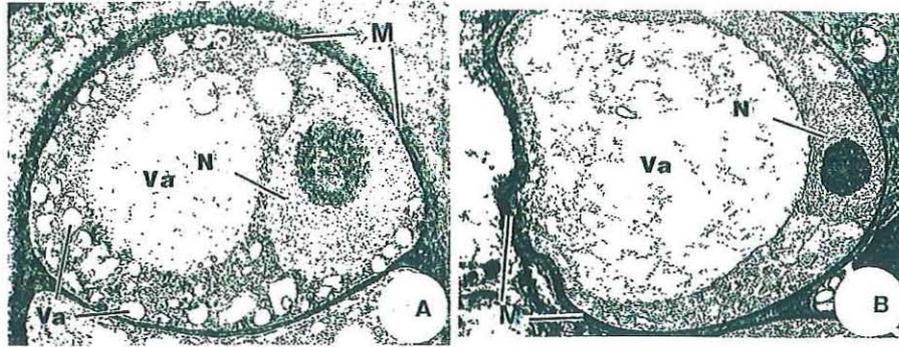
Les différentes étapes d'évolution des cellules parasitaires qu'on présente ensuite, sont basées sur les travaux référés dans le paragraphe précédent.

Dans les branchies des palourdes parasitées on trouve des nodules (Fig. 1) blancs constitués par des formes cellulaires qu'on appelle trophozoïtes. Cette phase - schizogonie - est la multiplication végétative des cellules, qui arrivent à détruire complètement les tissus de l'hôte.



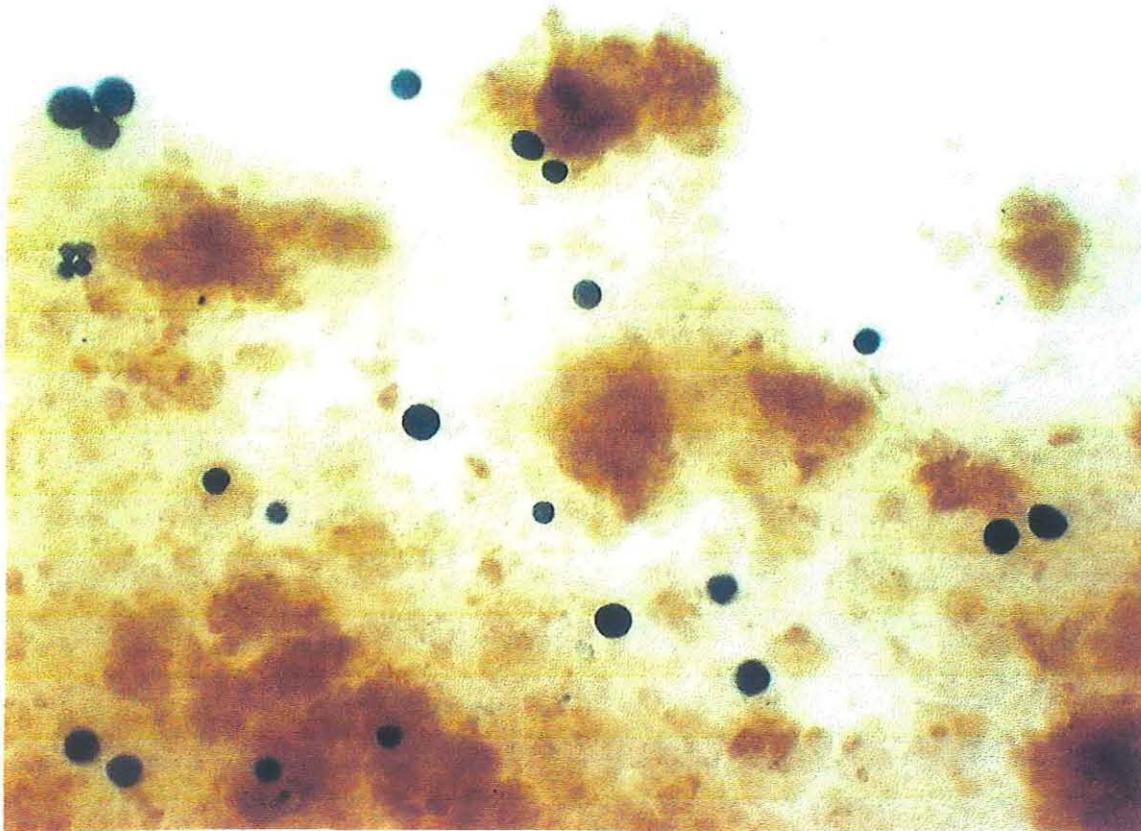
**Figure 1.** Aspect des branchies parasitées par *P. atlanticus*.

Les trophozoïtes sont des cellules sphériques de taille irrégulière (20 - 50  $\mu\text{m}$ ), relativement grandes par rapport aux cellules de la palourde; elles sont uninucléées et le cytoplasme est rempli de petites vacuoles qui évoluent vers une seule et grande vacuole; le noyau est excentré et il a un nucléole volumineux (Fig. 3). La membrane est protéique, épaisse et dense. Quand ils sont morts, les trophozoïtes ont une membrane cellulaire déformée et contient plusieurs gouttes lipidiques.



**Figure 2.** Aspect ultrastructural d'un trophozoïte jeune (A) et d'un trophozoïte plus développé (B) (x6000) (N - noyau; Va - vacuole; M - membrane) (*in Azevedo, 1989a*).

Ces formes cellulaires se développent et deviennent des prezoosporanges. *In vitro*, on peut cultiver les trophozoïtes et on peut observer les prezoosporanges, en les colorant au Lugol (Fig. 3).

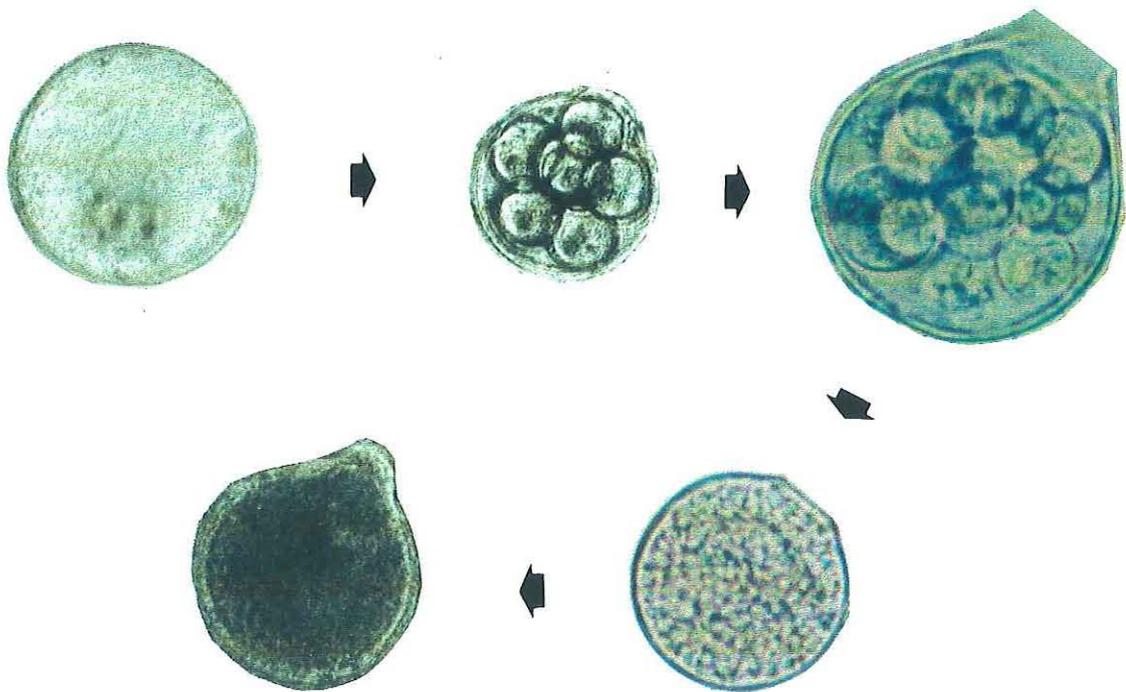


**Figure 3.** Coloration au Lugol des cellules parasitaires (stage prezoosporange), après culture en milieu thioglycolate (X200).

