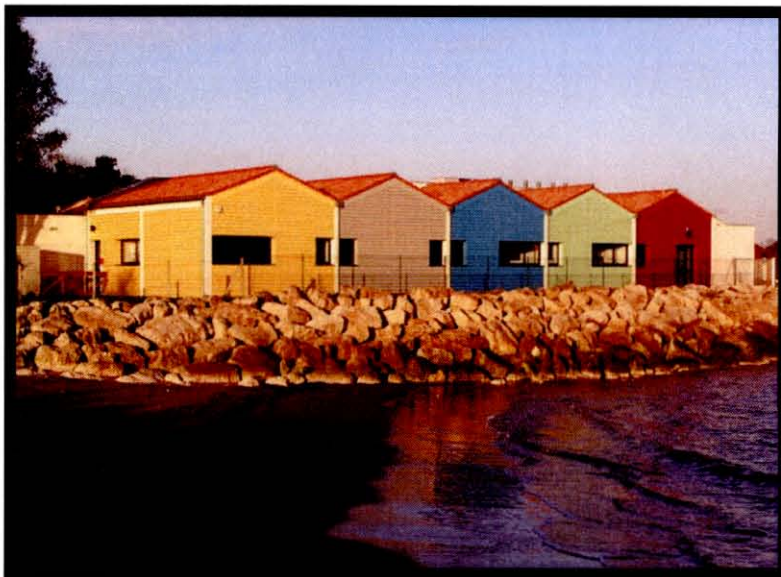
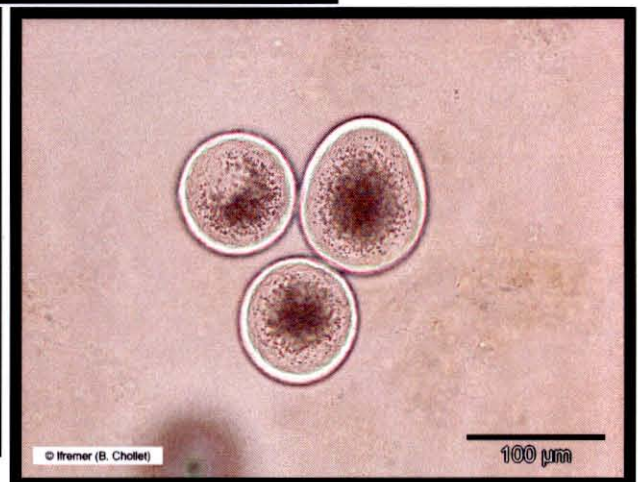


**Caractérisation moléculaire du parasite du genre
Perkinsus infectant les palourdes en France et étude du
polymorphisme génétique en fonction de son origine
géographique**



IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADÉ



Justine MICHEL
Responsable du laboratoire: Tristan Renault
Maître de stage: Isabelle Arzul

IFREMER
Laboratoire de Génétique et Pathologie
Av. de Mus du Loup
17390 La Tremblade

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 03841

Sommaire

I. INTRODUCTION	3
II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	4
A. LES PALOURDES.....	4
B. LA PERKINSE DE LA PALOURDE	4
1. <i>Etiologie</i>	4
2. <i>Epidémiologie</i>	5
a) Hôtes et répartition géographique.....	5
b) Transmission	6
3. <i>Effet sur l'hôte</i>	6
4. <i>Diagnostic</i>	7
a) Culture dans un milieu liquide au thioglycollate	7
b) Histologie	7
c) Techniques moléculaires	8
C. LE SUIVI DE LA PERKINSE DANS LE CADRE DU RESEAU REPAMO (2004-2005).....	9
III. MATERIEL ET METHODES	11
A. MATERIEL BIOLOGIQUE	11
B. EXTRACTION D'ADN	11
1. <i>Extraction au DNazol (Chomczynski, 1997)</i>	11
2. <i>Extraction au QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)</i>	12
3. <i>Quantification de l'ADN après extraction</i>	12
C. PCR RFLP.....	12
1. <i>PCR PerKITS</i>	12
2. <i>Digestion</i>	13
D. CLONAGE	14
1. <i>Ligation (TA cloning kit, Invitrogen)</i>	14
2. <i>Transformation</i>	14
3. <i>Sélection</i>	14
E. SEQUENÇAGE.....	15
1. <i>Extraction d'ADN plasmidique</i>	15
2. <i>Réaction de séquence</i>	15
3. <i>Purification des séquences</i>	16
IV. RESULTATS ET DISCUSSION	17
A. CHOIX DU MATERIEL DE DEPART ET DE LA TECHNIQUE D'EXTRACTION D'ADN	17
B. CARACTERISATION DU PERKINSUS PRESENT PAR SECTEUR	18
C. SEQUENÇAGE	21
CONCLUSION	23
ANNEXE 1	24
ANNEXE 2	24
ANNEXE 3	25
BIBLIOGRAPHIE	26

Présentation de Ifremer

Institut national de recherches marines, l'Ifremer contribue à la connaissance des océans et de leurs ressources, à la surveillance du milieu marin et littoral et au développement durable des activités maritimes. A ces fins, il conçoit et met en oeuvre des outils d'observation, d'expérimentation et de surveillance, et gère la flotte océanographique française pour l'ensemble de la communauté scientifique.

Créé en 1984, l'Ifremer est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC), placé sous la tutelle conjointe des ministères chargés de la Recherche, de l'Agriculture et de la Pêche, de l'Équipement et des Transports, de l'Écologie et du Développement durable.

La station Ifremer de La Tremblade est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral et regroupe deux laboratoires: le Laboratoire Environnement Ressources Poitou Charente (LERPC) et le Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP).

- La surveillance de l'environnement littoral permet: d'apprécier la qualité du milieu marin, de protéger la santé des consommateurs, de comprendre les phénomènes biologiques tels que les mortalités atypiques, de sauvegarder et améliorer les élevages existants et de diminuer les risques de transfert de maladies et de parasites lors d'échanges nationaux et internationaux. Dans le domaine conchylicole, les programmes de recherche et les activités de surveillance sont complémentaires. La recherche conchylicole se traduit par le développement des productions aquacoles, la préservation de la santé des élevages et l'amélioration génétique. Pour surveiller le littoral et les cheptels, Ifremer a mis en oeuvre un certain nombre de réseaux de surveillance comme le REPAMO (réseau de surveillance de la pathologie des mollusques).
- En génétique et pathologie ses compétences sont reconnues au niveau national et international. Il a été désigné depuis le 1er janvier 1997 par l'Union Européenne (UE): laboratoire communautaire de référence (LCR) pour les maladies des mollusques. Il développe des travaux de recherche dans le domaine de la génétique et de la pathologie chez les mollusques d'intérêt commercial. Il est impliqué dans l'acquisition de connaissances concernant l'amélioration génétique, le contrôle des performances et la santé des espèces d'intérêt en aquaculture marine. Ces travaux sont aujourd'hui reconnus mondialement et ont permis des avancées certaines dans le domaine de la conchyliculture (huîtres triploïdes, développement d'outils de diagnostic, détection de nouveaux agents infectieux ...). Le laboratoire est aussi très fortement impliqué dans la surveillance de la ressource. Il assure en particulier la surveillance des coquillages en terme de santé animale. Le LGP assure différentes fonctions:
 - LCR pour les maladies des coquillages depuis 1995,
 - Laboratoire de référence pour l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) pour deux maladies parasitaires des coquillages (la bonamiose et la marteliose).Le LGP héberge également la coordination du réseau REPAMO et par le biais de sa Cellule Analytique qui travaillera très bientôt sous accréditation, il réalise les analyses officielles en terme de santé animale pour le compte de l'autorité compétente. Elle peut réaliser des analyses aussi bien pour le compte du LCR, du laboratoire de référence OIE, du Laboratoire National de Référence (LNR) et du REPAMO ou bien même pour des professionnels ou enfin pour des projets de recherche.

I. Introduction

La conchyliculture française (huîtres, moules, palourdes, coques...) représentent une part significative de la production aquacole. Selon le comité national de la conchyliculture (CNC) 200 000 tonnes de coquillages sont produites par an, plaçant ainsi la France en deuxième position parmi les plus grands producteurs en Europe. Ce n'est que récemment que la production a connu une hausse significative (figure 1), suite à des avancées technologiques concernant les cultures.

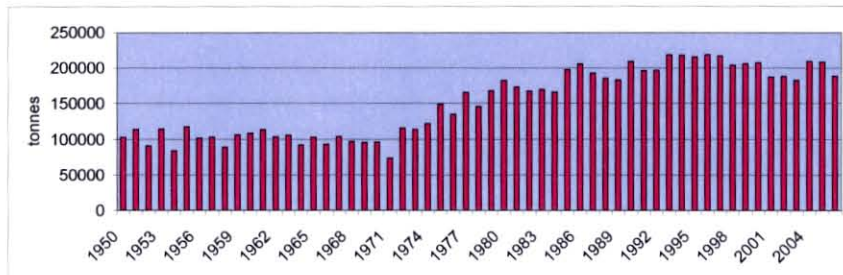


Figure 1: Evolution de la production française de mollusques (d'après FAO, 2007)

Actuellement, la plupart des élevages de bivalves utilisent du naissain récolté dans le milieu naturel mais les sites propices pour la conchyliculture sont limités. L'alternative au captage naturel des bivalves est leur production en éclosérie.

La production de palourdes (vénériculture) a été de 3400 tonnes en 2001 dont 60% provenant de l'élevage et 40% de la pêche. Le naissain de palourde d'élevage est principalement issu d'écloséries avec une production de 183 millions d'unités en 2001 (31 tonnes pour le recrutement naturel). La Bretagne sud est la première région productrice de palourdes (118 hectares d'exploitations sur 220 et 2112 tonnes de palourdes vendues en 2001 sur 3442) (Agreste, 2005).

Malgré la progression de la production, les pertes liées aux maladies telles que la perkinsose sont aujourd'hui considérées comme l'un des principaux facteurs limitant le développement de l'aquaculture au niveau mondial.

Le genre *Perkinsus* regroupe des parasites protozoaires affectant les mollusques marins. Une attention particulière est accordée à deux espèces, *Perkinsus marinus* et *Perkinsus olseni*, en raison de leur impact sur l'aquaculture. Ces deux agents pathogènes sont ainsi listés par l'OIE (Organisation Mondiale de la Santé Animale) et sont à déclaration obligatoire. Néanmoins d'autres espèces de *Perkinsus* ont été décrites dans des zones géographiques communes à *Perkinsus marinus* et *Perkinsus olseni* telles que *Perkinsus mediterraneus* chez *Ostrea edulis* aux Iles Baléares (Casas et al, 2004) ou *Perkinsus chesapeaki* chez *Mya arenaria* en Baie de Chesapeake (U.S.A.) (McLaughlin et Faisal, 2000 ; Andrews, 1996). En raison de leurs caractéristiques morphologiques communes, il est difficile de différencier ces espèces les unes des autres.

En 2004 et 2005, une étude menée par le REPAMO (Réseau de Pathologie des Mollusques) a montré que des parasites du genre *Perkinsus* étaient présents au sein des principaux domaines français de production de palourdes: La mer Méditerranée, l'Océan Atlantique et la Manche avec une forte prévalence mais aucun cas de mortalités associées. Cependant, ces résultats doivent être complétés par des analyses moléculaires plus spécifiques de façon à déterminer la ou les espèces de *Perkinsus* détectés.

D'autre part, l'étude a montré que différents facteurs environnementaux (température, salinité...) liés à la répartition géographique influencent le développement de ce parasite. Ces résultats suggèrent l'existence d'une variabilité génétique chez le ou les parasites du genre *Perkinsus* présents le long du littoral français pouvant influencer le développement du parasite ainsi que sa virulence (Garcia et al, 2004; Garcia et al, 2005).

L'objectif de ce travail est de caractériser par PCR (Polymerase Chain Reaction) et polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) l'espèce de *Perkinsus* présente dans les palourdes en France et d'apprécier la variabilité génétique du parasite entre points géographiques, entre individus voire en intra-individuel.

II. Rappels bibliographiques

A. Les palourdes

Les principales espèces de palourdes présentes en France sont *Ruditapes decussatus*, espèce européenne trouvée sur les côtes méditerranéennes (figure 2a) et *Ruditapes philippinarum*, espèce d'origine japonaise trouvée sur les côtes atlantiques (figure 2b). Les 2 espèces sont morphologiquement très proches mais *R. decussatus* présente deux siphons clairement individualisés alors que les siphons de *R. philippinarum* sont collés.