Depuis le premier jour en culture dans l'eau de mer, les prezoosporanges adhèrent au fond des boîtes et apparaissent les premières modifications intracellulaires; le noyau devient plus volumineux, la grande vacuole centrale commence à se fragmenter et, graduellement, le cytoplasme présente un aspect granulaire. Ces transformations sont caractéristiques de la deuxième étape du cycle de développement des *Perkinsus* - phase de croissance - pendant laquelle le diamètre des prezoosporanges varie entre 50 et 100  $\mu\text{m}$ .

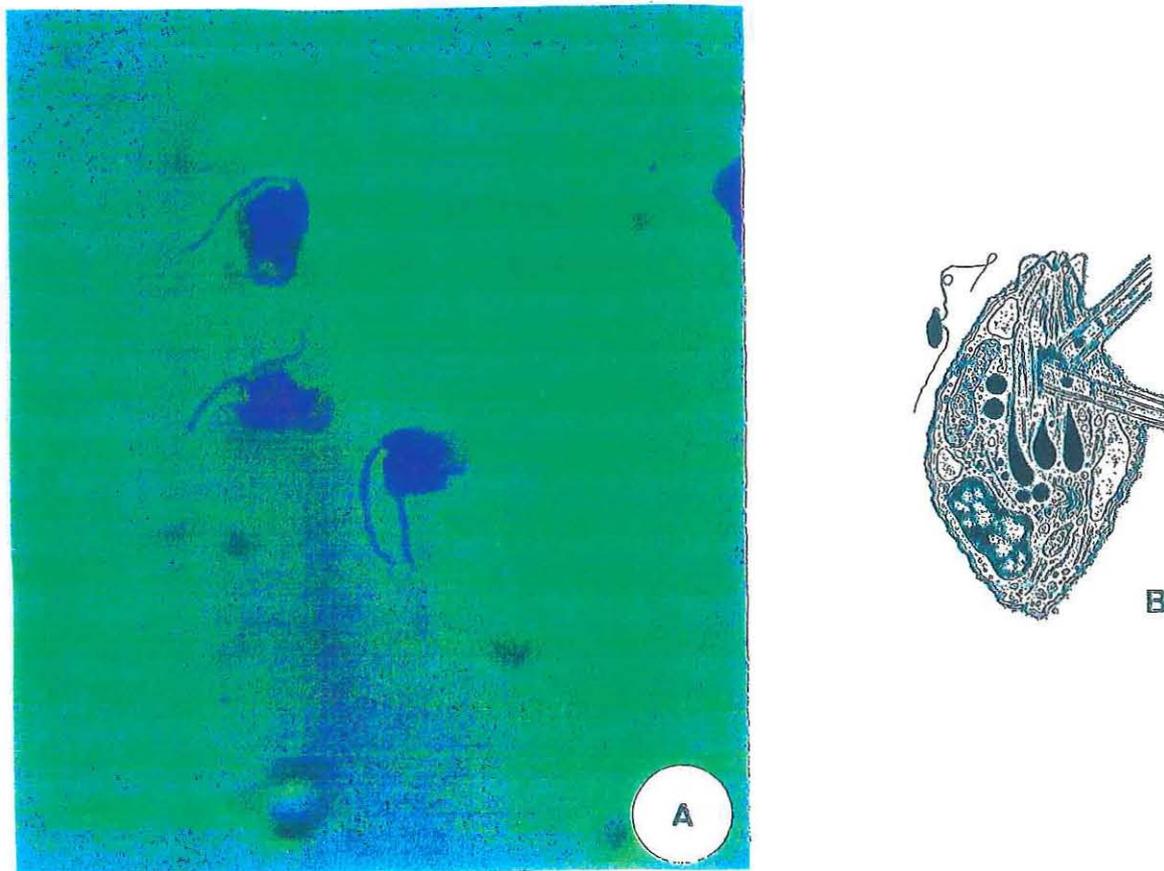
Le protoplasme se condense progressivement et, ensuite, commencent les divisions binaires qui conduisent aux stades de 2, 4, 8 et plus, cellules vacuolées, sphériques ou ovoïdes. Après ces successives karyocynèses et cytokynèses, est possible de voir des centaines de prezoospores. Pendant cette période (phase de zoosporulation), un tube de décharge se distingue dans la membrane du sporange; cet organe détermine et contrôle la libération des zoospores quand ceux-ci sont complètement mûrs.

Après 2 ou 3 jours d'incubation dans l'eau de mer, les cellules commencent le processus de maturation de la zoosporulation et, au bout d'une semaine environ, on peut voir les zoospores mobiles, qui se libèrent du zoosporange quand la membrane entre le sporange et le tube de décharge se casse (Fig. 4). Leur nombre est très variable et dépend de la taille des trophozoïtes desquels ils proviennent; ainsi, les trophozoïtes les plus petits (20  $\mu\text{m}$  de diamètre) produisent environ 1500 zoospores, tandis que des plus grandes peuvent produire 3000 zoospores.



**Figure 4.** Etapes du développement de *P. atlanticus* dès le stade de prezoosporange jusqu'à libération des zoospores (X200).

Les zoospores mûres libres (Fig. 5) ont 2 flagelles insérés latéralement dans la région sub-apicale, qui leurs donnent le mouvement circulaire caractéristique et très rapide. Le corps des zoospores a une forme elipsoïdale, avec environ 4,5  $\mu\text{m}$  de diamètre antéro-postérieur et 2,9  $\mu\text{m}$  de section transversale. Ces formes sont uninucléées, avec un noyau localisé dans l'extrémité latéro-basale et, dans la partie apicale, il y a le complexe apical qui caractérise le phylum Apicomplexa, constitué par un anneau polaire, micronèmes et microtubules sub-pelliculaires.



**Figure 5.** Aspect des zoospores libres (coloration TODA x1000) et représentation schématique d'un zoospore (in Azevedo, 1989a).

Vigario et Ruano (1991) suggèrent que sont les zoospores les formes infestantes, c'est à dire, sont ces formes mobiles qui infectent les animaux sains et réalisent la transmission de cette parasitose dans les sites de culture.

#### 4. Symptômes, lésions et réaction de la palourde à la Perkinsiose

Les palourdes, parasitées par *P. atlanticus*, ont leur capacité respiratoire réduite, car la surface disponible pour la respiration est inférieure à la normale (jusqu'à 60%) (Ruano, 1989); ainsi, au cours de cette maladie, on observe que les palourdes sont localisées entre le sédiment et l'eau pour essayer d'avoir une zone plus oxygénée (Ruano et Vigario, 1991) et aussi les valves un peu ouvertes dû à la relaxation des muscles adducteurs (Azevedo *et al.*, 1988)