Figure 2a: *Ruditapes decussatus*
(photo: National Museum Wales)



Figure 2b: *Ruditapes philippinarum*
(photo: National Museum Wales)

La palourde est un mollusque fouisseur et sédentaire préférant les fonds vaseux et sableux. Elle se nourrit par filtration de plancton. Les siphons schématisés sur la figure 3 sont des extensions qui servent à aspirer et refouler l'eau, les branchies interviennent ensuite dans la respiration, la filtration de l'eau et la nutrition. Leur système circulatoire est de type semi-ouvert, il comprend un cœur, des branchies, des sinus et des vaisseaux où circule l'hémolymphe (équivalent du sang chez les vertébrés).

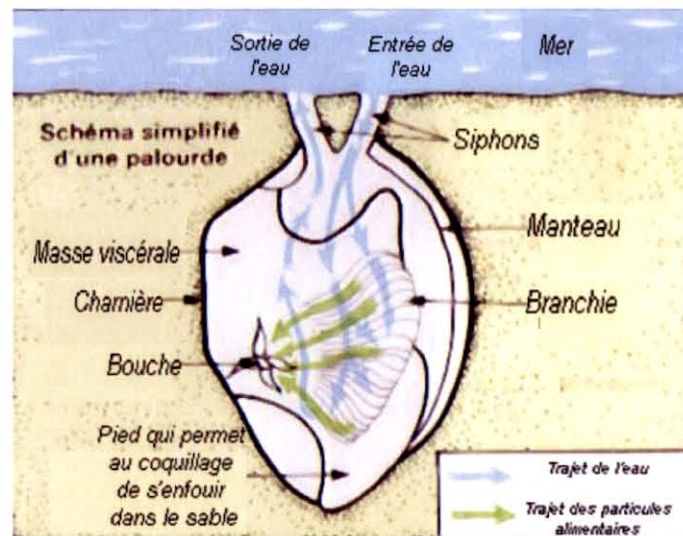


Figure 3: Schéma simplifié d'une palourde
(d'après <http://ecolecentreferte.free.fr>)

Comme tous les mollusques, les palourdes possèdent, pour contrer les pathogènes, un système de défense interne représenté par l'hémolymphe, fluide circulant composé d'hémocytes assurant l'immunité à médiation cellulaire (Bassem et Le Pennek, 1998). La lutte contre un pathogène est donc limitée et ne peut recourir à la vaccination car les mollusques ne possèdent pas de lymphocytes B et T et donc pas de mémoire immunitaire, de plus l'aquaculture en milieu ouvert rend tout traitement impossible (contrairement aux écloséries).

B. La perkinsose de la palourde

1. Etiologie

La perkinsose est une infection des mollusques marins, provoquée par des protistes parasites du genre *Perkinsus*. La première description de ce parasite protozoaire a été réalisée dans le

cadre d'une étude menée en 1946 afin de déterminer les causes de mortalités massives de l'huître *Crassostrea virginica* dans le golfe du Mexique. Le parasite connu sous le nom de *Perkinsus marinus* a été dans un premier temps désigné sous le nom de *Dermocystidium marinum* (Mackin et al, 1950), puis de *Labyrinthomyxa marina* après observations de stades de type amibe dans l'huître (Mackin et Ray, 1966). La microscopie électronique a ensuite permis de l'inscrire dans le phylum des Apicomplexes (Perkins, 1966). En effet, la présence d'organite "plastid-like" a été rapportée sur des zoospores de *Perkinsus olseni* (Teles-Grilo et al, 2007), les plastides sont caractéristiques des Apicomplexes et Dinoflagellés. La différence entre les plastides de ces deux phyla est basée sur le nombre de membranes, généralement de 3 pour les dinoflagellés et 4 pour les Apicomplexes (Hopkins et al, 1999). Les plastides observés chez *Perkinsus olseni* présentent des caractéristiques des Apicomplexes (4 membranes). Cependant une étude génétique récente reposant sur l'analyse des séquences des gènes codant l'actine et des sous unités d'ARN ribosomiaux a montré que *Perkinsus* est plus proche du phylum des Dinoflagellés que celui des Apicomplexes (Reece et al, 1997). D'autres analyses doivent être réalisées pour clarifier la position taxonomique du genre *Perkinsus*.

2. Epidémiologie

a) Hôtes et répartition géographique

Depuis la première description de *Perkinsus marinus*, 10 nouvelles espèces ont été décrites à partir de leur observation après incubation dans le milieu RFTM (Ray Fluid Thioglycollate Medium) (Ray, 1952) ainsi que sur les caractéristiques morphologiques observées à partir de coupes histologiques et en microscopie électronique et plus récemment, en culture *in vitro*. Le développement d'outils moléculaires a ajouté une nouvelle dimension aux critères d'identification d'espèce et en conséquence seulement 7 espèces sont encore valides: *Perkinsus marinus*, *P. olseni*, *P. qugwadi*, *P. mediterraneus*, *P. chesapeaki*, *P. beihaiensis* et *P. honshuensis* (tableau 1).

Espèces du genre <i>Perkinsus</i>	Espèces Hôtes	Localisation
<i>Perkinsus marinus</i>	Huîtres creuses <i>Crassostrea virginica</i> , <i>C. ariakensis</i> , <i>C. gigas</i> , <i>C. rhizophorae</i> et <i>C. corteziensis</i> (Caceres-Martinez et al, 2008)	USA, Hawaii, Mexique
<i>Perkinsus olseni</i> (= <i>Perkinsus atlanticus</i>)	Nombreuses espèces d'ormeaux dont <i>Haliotis ruber</i> et <i>Haliotis laevigata</i> Huître perlière <i>Pinctada maxima</i> Huître creuse <i>Crassostrea ariakensis</i> Nombreuses espèces de palourdes dont <i>Ruditapes philippinarum</i> , <i>Ruditapes decussatus</i> , <i>Veverupis pullastra</i> et <i>Paphia aurea</i>	Australie, Nouvelle-Zélande, Corée, Japon, Chine, Europe, Afrique du Nord, Uruguay
<i>Perkinsus qugwadi</i>	Pétoncle japonais <i>Patinopecten yessoensis</i>	Canada
<i>Perkinsus mediterraneus</i>	<i>Ostrea edulis</i>	Espagne
<i>Perkinsus cheasapeaki</i> (= <i>Perkinsus andrewsii</i>)	Mye commune <i>Mya arenaria</i> <i>Crassostrea virginica</i> Autre mollusque <i>Macoma mitchelli</i> , <i>M. balthica</i> , <i>Mercenaria mercenaria</i> et <i>Tagelus plebeius</i>	Baie Chesapeake et Baie Delaware, USA
<i>Perkinsus beihaiensis</i>	Huîtres creuses <i>Crassostrea hongkongensis</i> et <i>C. ariakensis</i> (Moss et al, 2008)	Sud de la Chine
<i>Perkinsus honshuensis</i>	Palourde <i>Ruditapes philippinarum</i>	Japon

Tableau 1: Spectre d'hôtes et répartition géographique des parasites du genre *Perkinsus* (d'après Garcia et al, 2008)

En Australie, *Perkinsus olseni* a été décrit chez l'ormeaux *Haliotis ruber* (Lester et Davis, 1981) et semble responsable d'importantes mortalités d'*Haliotis laevigata* (O'Donogue et al, 1991; Goggin et Lester, 1995). Il a également été détecté chez l'huître perlière *Pinctada maxima* (Norton et al, 1993) et est incriminé dans le déclin des populations de palourdes japonaises *Ruditapes philippinarum* en Corée (Park et Choi, 2001). Le parasite a été transporté de l'Asie vers l'Europe probablement à travers les mouvements de palourdes hôtes *Ruditapes philippinarum* (Hine, 2001).

En Europe, il a été associé à des mortalités massives et saisonnières chez la palourde *Ruditapes decussatus* (Da Ros et Canzonier, 1985 ; Ruano, 1985 ; Azevedo, 1989 ; Chagot et al, 1987) et a été plus récemment décrit en Uruguay chez la palourde *Pitar rostrata* (Cremonte et al,

2005). *Perkinsus olseni* semble présenter un large spectre d'hôtes ainsi qu'une large aire de distribution, cependant son impact sur les productions de coquillages reste discuté.

b) Transmission

Le cycle de développement de *Perkinsus* a été établi chez deux espèces *Perkinsus marinus* (Perkins, 1966) et *Perkinsus olseni* (Auzoux-Bordenave et al, 1995) et se décompose en 4 grandes étapes (figure 4):

- Une phase de multiplication végétative du parasite sous forme de trophozoïtes principalement au niveau des branchies, du manteau et du tube digestif de l'hôte.
- Une phase de croissance lors de laquelle on observe une augmentation de la taille des trophozoïtes correspondant à leur transformation en hypnospores (= cellules sphériques de 40 à 100 microns de diamètre constituées d'une vacuole centrale et caractérisées par la présence d'un tube de relargage).
- Une phase proliférative correspondant à la libération des hypnospores dans l'eau de mer (= phase libre) et dans certaines conditions environnementales à leur transformation en zoosporanges (=division interne entraînant la formation d'une multitude de cellules filles).
- Une phase infectieuse lors de laquelle les zoosporanges libèrent des zoospores biflagellées.

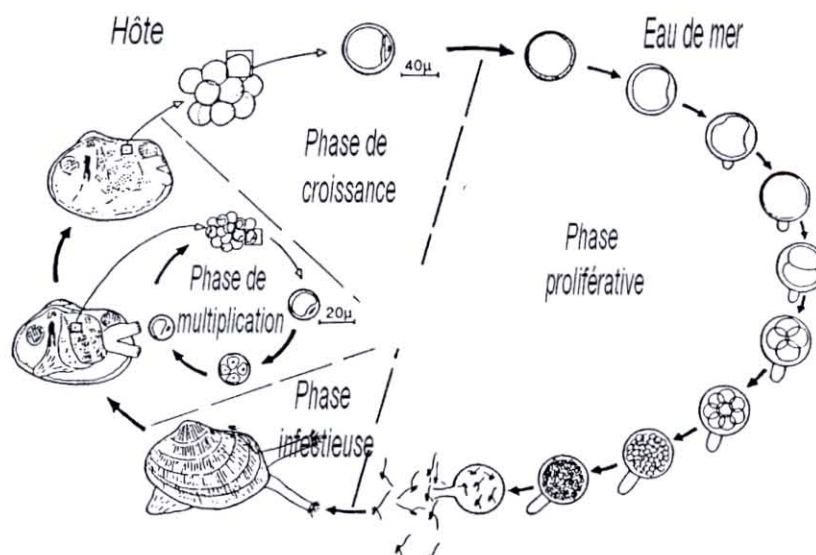


Figure 4: Cycle de développement de *Perkinsus* (Auzoux-Bordenave et al, 1995)

3. Effet sur l'hôte

La progression de l'infection dans les tissus cause des lésions qui peuvent mener à la mort de l'hôte. Des mortalités massives de populations de mollusques associées à la perkinsose ont des conséquences écologiques et socio-économiques évidentes.

De plus, il existe des effets non mortels pouvant également avoir des effets écologiques significatifs et des implications économiques. Ainsi, *Perkinsus* peut interférer avec l'absorption d'éléments nutritifs et ralentir la croissance et le bon déroulement de la gamétogenèse de l'hôte. Les effets négatifs sur la fécondité de l'hôte peuvent induire une diminution du captage et donc une faible disponibilité de naissain à des fins d'élevage (Villalba et al, 2004).

Les facteurs de virulence associés à *Perkinsus* sp. et les mécanismes de pathogénicité sont encore mal compris et ont surtout été étudiés pour *Perkinsus marinus* (Volety et Chu, 1994 ; Volety et Chu, 1997 ; La Peyre et al, 1995 ; La Peyre et Faisal, 1995 ; Tirard et al, 1995). Ces facteurs sont certainement variables en fonction des souches de parasites et influencés par les différences physiologiques de leurs hôtes ou les facteurs environnementaux.

4. Diagnostic

a) Culture dans un milieu liquide au thioglycollate

La présence et le taux d'infection des palourdes par *Perkinsus* sont estimés par culture en milieu thioglycollate (RFTM) (Ray, 1952). Ce milieu contient des glucides permettant le grossissement des cellules et le passage de la forme trophozoïte (2-5 μ) à celle d'hypnose (50-100 μ) qui dans ces conditions ne se multiplie plus (figure 5).

Les échantillons tissulaires sont prélevés et incubés dans le milieu liquide au thioglycollate supplémenté en antibiotiques afin d'empêcher le développement des bactéries pendant 4 à 7 jours à l'obscurité et à température ambiante. Après incubation, les cellules et les tissus présents dans le milieu sont détruits par la technique de lyse à la soude (Choi et al, 1989) sans affecter les cellules parasitaires dont la forme hypnose résiste à la soude. Le parasite est ensuite quantifié sur cellule de Malassez afin de déterminer la charge parasitaire par gramme de branchies.