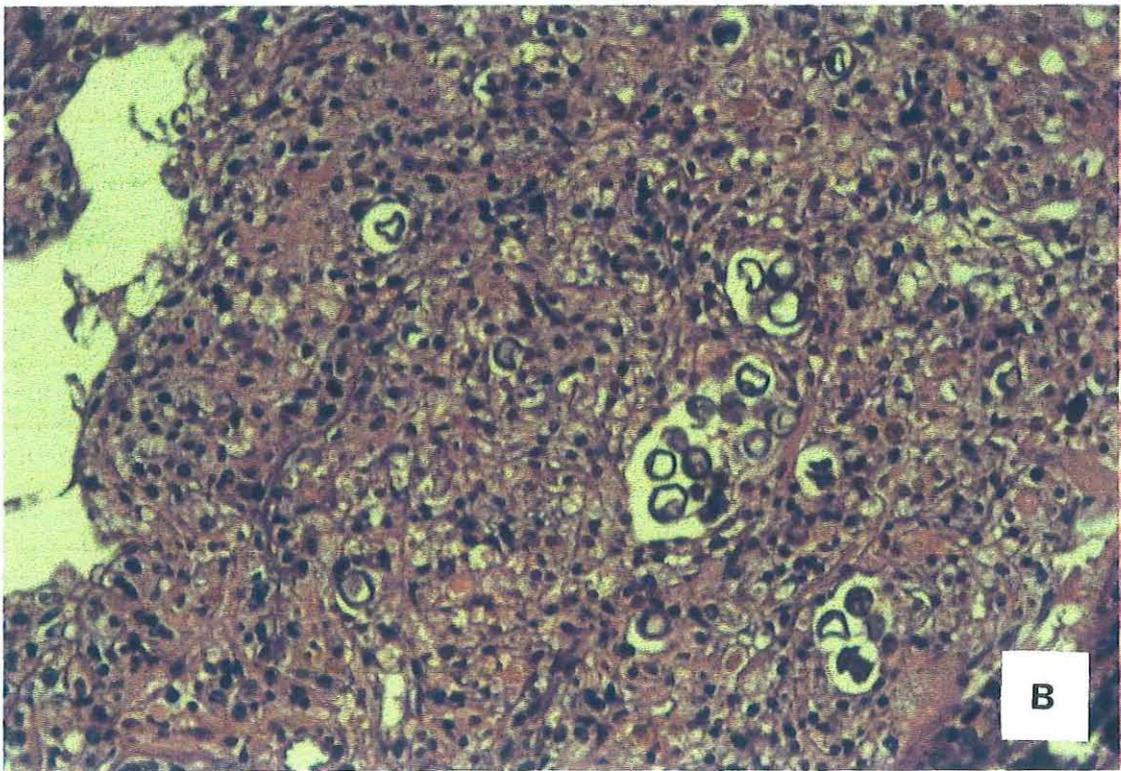
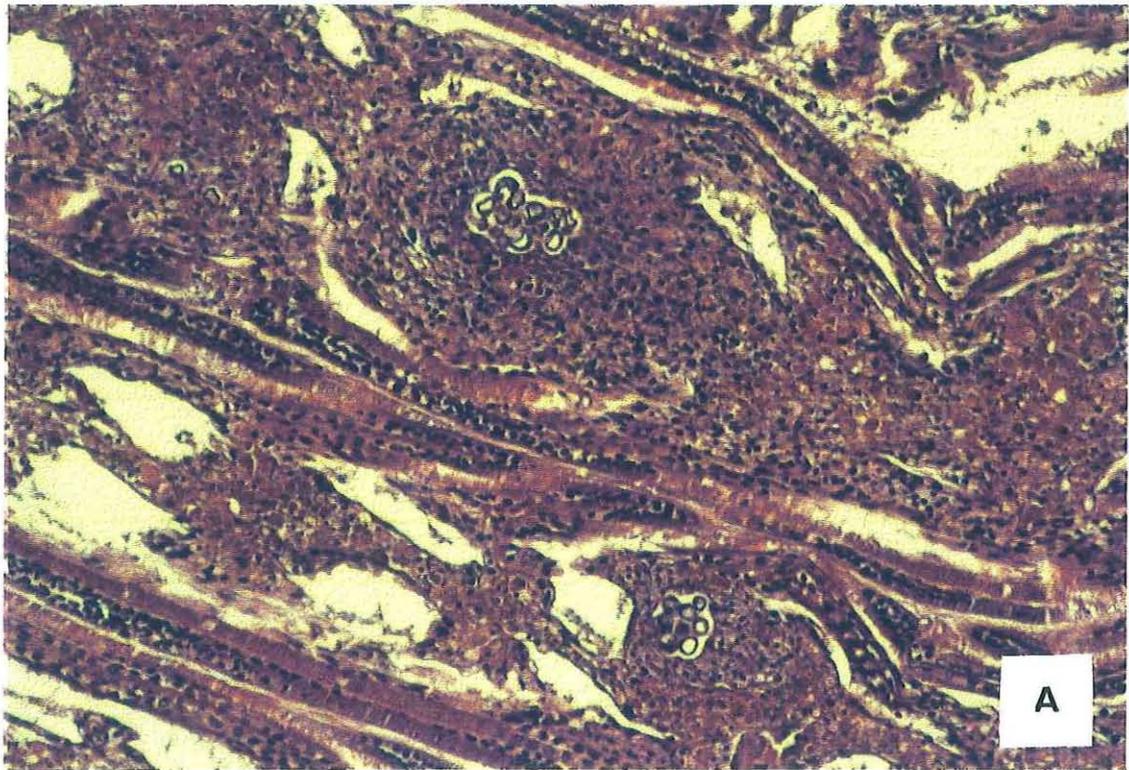
Les animaux parasités sont maigres et leur index de condition est faible. La chair a une couleur pâle et sa consistance est molle et aqueuse (Ruano et Vigario, 1991). En général, les branchies ont une coloration anormale, couleur châtaigne (Ruano et Cachola, 1986).

En plus, on peut vérifier, macroscopiquement, les nodules (kystes) blancs dans les branchies. En microscopie optique, on peut observer les trophozoïtes à l'état frais.

L'analyse ultrastructurale des tissus parasités et des tissus circonendants permet d'observer une grande désorganisation cellulaire, avec nombreuses structures de type lysosomal, qui donnent l'apparence autolytique aux cellules et déterminent, dans les cas plus graves, la nécrose cellulaire (Azevedo *et al.*, 1988). La lyse cellulaire et la rupture de l'épithélium branchial à côté des nodules parasitaires, sont des raisons importantes qui suggèrent une action directe du parasite (Azevedo, 1991).

L'organe cible de la perkinsiose est la branchie, mais, quand les palourdes sont fortement infectées, les parasites se trouvent aussi dans le manteau, rein, pied, gonades, intestin et glande digestive (Sagrìstà *et al.*, 1995).

D'après Ruano et Vigario (1991), pendant l'infestation de la palourde par *P. atlanticus*, on peut observer trois types de lésions caractéristiques: hémocytose, enkystement ou encapsulation et granulome (Fig. 6). Par contre, les différents types de lésions ont une incidence variable en fonction des différents organes; ainsi, les formations granulaires sont plus communes dans le tissu branchial, tandis que l'enkystement est plus fréquent dans la glande digestive. L'hémocytose apparaît très souvent, soit associée aux autres lésions soit isolée. Cependant, l'infiltration hémocytaire semble être la première réaction de l'hôte face à l'agent pathogène, même avant d'avoir une détection (visualisation) de quelque forme parasitaire (Ruano et Vigario, 1991).



**Figure 6.** Réaction de la palourde infecté par *P. atlanticus*; le stade observé est le stade trophozoïte (A - x200, B - x400).

### III. MATERIEL ET METHODES

#### 1. CULTURE ET PURIFICATION DE *Perkinsus atlanticus*

Des palourdes, *R. decussatus*, élevées au Portugal (Ria Formosa), fortement infectées par *P. atlanticus* ont été ouvertes et la chair broyée à l'ultra-turax. La chair a été incubée en milieu thioglycolate (20 ml / palourde) avec antibiotiques (Annexe I) pendant 3-4 jours à l'obscurité et à température ambiante.

Après cette période, pendant laquelle les trophozoïtes grossissent et se développent jusqu'au stade de pré-zoospore, les tissus ont été centrifugés (2500 tpm, 10 minutes) et le surnageant (milieu thioglycolate) jeté. Le culot a été ressuspendu dans l'eau de mer et filtré par un filtre de 250 µm et, ensuite, par un autre de 112 µm.

Le filtrat a été déposé et centrifugé (3500 tpm, 20 min, 8°C) sur un gradient de sucrose (10, 20, 30, 40, 50 e 60%) préparé avec d'eau de mer filtrée et 2.5% de Tween-80, ce qui permet d'éliminer une grande partie des débris et des microorganismes contaminants. L'interface, 30-40%, contenant les pré-zoosporanges a été prélevée et rincée dans l'eau de mer et centrifugée encore deux fois (2500 tpm, 10 min).

Ceux-ci ont été utilisés soit pour l'extraction d'ADN soit pour suivre la culture et obtenir des zoosporanges et ensuite des zoospores (formes libres du parasite).

La mise en culture a été réalisée dans l'eau de mer avec antibiotiques (Annexe II); les divisions binaires à l'intérieur de chaque pré-zoospore commencent dans 3-4 jours et les zoospores se libèrent depuis de 6-8 jours de culture.

#### 2. METHODES DE DIAGNOSTIC

Comme on a référé dans l'introduction, le principal objectif du travail réalisé était de comparer les différentes méthodes de diagnostic de la Perkinsiose chez la palourde; donc, on décrit chaque méthode testée et, aussi, on présente quelques commentaires et principes dont la validité affecte la précision des tests.