Figure 5: Observation d'hypnose de *Perkinsus* après incubation dans un milieu RFTM (photo B. Chollet)

b) Histologie

Bien que moins sensible que la culture en milieu RFTM, l'histologie peut-être utilisée pour la détection de *Perkinsus* en particulier pour apprécier l'impact de l'infection sur les tissus et les organes.

Les prélèvements sont traités selon les méthodes histologiques classiques. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline – éosine.

L'infection est associée à une infiltration et une accumulation d'hémocytes autour du parasite. Occasionnellement des cellules parasitaires peuvent être observées dans les hémocytes.

Deux stades de *Perkinsus olseni* peuvent être observés dans les tissus de l'hôte:

- 1) trophozoïtes immatures (2 - 3 μ) ou matures (3 - 18 μ) caractérisés par une grande vacuole (figure 6 et 7)
- 2) tomites (cellules en division, 12 - 35 μ) correspondant à la multiplication végétative des trophozoïtes et contenant de 2 à 32 cellules (figure 7)

Bien que *Perkinsus olseni* semble différer de *Perkinsus marinus* de part ses caractéristiques morphologiques (la taille de trophozoïtes matures, la présence de vacuoles, la taille de zoospores...); l'histologie ne permet pas de différencier catégoriquement les différentes espèces de *Perkinsus* (Bower et McGladdery, 2005).

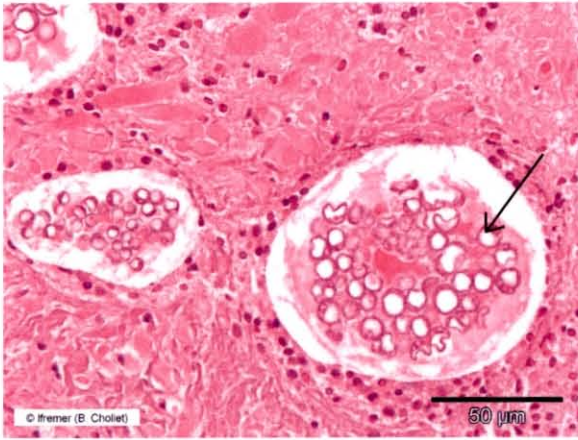


Figure 6: Amas de trophozoïtes (flèche) dans le manteau de *Ruditapes philippinarum*. (photo de B.Chollet)

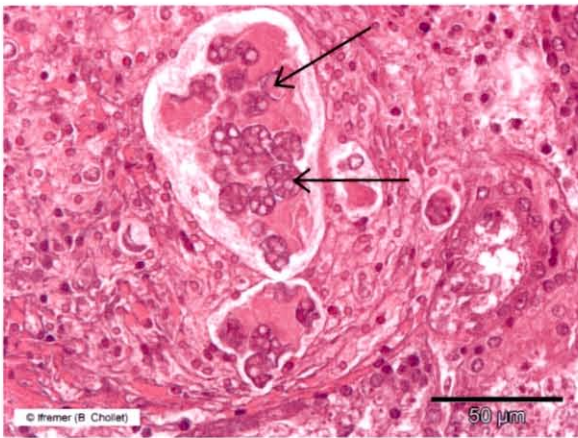


Figure 7: *Perkinsus* sp. aux stades tomontes (flèche) et trophozoïtes (flèche) au niveau des branchies de *Ruditapes philippinarum*. (photo de B.Chollet)

c) Techniques moléculaires

De nouvelles techniques de diagnostic moléculaire ont été développées comme une alternative à la technique RFTM ciblant spécifiquement *Perkinsus* sp. ou une espèce particulière du genre (Villalba, 2008; OIE, 2006).

Ainsi, différents outils de PCR utilisant des amorces spécifiques de genre ou d'espèce ont été développés et sont listés dans le *tableau 2*.

Nom	Gène	Espèce ou genre ciblé	Référence
ITS750-85	ITS (Internal Transcribed Spacer)	<i>Perkinsus</i> spp excepté <i>Perkinsus qugwadi</i>	Casas et al 2002
	NTS (NonTranscribed Spacer)	<i>Perkinsus olseni</i>	Park et al, 2002
300F-300R	NTS	<i>Perkinsus marinus</i>	Marsh et al, 1995; Robledo et al, 1998
PmarITS 70F-600R	ITS	<i>Perkinsus marinus</i>	Audemart et al, 2004
ITS1-ITS2	ITS	<i>Perkinsus</i> spp	Park et al, 2006
PKitsFW-RV	ITS	<i>Perkinsus</i> spp	Park et al, 2007
ATAN5-3	ATAN	<i>Perkinsus marinus</i>	Reece et al ,2001

Tableau 2: Outils de PCR disponibles pour le diagnostic des parasites du genre *Perkinsus*

De façon générale, la PCR est plus sensible que la culture en RFTM et permet en fonction de la spécificité des amorces de différencier les espèces, voire les souches.

Plus récemment, les chercheurs ont adapté des outils moléculaires puissants comme la qPCR en temps réel et la PCR-RFLP pour la détection, la caractérisation et la quantification du parasite (Audemard et al, 2004 ; Audemard et al, 2006). Les exemples de l'utilisation de la qPCR en temps réel sont la détection *Perkinsus* dans des eaux environnementales. Cette méthode permet non seulement de détecter le parasite mais aussi de déterminer le degré d'infection de l'hôte en prenant en compte des paramètres variables comme l'habitat de l'hôte, les eaux côtières et l'intensité d'infection des secteurs environnants.

L'utilisation de la PCR RFLP s'avère intéressante pour distinguer les différentes espèces de *Perkinsus*. L'amplification spécifique de la région ITS suivie d'une digestion par *Rsal* puis *HinfI* permet en effet de différencier quatre espèces différentes de *Perkinsus*: *P. marinus*, *P. chesapeakei*, *P. olseni* et *P. mediterraneus* (Abollo et al, 2006).

C. Le suivi de la perkinsose dans le cadre du réseau REPAMO (2004-2005)

Le réseau REPAMO assure la surveillance de l'état de santé des coquillages du littoral français métropolitain en réponse aux Directives Européennes 91/67/CEE et 95/70/CEE. Les objectifs du réseau sont de prévenir l'introduction et la propagation d'agents pathogènes exotiques, en particulier ceux à déclaration obligatoire et d'étudier les moyens de diminuer l'impact des agents pathogènes déjà présents tout en surveillant leur évolution.

Une surveillance des populations élevées et sauvages de mollusques a été mise en place afin d'obtenir des informations sur l'état zosanitaire des coquillages en dehors des situations de crise (mortalités anormales), ceci afin de sécuriser les échanges commerciaux, de dresser une image de référence du littoral français en matière de pathologie des mollusques et de répondre aux obligations réglementaires de la Directive 95/70/CE.

En 2004 et 2005, cette surveillance a ciblé les palourdes, *Ruditapes decussatus* et *R. philippinarum* et plus particulièrement l'infection par le parasite *Perkinsus olseni*. Deux raisons principales ont motivé ce choix:

- cette infection était inscrite sur la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'OIE.
- après analyse des données antérieures du réseau REPAMO, peu d'informations étaient disponibles concernant les palourdes.

Les échantillons ont été rassemblés en septembre et octobre sur six à dix sites le long des côtes françaises en 2004 et 2005. Il a été décidé de réaliser 5 points de prélèvements de 30 individus par secteur soit un prélèvement de 150 individus par secteur. La recherche de *Perkinsus* a été réalisée par la technique de quantification sur milieu thioglycollate. Six secteurs présentés sur la *figure 8* ont été identifiés sur l'ensemble du littoral: Nord-Ouest Cotentin, Golfe du Morbihan, Rivière d'Auray, Arcachon, Leucate, Etang de Thau.

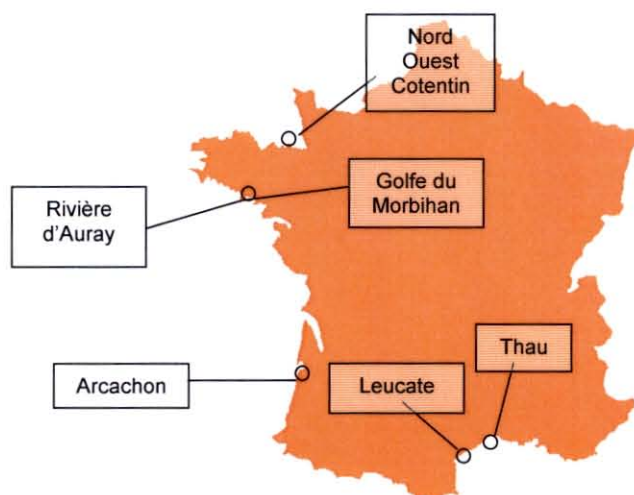


Figure 8 : Localisation des secteurs de prélèvements

Plusieurs tests ont été effectués:

- Détermination de la prévalence en *Perkinsus* d'un lot, correspondant au pourcentage de palourdes infectées par le parasite *Perkinsus* dans ce lot.
- Détermination de la charge parasitaire branchiale moyenne correspondant au nombre moyen de *Perkinsus* par gramme de branchies chez les individus infectés dans un lot donné.
- La différenciation des deux espèces de palourdes *Ruditapes philippinarum* et *R. decussatus* a été réalisée par observation macroscopique des siphons.

Les premiers résultats ont montré que *Perkinsus* était présent dans tous les principaux secteurs de production français de palourdes: la Méditerranée, l'Océan Atlantique et la Manche. Une forte

prévalence a été enregistrée dans certains secteurs, plus particulièrement au sud de la France où la prévalence peut atteindre 100 % (Arcachon et la Méditerranée). Par ailleurs, d'autres sites ont montré une faible prévalence moins de 20% (Charente-maritime, Finistère, Rivière d'Auray). La fréquence de détection de *Perkinsus* en 2005 était moindre qu'en 2004. Des facteurs environnementaux incluant la température d'eau, la densité de mollusque peuvent influencer le cycle de vie de parasite. De plus, bien que la fréquence de détection de *Perkinsus* soit élevée, aucune mortalité de mollusque n'a été enregistrée en 2004 et 2005. Ces résultats soulèvent la question de l'impact du parasite sur les mollusques.

D'autre part la technique de culture en milieu RFTM ne permet pas de déterminer la ou les espèces présentes, le développement irrégulier du parasite ainsi que l'absence de mortalité peut donc être du à l'existence différentes espèces de *Perkinsus* mais également à une variabilité génétique de *Perkinsus olseni* (Miossec, 2006).

III. Matériel et méthodes

A. Matériel biologique

Pour notre étude, les résultats obtenus dans le cadre du suivi REPAMO de la perkinsose, nous ont permis de sélectionner les lots et les individus présentant les fréquences de détection les plus importantes pour un secteur donné. Pour les secteurs ayant une faible fréquence de détection, tous les lots ainsi que tous les individus ont été sélectionnés.

Les tests ont été effectués à partir

- du manteau des palourdes conservées à -20°C
- d'hypnospores obtenues après culture en milieu thioglycollate et conservées dans du PBS1X à -20°C
- de cultures réalisées à partir de branchies de palourdes et conservées en milieu de cryopreservation à -80°C ou en alcool à -20°C pour certains secteurs: Golfe du Morbihan, Bassin d'Arcachon et Etang de Salse Leucate,

B. Extraction d'ADN

Dans le cadre du stage, deux techniques d'extraction d'ADN ont été utilisées et comparées: l'extraction d'ADN au DNAzol (Molecular Research Center) et au Qiamp MiniKit (Quiagen).

1. Extraction au DNAzol (Chomczynski, 1997)

Le DNAzol est un réactif complet pour l'isolement d'ADN génomique d'échantillons solides ou liquides d'origine végétale ou animale. Le protocole d'extraction au DNAzol est basé sur l'utilisation d'un détergent à base de guanidine permettant l'hydrolyse des ARN et la précipitation de l'ADN des cellules lysées à l'éthanol.

- Lyse et homogénéisation

25 à 50 mg de tissus sont broyés à l'aide d'un piston pellet dans 1 mL de DNAzol puis laissés 5 à 10 min à température ambiante.

Un étape de digestion à la protéinase K peut-être réalisée afin d'améliorer le protocole. Ainsi les tissus sont digérés pendant une nuit à température ambiante (l'activité de la protéinase K dans le DNAzol est meilleure à température ambiante qu'à 56°C) dans 0.5 mL de DNAzol supplémenté de protéinase K (100 µg/mL).

Dans le cas des hypnospores et des cultures de *Perkinsus*, les cellules sont culottées par centrifugation (1000G ; 10 min à 4-25°C) puis lavées au PBS1X (1 mL). Il n'est pas nécessaire de réaliser une étape de broyage mais la lyse à la protéinase K est préférable.