Le nombre d'individus de chaque échantillon était de 60; si on échantillonne au hasard dans une grande population infectée, le nombre d'individus infectés dans deux échantillons issus de cette population doit être proche si l'échantillon est suffisamment grand. On a comparé 2 échantillons dans une population infecté par des techniques différentes et on a calculé la probabilité que cette différence soit liée au hasard de l'échantillonnage; si cette probabilité est inférieure à 5%, la différence est significative.

### 2.1. **Frottis frais**

Le frottis frais de la lamelle branchiale est l'examen le plus simple qui permet la détection d'intensités d'infection moyennes et fortes de *Perkinsus*; les faibles infections sont difficilement trouvées par cette méthode.

On fait plusieurs appositions de branchie sur une lame de verre et on les laisse sécher à l'air. Après, on fait une coloration Hémacolor (kit Merck): méthanol, solution I, solution II (une minute dans chaque bain). Les lames sont rincées sous l'eau courante, séchées à l'air et une lamelle est montée avec de la résine Eukitt.

Le stage du cycle de développement du parasite qu'on observe est le trophozoïte, facilement identifié par sa forme typique de bague.

### 2.2. **Diagnostic quantitatif (culture totale de la palourde)**

Cette technique, décrite par Fisher et Olivier (1996) chez la huître, a été adaptée à la palourde, comme une méthode de quantification des cellules parasitaires existantes par gramme de poids humide de chair de palourde (estimation de l'intensité d'infection).

La culture de toute la palourde évite qu'on perde des parasites qui se trouvent dans les tissus non échantillonnés.

Tous les parasites, en différents stades, vont grossir, en présence du milieu thioglycolate, et devient assez grandes pour la détection visuelle. Par contre, ils ne se multiplient pas, ce qui nous permet de dire que le nombre de cellules trouvées c'est celui que la palourde avait initialement.

Le seul inconvénient de cette méthode c'est que la même palourde ne peut pas être utilisée par des autres techniques et, ainsi, comparer la sensibilité de la méthode. Cela était possible juste quand on a fait les différents diagnostics de la maladie en utilisant des palourdes de la même population et qui étaient entretenues sous les mêmes conditions.

Cette technique comprend 3 étapes:

i) *incubation en milieu thioglycolate*

On ouvre et vide la palourde, on sèche l'eau existant dans la cavité intervalvaire sur un papier absorbant et on pèse la chair. Celle-ci est broyée au ultra-turax et incubée en 20 ml de milieu thioglycolate. Le temps d'incubation est de 3 - 4 jours, à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après cette période de croissance des cellules, on centrifuge (2500 tpm, 10 min) et jète le surnageant (milieu).

ii) *traitement NaOH (lyse des tissus)*

La lyse est effectuée par l'hydroxide de sodium qui va digérer les tissus de la palourde; quelques parasites peuvent mourir, mais ils ne sont pas digérés.

On resuspend le culot dans 20 ml de NaOH (2 M) et on l'incube en bain-marie à 60°C pendant 1 à 3 heures, dépendant de la dégradation des tissus. Quand la solution devient plus transparente, on arrête la lyse: on centrifuge (2500 rpm, 10 min) et on jete le surnageant (NaOH). Pour enlever tout l'hydroxide de sodium, on rince 3 fois le culot dans 20 ml d'eau distillée (successives centrifugations et rejets du surnageant). Il n'y a pas d'études qui comparent la quantité de cellules comptées sans et avec la lyse des tissus, mais l'utilisation de la soude est importante, parce qu'elle permet de réduire les difficultés de lecture dues aux débris colorés.

### iii) coloration à la solution de Lugol et quantification

On resuspend le culot bien rincé dans 1 ml de solution de Lugol 4% (Annexe III) et on dépose un aliquot de 100 µl sur un filtre Millipore (mixed cellulose ester composition) de 0.22 µm de porosité. On compte toutes les cellules parasitaires (colorées de bleu-noir) au microscope optique (agrandissement: 100x), on multiplie par 10 (facteur de dilution) le nombre obtenu et on divise par le poids humide de chair pour obtenir l'intensité d'infection comme nombre de parasites par gramme de poids humide de tissu. Pour faciliter le traitement statistique des données, on peut faire le  $\text{Log}_{10}$ .

Ray (1952) affirme que la couleur blue des parasites exposés à la solution de Lugol c'est plus une réaction au glucoside de la membrane des cellules qu'une réaction à l'amidon.

Il y a quelques problèmes de précision avec cette coloration. Les parasites non colorés ou trop petits peuvent produire un comptage inférieur; par contre, on peut avoir une surestimation si on use une solution de Lugol très concentrée ou s'il y a d'autres cellules qui ont la même réaction à l'iode. Pour tester la spécificité de cette coloration par le *Perkinsus*, on a mis en culture en thioglycolate des animaux, a priori, indemnes (palourdes de La Seudre et d'Irlande, huîtres et moules) et aussi un concentré de phytoplancton. Toute la méthodologie a été répétée pour ces organismes. Fisher et Oliver (1996) disent que cette technique est spécifique pour *Perkinsus* au niveau du genre.

### 2.3. Culture des branchies

La culture des branchies est une autre méthode de diagnostic utilisée en routine, car la branchie est l'organe cible de ce parasite.

On fait la culture des branchies en milieu thioglycolate (10 ml / palourde) pendant 3 jours et on détecte les cellules parasitaires aussi par coloration au Lugol 50%; on ajoute quelques gouttes du colorant aux tissus fragmentés et on laisse agir pendant 5 minutes. On observe au microscope optique les cellules colorées de bleu-noir.

On peut dire que cette méthode est semi-quantitative, parce qu'on peut appliquer l'échelle de Mackin (pas d'infection = 0; faible infection = 1; infection moyenne = 3; fortement infectée = 5).

## 2.4. Histologie

Les palourdes ont été fixées pendant une semaine dans liquide de Davidson (Annexe IV), pour une bonne conservation de la structure des tissus.

Après la fixation, les tissus ont été déshydratés (Annexe V), inclus en parafine et coupés au microtome automatique (3 µm d'épaisseur). Les coupes ont été colorées à l'hématoxyline et éosine (Annexe VI) et les lamelles montées avec de la résine Eukitt.

Comme on fixe les tissus des palourdes vivantes ou moribondes, la plupart des cellules parasitaires qui se trouvent sont les trophozoïtes.

Cette technique est avantageuse si on veut observer la réaction de la palourde et déterminer à quel niveau les tissus sont abîmés, mais n'est pas une méthode de diagnostic très puissante, parce qu'il faudrait que l'intensité d'infection soit assez forte pour permettre de trouver des parasites et il faudrait aussi que les coupes touchent les tissus infectés.

## 2.5. Immunologie

On a récupéré des hybridomes préparés par Goggin (1991) contre les pré-zoosporanges et zoospores de *P. atlanticus*.

### 2.5.1. *Préparation des macrophages et décongélation des hybridomes*

Pour préparer la décongélation des hybridomes stockés dans l'azote liquide, on a préparé des boîtes de 6 puits et des fioles avec des macrophages qui ont la fonction de phagocyter les cellules mortes et les microorganismes éventuellement présents et métaboliser le milieu de culture. La méthode pour obtenir les macrophages est la suivante: des souris Balb/C sont tuées par asphyxie et la peau de l'abdomen est ouverte soigneusement sans léser le péritoine; puis on injecte dans la cavité abdominale 5 ml de milieu RPMI 1640 (Annexe VII) et on masse cette région pour la bien rincer. Ensuite, on aspire le liquide sans perforer les intestins et ce liquide est centrifugé (900 tpm, 10 min, 4°C) et le surnageant rejeté. On reprend le culot dans 10 ml de milieu RPMI, les cellules sont comptées (une souris permet d'obtenir entre 1.5 et 3x10<sup>6</sup> macrophages) et réparties dans des fioles, à raison de 3x10<sup>5</sup> cellules par fiole, 24 heures avant la culture des hybridomes et stockées dans une étuve à 37°C et 5-10% de CO<sub>2</sub>.

Juste avant la décongélation des hybridomes, le milieu de culture peut être éliminé par aspiration, parce que les macrophages sont activés et adhérents déjà au fond.

La décongélation des ampoules des hybridomes se fait rapidement à 37°C (bain-marie); la suspension des cellules est transvasée dans 15 ml de milieu et centrifugée pour éliminer la solution de conservation DMSO (Annexe VIII). Le culot de cellules est mis en suspension dans le milieu RPMI, puis mis en culture dans les fioles déjà préparés avec des macrophages.

La culture est faite en présence de CO<sub>2</sub> à 37°C et observée chaque jour au microscope à inversion.

### 2.5.2. Récupération des anticorps

Quand les cellules sont en phase de croissance plus active, on les résuspend et on transfère le contenu de chaque fiole vers un tube de centrifugation stérile; puis on centrifuge (900 tpm, 10 min, 4°C) et on stocke le surnageant au congélateur à -20°C. Les cellules (culot) sont remises en culture en milieu RPMI.

### 2.5.3. Immunofluorescence Indirecte

Les tests en immunofluorescence ont été effectués sur des cytocentrifugations (500 tpm, 60 sec) de suspensions de parasites, réalisées sur des lames histologiques préparées avec une goutte de poly-D-lysine 0.01%. On les a laissé sécher à l'air et, ensuite, on les a fixées par l'immersion en acétone pendant 10 minutes. Ces préparations ont été utilisées immédiatement ou conservées à -20°C.

Les lames ont été lavées deux fois 10 minutes en tampon phosphate (PBS 1x - Annexe IX) et saturées pendant une heure en Régilait (6%, préparé avec PBS) en chambre humide à température ambiante. Sans rincer, on a incubé le premier anticorps (1 heure) et une lame a été incubée avec du tampon, pour avoir un contrôle négatif. On a rincé trois fois 10 minutes en PBS et puis on a incubé encore une heure à l'abri de la lumière avec le deuxième anticorps (conjugué à la fluorescéine) dilué au 1/200 en PBS additionné de 2% de bleu d'Evans. On a rincé en PBS trois fois (cinq minutes) et on a monté les lames sous lamelle avec une goutte de glycérine tamponnée. L'observation a été réalisée au microscope à épifluorescence: le bleu d'Evans masque l'éventuelle fluorescence native des cellules et permet d'obtenir une coloration de fond rouge; la fluorescéine permet de visualiser la localisation de cellules marquées par les anticorps par une émission de fluorescence verte.

### 2.5.4. Immunopéroxydase

Cette méthode est similaire à l'immunofluorescence, sauf quelques étapes: avant la saturation en Régilait, on doit inhiber la peroxydase endogène, en utilisant un bain de méthanol et 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pur (15 minutes). Ensuite, on rince et on continue la saturation.

À la fin, après les rinçages, on fait la révélation: bain de PBS (100 ml) avec 60 mg de DAB et 30 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pendant 15 minutes à l'abri de la lumière et sous faible agitation. On rince encore 2 fois 5 minutes et on fait la contre-coloration: du bleu de Unna pur, d'eau avec une goutte de acide acétique, alcool 95°, alcool 100° et xylène (5 bains successifs de quelques secondes).

Les lamelles sont montées avec de la résine Eukitt.

Le bleu de Unna permet colorer les cellules non marquées pour obtenir un meilleur contraste avec les cellules marquées à la peroxydase (couleur brun).

## 2.6. Extraction d'ADN de *Perkinsus atlanticus*

Comme la membrane des cellules de *Perkinsus*, après culture en thioglycolate, devient plus épaisse, l'étape de lyse de la méthode ordinaire d'extraction d'ADN n'est pas assez puissante, en général, pour exposer les brins d'ADN. Pour cette raison, on congèle et décongèle successivement les cellules parasitaires, en les observant au microscope, car, si on les abîme trop, on risque de casser aussi les molécules d'ADN génomique.

Le culot de cellules est ensuite ressuspendu dans du tampon d'extraction (Annexe X), auquel on ajoute 0,5 mg/ml de protéinase K; on laisse digérer pendant une nuit à 37°C.

Après, on extrait les protéines par addition d'un volume de phénol, puis on mélange et on ajoute un volume de chloroforme/alcool isoamilique (24/1). Centrifuger (4000 tpm, 10 min, 4°C).

On prélève la phase supérieure et on précipite l'ADN contenu dans cette phase en y ajoutant ½ volume de acétate d'ammonium 3M et 2 volumes d'éthanol absolu; on laisse à -20°C pendant 1 heure et, ensuite, on centrifuge (13000 tpm, 15 min, 4°C) et on élimine le surnageant.

On rince le culot par l'addition d'éthanol 70% et on centrifuge (13000 tpm, 10 min, 4°C); après, on doit éliminer totalement le surnageant et sécher le culot sous vide (15 minutes).

Le culot (acides nucléiques) est ressuspendu dans de l'eau bidistillée Millipore.

Si nécessaire, les ARN contaminant la solution peuvent être éliminés par ajout de RNase (10 mg/ml) et incubation pendant une heure à 37°C. Ensuite on refait une extraction phénol / chloroforme, suivie de l'étape précipitation.

## IV. RESULTATS

### 1. Mettre au point la quantification avec solution de Lugol

La méthode qui permet de quantifier le nombre de cellules a été comparée en utilisant deux concentrations différentes (4% et 30%) (Fisher et Olivier, 1996) et on a vérifié que le nombre de cellules comptées augmente quand on utilise le Lugol plus concentré.

On a trouvé des résultats significativement différents ( $t/E/ = 3.5$ ) avec un test de comparaison de deux séries appariées avec  $\alpha = 0.05$ . On a choisi la concentration 4% pour la suite du travail, parce que en observant des filtres colorés uniquement avec une goutte de solution de Lugol plus concentré, on a trouvé des formes qui semblaient à *Perkinsus*; ainsi, on aurait un erreur du nombre de cellules comptées. La concentration de 4% est aussi la concentration conseillé par Fisher et Olivier (1996).

### 2. Comparaison des différentes techniques sur les animaux d'Algarve (lot considéré comme infecté)

Des palourdes d'un même lot provenant d'Algarve, zone où s'observent des grandes mortalités dues à *Perkinsus atlanticus* depuis quelques années, ont été soumis aux différents tests, dont les résultats sont les suivants:

**Tableau 1.** Nombres et pourcentages de palourdes sans *P. atlanticus* (-), faiblement infectées (+), moyennement infectées (++) et très infectées, selon les différentes techniques de diagnostic

	-		+		++		+++	
	+ / total	%						
<b>Culture de tous les tissus</b>	3/60	5.0	22/60	36.7	19/60	31.7	16/60	26.6
<b>Culture des branchies</b>	12/60	20.0	28/60	46.7	17/60	28.3	3/60	5.0
<b>Histologie</b>	43/60	71.7	12/60	20.0	5/60	8.3	0/60	0

On a comparé les méthodes par tests de comparaison de fréquences et on a trouvé des différences significatives avec  $\alpha = 0.05$  entre les pourcentages d'histologie / culture des branchies ( $t/E/$

= 3.84) et histologie / culture total ( $I\epsilon I = 4.65$ ). La différence entre la culture des branchies et la culture totale n'est pas significative, avec  $\alpha = 0.05$  ( $I\epsilon I = 0.8$ ).

La méthode qui consiste à cultiver toute la palourde en milieu thioglycolate est celle qui permet de trouver plus de résultats positifs; l'histologie présente un nombre considérable de réponses négatives par rapport aux autres tests.

Rodriguez et Navas (1995) ont vérifié aussi que l'analyse des coupes histologiques présente comme résultats 60% de faux négatifs, ce qui les conduit à affirmer que l'histologie n'est pas une bonne méthode pour le diagnostic de *Perkinsus*; par contre, est très utile pour observer les réactions de l'hôte et pour préciser la répartition du parasite dans les différents tissus.

### **3. Comparaison des différentes techniques sur les animaux d'Irlande (lot considéré comme indemne)**

Sur le lot indemne, on a trouvé 3 palourdes positives sur 60 (5%). Toutefois, l'intensité d'infection était très faible: une palourde avait une cellule colorée au Lugol et les deux autres n'avaient qu'une cellule chacune. On essaye donc de voir si, en augmentant le seuil de positivité, on peut trouver des résultats négatifs en ne perdant pas la capacité de détection. On part de l'hypothèse que ces palourdes sont effectivement seines, parce que des nombreuses analyses ont été réalisées en histologie et jusqu'à ce jour elles n'ont pas permis de détecter le parasite.