- Centrifugation

Cette étape permet de culotter puis d'éliminer les fragments de tissus insolubles non digérés, les ARN partiellement hydrolysés et les polysaccharides en excès du lysat en réalisant une centrifugation pendant 10 min à 10000G à 4-25°C. Le surnageant est ensuite transféré dans un nouveau tube.

- Précipitation de l'ADN

L'ADN est ensuite précipité par addition de 0.5 mL d'éthanol à 100%. Les échantillons sont mélangés par retournements et incubés 1 à 3 min à température ambiante. L'ADN peut apparaître sous la forme d'un précipité blanc. Dans le cas d'ADN dégradé ou en petite quantité, le précipité n'est pas visible. Une centrifugation de 5000G pendant 5 min à 4-25°C est réalisée puis le surnageant est éliminé.

- Lavage

Le précipité ainsi obtenu est lavé par 2 bains successifs d'éthanol à 70% puis à 30%. Pour chaque lavage, l'ADN est resuspendu dans l'éthanol par retournements puis concentré par centrifugation à 1000G pendant 3 min à 4-25°C. Le surnageant est ensuite éliminé par retournement et le culot bien séché.

- Solubilisation de l'ADN

L'ADN est dissout dans 50 µL d'eau pendant 5-10 min à température ambiante.

2.Extraction au QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)

- Lyse et homogénéisation

180 µL de tampon ATL sont ajoutés à environ 25 mg de tissus. Un étape de broyage peut être réalisée avant ajout de 20 µL de protéinase K. Les échantillons sont vortexés puis incubés à 56°C pendant une nuit. Après une rapide centrifugation des tubes, 200 µL de tampon AL sont ajoutés. Les échantillons sont vortexés pendant 15s puis incubés 10 min à 70°C. Les tubes sont ensuite de nouveau brièvement centrifugés.

Dans le cas des hypnospores et des cultures de *Perkinsus*, les cellules sont culottées par centrifugation (1000G ; 10 min à 4-25°C) puis lavées au PBS1X (1 mL) avant d'être traitées dans les mêmes conditions que les tissus.

- Précipitation de l'ADN

200 µL d'éthanol (96-100%) sont ajoutés aux échantillons qui sont alors vortexés pendant 15s avant d'être brièvement centrifugés. Le mélange obtenu est ensuite transféré sur une colonne QIAamp. Les colonnes sont centrifugées à 6000G pendant 1 min puis transférées sur de nouveaux tubes. Les tubes contenant le filtrat peuvent être éliminés.

- Lavage

500 µL de tampon AW1 sont ajoutés puis les colonnes sont centrifugées à 6000G pendant 1 min et transférées sur de nouveaux tubes. 500 µL de tampon AW2 sont ensuite ajoutés avant de centrifuger les colonnes à 20000G pendant 3 min. Pour éliminer toute possibilité de résidus de AW2 qui pourrait interférer avec la PCR, les colonnes sont transférées sur de nouveaux tubes puis centrifugées à 20000G pendant 1 min.

- Solubilisation de l'ADN

Les colonnes sont de nouveau transférées sur des tubes neufs. L'ADN est solubilisé dans 50 µL d'eau pendant 5-10 min puis les tubes sont centrifugés à 6000G pendant 1 min. Les colonnes peuvent alors être éliminées.

3.Quantification de l'ADN après extraction

L'ADN est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre après dilution au 1/20. Cependant, si la DO à 260 nm est supérieure à 1 il est nécessaire de diluer l'échantillon et si elle est inférieure à 0.1, il faut le concentrer. La quantité d'ADN est calculée selon le principe qu'une unité de DO à 260 nm est égal à 50 µg d'ADN double-brin/mL. Le ratio A260/A280 indicateur d'une contamination éventuelle en protéines doit être compris entre 1.6 et 1.9.

Afin de déterminer la qualité de l'ADN extrait, des dépôts sur gel d'agarose 0.8% peuvent être réalisés.

C.PCR RFLP

L'identification de l'espèce de *Perkinsus* repose sur l'amplification spécifique d'ADN par PCR et la digestion par des enzymes de restriction.

1.PCR PerkITS

Les amorces utilisées présentées dans le *tableau 3* ciblent spécifiquement une séquence de la région ITS conservée chez toutes les espèces de *Perkinsus* excepté *Perkinsus qugwadi*.

Nom des amorces	Séquences	Taille
PerkITS85 (Casas et al,2002)	5' CCGCTTTGTTTGGATCCCC 3'	703 pb
PerkITS 750 (Casas et al, 2002)	5' ACATCAGGCCTTCTAATGATG 3'	
PerkITSF (Park et al, 2006)	5' GAGATGGGATCYCCGCTTTGTTT 3'	532 pb
PerkITSR (Park et al, 2006)	5' GAATCGCGTGATCRAGGAACACG 3'	

Tableau 3: Amorces utilisées (Casas et al, 2002 et Park et al , 2006)
pb:paire de base

La composition du mix de PCR est décrite dans le *tableau 4*.

Composition	Volume pour un tube	[C] initiale	[C] finale
Eau sigma	13,625µL		
Tampon (GoTaq Flexi buffer Promega)	5µL	5x	1x
MgCl ₂	2,5µL	25mM	2,5mM
BSA	1,05µL	10mg/mL	4,2*10 ⁻⁴ mg/mL
dNTP	0,625µL	10mM	0,25mM
Amorces	0,5µL de chaque	10µM	0,2mM
Tap (GoTaq DNA polymerase Promega)	0,2µL	5U/µL	0,04U/µL

Tableau 4: Composition du mix de PCR (adaptée de Casas et al, 2002)

L'amplification est réalisée par une dénaturation initiale à 95°C pendant 4min, suivie de 40 cycles de 1min à 95°C, 1min à 65°C et 1min à 72°C et enfin une élongation finale de 5min à 72°C. Après migration sur gel d'agarose 1% à 150V.

2. Digestion

Les produits de l'amplification sont ensuite digérés par les enzymes de restriction *RsaI* et *HinfI* (*tableau 5*) selon le protocole présenté dans le *tableau 6*.

	<i>RsaI</i>	<i>HinfI</i>
Séquence reconnue	...GTAC... ...CATG...	...GT AC... ...CA TG...
Coupure	...GANTC... ...CTNAG...	...G ANTC... ...CTNA G...

Tableau 5: Enzymes de restriction utilisés

Composition	Volume pour un tube	[C] initiale	[C] finale
Eau sigma	7µL		
Tampon (Promega)	2µL	10x	1x
Enzyme de restriction (Promega)	1µL	10U/µL	0,5U/µL
Produits de PCR	10µL		

Tableau 6: Composition du mix de digestion (d'après Abollo et al, 2006)

Les produits amplifiés sont digérés pendant 2h à 37°C puis les enzymes sont inactivés 20 min à 65°C.