Il fallait comparer nous mêmes ces résultats avec une autre technique, comme l'histologie, mais ça n'a pas été possible. Pourtant, cette partie du travail sera faite, si on veut confirmer que cette technique est efficace sur un lot présumé indemne.

### **4. Choix d'une valeur seuil**

Comme on considère donc que les positifs du lot d'Irlande sont des faux positifs, la démarche du travail a été trouver une valeur seuil qui nous permet d'obtenir le meilleur compromis entre les faux positifs et faux négatifs; on a utilisé les résultats de la culture totale des palourdes du lot considéré comme contaminé (Algarve) et du lot considéré comme indemne (Irlande) (Fig. 7).

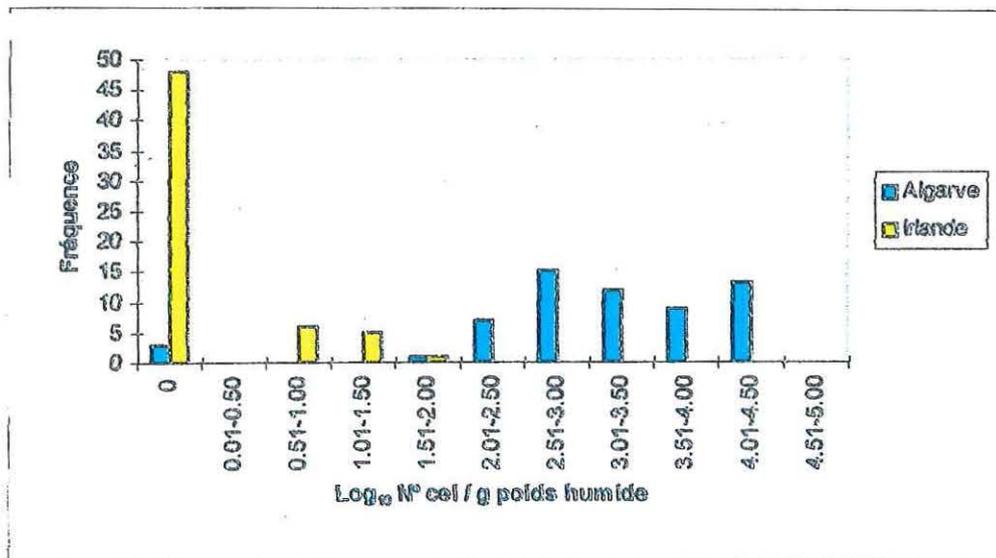


Figure 7. Fréquence de cellules parasitaires des palourdes d'Irlande et d'Algarve

On a fait aussi une représentation graphique pour minimiser le nombre de faux positifs et des faux négatifs qui est le point qui se trouve le plus au nord-est (Fig. 8). On peut observer que la valeur que minimise le taux de faux positifs et de faux négatifs est 1+ .

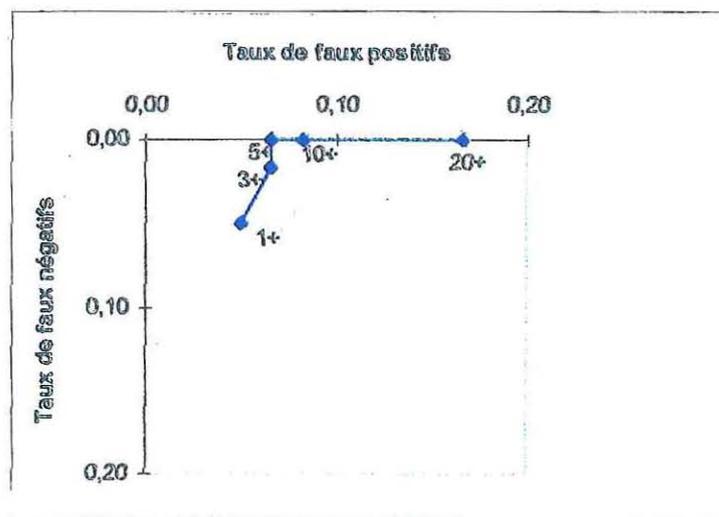


Figure 8. Courbe ROC, pour détermination de la valeur seuil

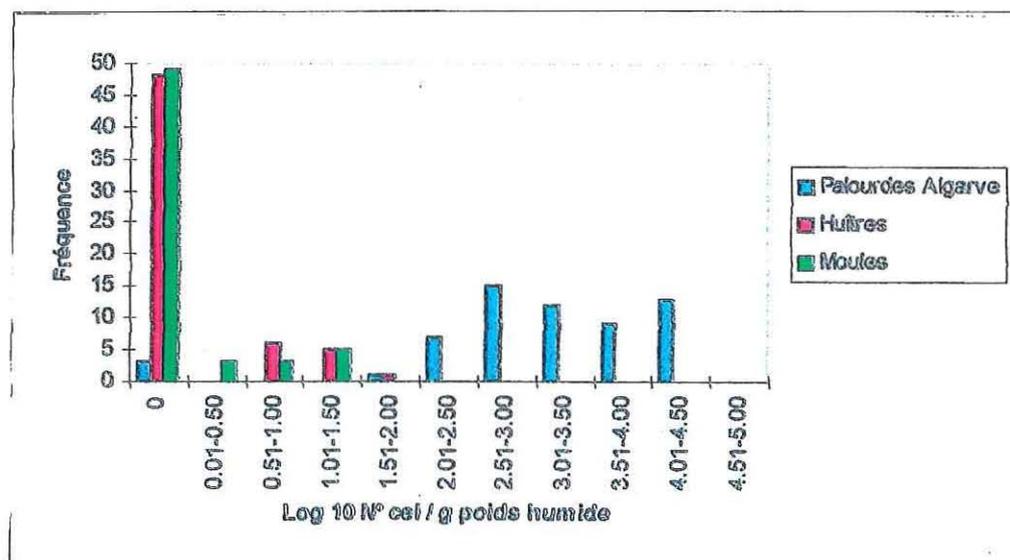
En appliquant cette valeur théorique, on peut considérer que les palourdes qui ont seulement une cellule colorée au Lugol sont négatives et celles qui ont 2 ou plus sont positives. Ainsi, il reste encore une palourde positive sur les 60 testées du lot d'Irlande.

Le seuil pourrait être arbitrairement placé à 10+ pour satisfaire l'hypothèse des faux positifs. Toutefois, pour vérifier l'existence de faux positifs ou la présence réelle de *P. atlanticus* sur ce lot, ont a

éssaié d'autres techniques - immunologie et extraction d'ADN pour faire une sonde moleculaire - mais on a pas réussi a obtenir des résultats. On a utilisé des anticorps produits il y a 5 ans et, peut être pour cette raison, de qualité inférieure. Quant à l'amplification de l'ADN, on a utilisé des amorces dessinées à partir du travail de Goggin (1991), des amorces préparées par Robledo pour *P. marinus* et des amorces universelles dessinés par Medlin. Une équipe de travail à l'Université de Montpellier (Dr. Romestand) qui a déjà produit un anticorps polyclonal contre *P. marinus* et qui marque aussi *P. atlanticus* et une équipe à Vigo (Dr. Figueras) essaye d'avoir des amorces pour l'amplification d'ADN de *P. atlanticus*. Dès que possible, on espère utiliser ces informations pour éliminer les doutes qui subsistent à propos des faux positifs.

### 5. Spécificité de la coloration au Lugol

On a aussi testé la même méthode sur d'autres espèces de mollusques non sensibles à *P. atlanticus* (60 huîtres et 60 moules) de La Tremblade pour essayer de comprendre quel est la nature des faux positifs (cellules de l'hôte, algues ou autres microorganismes) (Fig. 9).



**Figure 9.** Comparaison entre les résultats de la fréquence de cellules colorés au Lugol, existants sur les huîtres et les moules et la population de palourdes infectées.

Pour ces espèces, on a trouvé des résultats positifs, même si le nombre de cellules obtenu est, en moyenne, plus faible que pour les palourdes d'Algarve.

Comme on avait encore des doutes on a répété la méthode sur un échantillon de phytoplancton de Bouée d'Auger et on a trouvé 40 cellules colorées au Lugol dans 1 litre d'eau de mer qui contenait 121000 cellules (102000 diatomées, 5500 dinoflagellés et 13500 phytoflagellés divers). Avec ces résultats positifs, on peut faire l'hypothèse que une partie des faux positifs peut être justifiée, parce que *Perkinsus* est phylogénétiquement proche des dinoflagellés. Mais il reste aussi des problèmes: la

composition et la quantité du phytoplancton varient pendant l'année et géographiquement, ce qui rend difficile la validation de la méthode, sans tenir compte de ce facteur.

## 6. Application sur le lot de La Tremblade

On a répété aussi la méthode avec une autre population de palourdes (60 palourdes de La Tremblade) et le test de fréquences indique que la différence entre les deux populations est significative: Palourdes La Tremblade (13/44) / Palourdes Algarve (57/60)  $\rightarrow I/\varepsilon = 7.04$

Avec le seuil défini précédemment par la courbe ROC, il reste 9 palourdes (20.5%) qui ont des réponses positives et qu'on compte comme infectées.

On considère donc que ce lot est infecté mais avec une intensité plus faible que le lot d'Algarve. De plus, un contrôle, frottis frais, a permis de confirmer la présence du parasite dans ce lot.

On a fait l'histologie sur ces palourdes et tous les résultats ont été négatifs. Encore une fois, on peut dire que l'histologie n'est pas une méthode sensible pour détecter cette maladie.

## V. DISCUSSION

Pour une population infectée, la technique quantitative de culture de tous les tissus de la palourde donne le meilleur résultat, c'est à dire, permet de trouver plus d'individus infectés. On peut espérer qu'elle a une bonne sensibilité.

Par contre, l'analyse des résultats conduit à quelques considérations sur cette méthode:

- a) les animaux dits indemnes (lot d'Irlande) donnent des résultats positifs, même s'ils sont extrêmement faibles.
- b) chez d'autres espèces qui ne sont pas espèces cibles de *P. atlanticus* on obtient aussi des résultats positifs;
- c) il y a une réponse positive en utilisant un échantillon de phytoplancton;

Ainsi, pour mieux utiliser cette méthode, il faudrait répéter la technique sur d'autres lots, à différents niveaux d'infestation, à différentes périodes de l'année et à autres endroits.

Il faudrait aussi disposer de réactifs spécifiques tels que immunologie et/ou sondes génomiques pour comparer les méthodes et résoudre le problème des faux positifs.

Pour les palourdes de La Tremblade ont a trouvé des résultats positifs qui ne sont pas éliminés en corrigeant avec la valeur seuil. Cette région était reconnue comme indemne (Goggin, 1991), mais ces résultats, et surtout la visualisation directe du parasite, nous permettent de dire que la maladie est déjà installée dans cette zone, mais ne provoque pas des problèmes de mortalité.

Cette technique quantitative est intéressante et prometteuse, mais on doit tenir compte que cette étude est préliminaire et il y a nécessité de le compléter pour pouvoir éventuellement le valider.

## VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Almeida, M. (1995). Estudo da patogenia de *Perkinsus atlanticus* AZEVEDO, 1989 (Apicomplexa, Perkinsea), em função da variação do tipo de sedimento e da carga animal, na ameijoia boa *Ruditapes decussatus* LINNAEUS, 1758. *Relatorio de estagio*, Universidade do Algarve, 57 p.
- Auzoux-Bordenave, S., Vigarrio, A.M., Ruano, F., Doumart-Coulon, I. et Doumenc, D. (1995). *In vitro* sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *Journal of Shellfish Research*, **14(2)**: 469-475.
- Azevedo, C. (1989a). Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *Journal of Parasitology*, **75 (4)**: 627-635.
- Azevedo, C. (1989b). *Perkinsus atlanticus* - nova espécie protoparasita da ameijoia *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Pesca e Navegação*, **93**: 8-10.
- Azevedo, C. (1991). Estudo comparativo ultrastrutural e *in vitro* do ciclo de vida de *Perkinsus atlanticus* (Phylum Apicomplexa), parasita da ameijoia boa do Algarve. *Seminario sobre Aquacultura Mediterrânica '91*, **19**: 353-363.
- Azevedo, C., Corral, L. et Cachola, R. (1988). Estudo ultrastrutural de protozooses da fauna da Ria Formosa. *5º Congresso do Algarve*, **1**: 531-536.
- Burreson, E.M., Alvarez, R.S., Martinez, V.V. et Macedo, L.A. (1994). *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tabasco, Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, **20**: 77-82.
- Ceschia, G., Zentilin, A. et Giorgetti, G. (1991). Occurrence of *Perkinsus* in clams (*Ruditapes philippinarum*) farmed in Northeast Italy. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica.*, **5**, 101-108.
- Chagot, D., Comps, M., Boulo, V., Ruano, F. et Grizel, H. (1986). Etude histopathologique d'une réaction cellulaire chez *Ruditapes decussatus* infecté par un protozoaire. *2nd Intern. Colloq. Pathol. Marine Aquac.*, 37-38.
- Code OIE (1995). Code Sanitaire International pour les Animaux Aquatiques. Office International des Epizooties. Organisation Mondiale de la Santé Animale. Titre 2.2. Maladie des mollusques: 83-107.
- Craig, A., Powell, E.N., Fay, R.R. et Brooks, J.M. (1989). Distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf Coast oyster populations. *Estuaries*, **12(2)**: 82-91.
- DaRos, L. et Canzonier, W.J. (1986). *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the mediterranean basin. Pathology in Marine Aquaculture - *European Aquaculture Society, special publication*, n°9.
- Dear, G. (1989). Methods for sampling fish and shellfish. In: Austin, B. et Austin, D.A. eds., *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*, 25-27.
- Dungan, C.F. et Roberson, B.S. (1993). Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Dis. Aquat. Org.*, **15**: 9-22.
- Figueras, A., Robledo, J.A. et Novoa, B. (1992). Occurrence of Haplosporidian and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), of the Ria de Vigo (Galicia, NW Spain). *Journal of Shellfish Reseach*, **11(2)**: 377-382.

- Fisher, W.S., Gauthier, J.D. et Winstead, J.T. (1992). Infection intensity of *Perkinsus marinus* diseases in *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) from the Gulf of Mexico maintained under different laboratory conditions. *Journal of Shellfish Research*, **11(2)**: 363-369.
- Fisher, W.S. et Olivier, L.M. (1996). A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *Journal of Shellfish Research*, **15(1)**: 109-117.
- Goggin, C.L. (1991). Studies on *Perkinsus atlanticus* (Protozoa, Apicomplexa) from *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia) in France. *Rapport de stage*, IFREMER, 19 p.
- Goggin, C.L. (1994). Variation in the two internal transcribed spacers and 5.8S ribosomal RNA from five isolates of the marine parasite *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa). *Molecular and Biochemical Parasitology*, **65**: 179-182.
- Goggin, C.L. (1996). Effect of *Perkinsus olseni* (Protozoa, Apicomplexa) on the weight of *Tridacna crocea* (Mollusca, Bivalvia) from Lizard Island, Great Barrier Reef. *Aquaculture*, **141**: 25-30.
- Goggin, C.L. et Barker, S.C. (1993). Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **60**: 65-70.
- Goggin, C.L. et Lester, R.J.G. (1987). Occurrence of *Perkinsus* species (Protozoa, Apicomplexa) in bivalves from the Great Barrier Reef. *Diseases of Aquatic Organisms*, **3**: 113-117.
- Goggin, C.L. et Lester, R.J.G. (1995). *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Mar. Freshwater Res.*, **46**: 639-646.
- Goggin, C.L., McGladdery, S.E., Whyte, S.K. et Cawthorn, R.J. (1996). An assessment of lesions in bay scallops *Argopecten irradians* attributed to *Perkinsus karlssoni* (Protozoa, Apicomplexa). *Diseases of Aquatic Organisms*, **24**: 77-80.
- Goggin, C.L., Sewell, K.B. et Lester, R.J.G. (1989). Cross-infection experiments with Australian *Perkinsus* species. *Diseases of Aquatic Organisms*, **7**: 55-59.
- Levine, N.D. (1978). *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum APicomplexa. *Journal of Parasitology*, **64(3)**: 549.
- Marsh, A.G. et Vasta, G.R. (1995). Parasite-specific PCR amplification of an intergenic mtDNA domain of *Perkinsus marinus* in oyster hemolymph: a rapid and sensitive assay for infection screening. *Journal of Shellfish Research*, **14**: 271.
- McGladdery, S.E., Bradford, B.C. et Scarratt, D.J. (1993). Investigations into the transmission of parasites of the bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819), during quarantine introduction to Canadian waters. *Journal of Shellfish Research*, **12**: 49-58.
- McGladdery, S.E., Cawthorn, R.J. et Bradford, B.C. (1991). *Perkinsus karlssoni* n.sp. (Apicomplexa) in bay scallops *Argopecten irradians*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **10(2)**: 127-137.
- Navas, J.I., Castillo, M.C.; Vera, P. et Ruiz-Rico, M. (1992). Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (SW Spain). *Aquaculture*, **107(2-3)**: 193-199.
- Perkins, F.O. (1986). Shellfish parasites. *Parasitology Today*, **2(3)**: 55-57.
- Perkins, F.O. (1988). Structure of protistan parasites found in bivalve molluscs. *American Fisheries Society, special publication*, **18**: 93-111.

- Perkins, F.O. (1993). Infectious diseases of molluscs. In: Couch, J.A. et Fournie, J.W., eds., *Pathobiology of marine and estuarine organisms*, 255-287.
- Ray, S.M. (1996). Historical perspective on *Perkinsus marinus* disease of oysters in the Gulf of Mexico. *Journal of Shellfish Research*, **15(1)**: 9-11.
- Rodriguez, F., Godoy, T. et Navas, J.I. (1994). Cross-infection with *Perkinsus atlanticus* in *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum* and *Venerupis pullastra*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **14(1)**: 24-27.
- Rodriguez, F. et Navas, J.I. (1995). A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). *Aquaculture*, **132**: 145-152.
- Ruano, F. (1989). Agentes patogénicos da ameijoia boa (*Ruditapes decussata*) em populações cultivadas no litoral algarvio. *Seminário Aquacultura em Portugal*.
- Ruano, F. et Cachola, R. (1986). Outbreak of a severe epizootics of *Perkinsus marinus* (Levin, 78) at Ria de Faro clam's culture beds. *2<sup>nd</sup> Intern. Colloq. Pathol. Marine Aquac.*, 41-42.
- Ruano, F. et Vigario, A.M. (1991). Patologia da perkinsiose na ameijoia boa *Ruditapes decussatus*. *Seminário sobre Aquacultura Mediterrânica '91*, **19**: 365-372.
- Sagrìstà, E., Durfort, M. et Azevedo, C. (1995). *Perkinsus* sp. (Phylum Apicomplexa) in Mediterranean clam *Ruditapes semidecussatus*: ultrastructure observations of the cellular response of the host. *Aquaculture*, **132**: 153-160.
- Sindermann, C.J. (1990). *Principal diseases of marine fish and shellfish*. Vol.2, Academic Press, Inc.
- Sindermann, C.J. et Rosenfield, A. (1967). Principal diseases of commercially important marine bivalve mollusca and crustacea. *Fishery Bulletin*, **66(2)**: 335-369.
- Vigario, A.M. et Ruano, F. (1991). Influencia de diferentes factores ambientais no desenvolvimento *in vitro* do agente patogenico *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Seminário sobre Aquacultura Mediterrânica '91*, **19**: 407-412.
- Vilela, H. (1951). Sporozoaires parasites de la palourde, *Tapes decussatus* (L.). *Revista FCL - 2<sup>o</sup> série*, **C 1(2)**: 379-389.
- Wilson, E.A., Powell, E.N., Craig, M.A., Wade, T.L. et Brooks, J.M. (1990). The distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf Coast oysters: its relationship with temperature, reproduction, and pollutant body burden. *Int. Rev. Gesamt. Hydrobiol.*, **75(4)**: 533-550.

# ANNEXES

♦ **Annexe I - Composition du milieu thioglycolate**

- Thioglycolate déshydraté avec dextrose (DIFCO) ..... 14,6 g
- NaCl ..... 10,0 g
- Eau distillée ..... 485 ml

Faire bouillir sous agitation; autoclaver (20 min, 120°C); laisser refroidir et ajouter les antibiotiques: 500 U/ml de pénicilline G et 500 µg/ml de streptomycine sulfate (ou 10 ml de suspension de cloramphenicol 2.5%).

♦ **Annexe II - Solution de culture des zoospores**

- Pénicilline ..... 0,1 g/l
- Streptomycine sulfate ..... 0,1 g/l
- Solution de Nystatine (4000 U/ml) ..... 13 ml/l

♦ **Annexe III - Solution de Lugol**

- Potassium iodide ..... 6.0 g
- Iode ..... 4.0 g
- Eau distillée ..... 100 ml

La solution de travail est diluée à 4%.

♦ **Annexe IV - Liquide de Davidson**

- Eau de mer ..... 1200 ml
- Alcool 95° ..... 1200 ml
- Formaldehyde à 38% ..... 300 ml
- Glycérol ..... 400 ml
- Acide acétique ..... 10%

♦ **Annexe V** - Séquence de déshydratation automatique

1. RAS
2. RAS
3. Alcool 95° - 30 minutes
4. Alcool 95° - 30 minutes
5. Alcool 100° - 30 minutes
6. Alcool 100° - 30 minutes
7. Alcool 100° - 1 heure
8. Xylène - 30 minutes
9. Xylène - 1 heure
10. Xylène - 1 heure (ou jusqu'à l'inclusion en paraffine)

♦ **Annexe VI** - Séquence de coloration Hématoxyline / éosine

1. Xylène - 30 min
2. Xylène - 30 min
3. Ethanol absolu - 15 min
4. Ethanol absolu - 15 min
5. Eau courante - 10 min
6. Hématoxyline - 1 min 30 s
7. Eau courante - 5 min
8. Eosine - 3 min 30 s
9. Eau courante - 1 min
10. Ethanol absolu - 1 min
11. Ethanol absolu - 1 min
12. Ethanol absolu - 1 min
13. Xylène - 10 min
14. Xylène - 10 min

⇒ Composition des colorants:

♦ **Hématoxyline:**

- Hématoxyline .....	4 g
- Alcool 95° .....	200 ml
- Potassium aluminium sulfate .....	11 g
- Eau distillée .....	200 ml
- Glycérol .....	200 ml
- Acide acétique .....	20 ml
- Iodate de potassium .....	0.8 g *

(\* ou 4.07 g de KMnO)

Dissoudre l'hématoxyline dans l'alcool;

Dissoudre le potassium aluminium sulfate dans l'eau distillée;

Mélanger des 2 solutions e ajouter les autres réactifs sous l'ordre indiqué.

◇ **Eosine:**

- Eosine ..... 2.5 g
- Eau courante ..... 250 ml

◆ **Annexe VII - Milieu RPMI 1640**

- Milieu RPMI w/ L-glutamine, w/o NaHCO<sub>3</sub> ..... 10.43 g
- Bicarbonate de sodium ..... 2.0 g
- Eau bi-distillée ..... 1000 ml

Dissoudre bien le milieu thioglycolate et le bicarbonate de sodium, en agitant pendant 2 heures minimum; ajuster le pH, en additionnant CO<sub>2</sub> pendant 1 minute (la couleur doit changer de rose vers rouge orangé).

Filtrer avec un filtre stérile de 0,22 µm, dans la hotte.

Incuber dans l'étuve à 37°C pendant 36 heures pour vérifier s'il y a de contamination par bactéries. Conserver à 4°C.

Avant l'utilisation, additionner, à 500 ml de milieu, 200 µl de solution d'antibiotiques et 10% (50 ml) de sérum de veau fœtal décomplémenté.

Solution d'antibiotiques:

- Pénicilline G ..... 300 mg
- Streptomycine sulfate ..... 500 mg
- Eau distillée ..... 10 ml

◆ **Annexe VIII - Solution DMSO**

- - DMSO ..... 7.5%
- - Sérum de veau fœtal ..... 92.5%

Pour chaque ampoule: 1 ml de cette solution de DMSO: 75µl DMSO + 925 µl SVF

♦ **Annexe IX - Tampon phosphate (PBS 1x)**

- NaCl ..... 9 g/l
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydre ..... 1,48 g/l
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 0,43 g/l

♦ **Annexe X - Tampon d'extraction**

- TRIS 50 mM ..... 10 ml
- EDTA 5 mM ..... 2 ml
- NaCl 100 mM ..... 4 ml
- Eau distillée ..... compléter 200 ml
- SDS ..... 10%