Après migration des produits de digestion sur gel d'agarose 2%, l'un des profils de restriction de la *figure 9* est attendu.

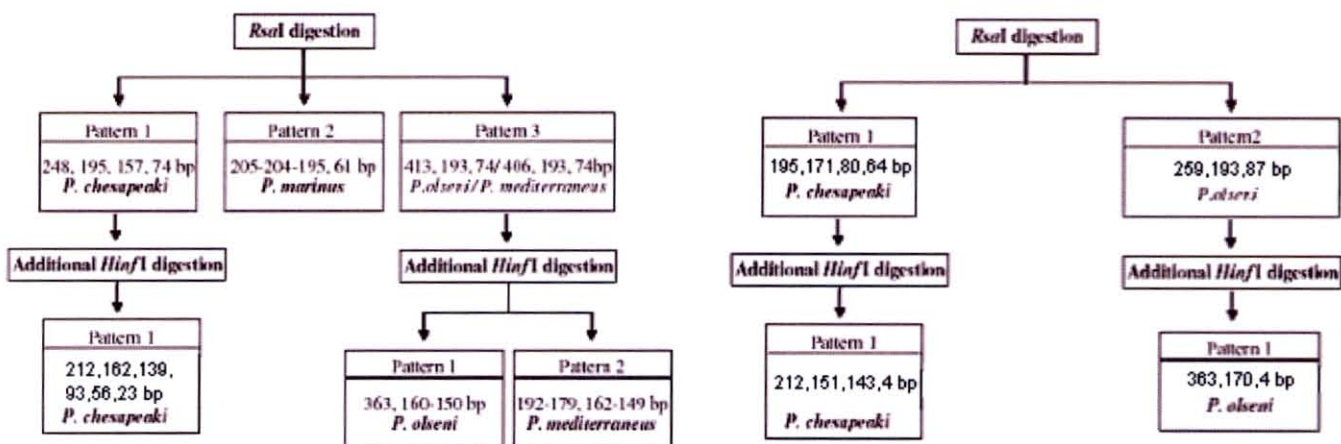


Figure 9: Profils de restriction attendus après digestion avec *RsaI* et *HinfI* en fonction des espèces de *Perkinsus* et des amorces utilisées. (d'après Abollo et al, 2006)

D. Clonage

Après détermination de l'espèce par PCR-RFLP, certains fragments obtenus par PCR ont été clonés (*tableau 7*) afin d'étudier la potentielle variabilité génétique intra-individuelle en PCR RFLP et par séquençage.

Etapes	
1	Ligation des produits de PCR dans le vecteur plasmidique pCR 2.1.
2	Transformation des bactéries compétentes <i>E. coli</i> avec le plasmide.
3	Sélection des colonies transformées et les analyses par PCR-RFLP ou séquençage.

Tableau 7: Etapes du clonage.

1. Ligation (TA cloning kit, Invitrogen)

Les fragments ITS spécifiques de *Perkinsus* amplifiés par PCR sont insérés dans le vecteur plasmidique pCR2.1 selon le schéma de la *figure 10*.

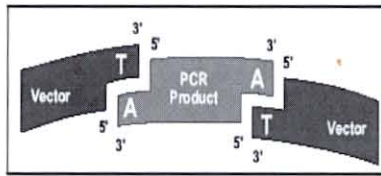


Figure 10: Schéma de l'intégration d'un insert dans un vecteur

Pour une ligation optimale, les produits de PCR doivent être frais. Ceux-ci sont mis en présence du vecteur et de la ligase dans les proportions présentées dans le *tableau 8*.

Composition	Volume pour un tube	[C] initiale	[C] finale
eau stérile	Y		
vecteur pCR 2.1	2 μ L	25ng/ μ L	5ng/ μ L
tampon de ligation	1 μ L	10X	1X
T4 DNA ligase	1 μ L	4U/ μ L	0,4U/ μ L
produit de PCR	X (0,5<x<2 selon l'intensité des bandes)		
V final	10 μ L		

Tableau 8: Composition du mix de ligation

Le mix de ligation est ensuite incubé à 14°C pendant une nuit. Les produits de ligation peuvent être stockés à -20°C.

2. Transformation

Une fois la ligation effectuée, les bactéries compétentes *E. coli* peuvent être transformées. Les cellules compétentes TOP10 (Invitrogen) conservées à -80°C auxquelles a été ajouté 1 μ L de produit de ligation sont incubées pendant 30 min dans de la glace avant d'être choquées à 42°C pendant 30s. Après ajout de 250 μ L de milieu de culture Super Optimal Catabolite, les bactéries sont incubées 1h à 37°C sous agitation à 300 rpm. Elles sont ensuite étalées sur boîte de gélose Luria Bertani + ampicilline sur lesquelles 40 μ L de X-Gal à 40 mg/mL ont été préalablement étalés. Les boîtes sont ensuite incubées 20h à 37°C.

3. Sélection

Après 20h d'incubation à 37°C, 20 colonies sont repiquées et analysées en PCR-RFLP. Le choix des colonies repose sur la double-sélection. En effet, le plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline ; seules les bactéries ayant été transformées poussent donc sur le milieu LB+ampicilline. De plus, le site de clonage se situe dans le gène lac-Z du plasmide codant la β -galactosidase. Si l'insert est intégré dans le site, le gène est interrompu et la protéine n'est pas synthétisée. Pour sélectionner les clones nous utilisons le X-gal, substrat qui devient bleu en présence de β -galactosidase. Ainsi, si l'insert est présent dans le plasmide, les colonies sont blanches et au contraire s'il est absent les colonies sont bleues.

E. Séquençage

Des clones ayant un profil de restriction intéressant dans le contexte de l'étude ont été sélectionnés après PCR RFLP afin d'être séquencés.

1.Extraction d'ADN plasmidique

Les étapes de la « miniprep » consistent à lyser les bactéries afin de libérer l'ADN bactérien puis à séparer l'ADN du génomique de l'ADN plasmidique afin de n'obtenir que ce dernier. Il existe plusieurs kits comme le TempliPhi Amplification Kit de Amersham Biosciences ou le Kit Fastplasmid Mini de Eppendorf

2.Réaction de séquence

L'ADN plasmidique est amplifié et séquencé selon la méthode de Sanger (Sanger et Coulson, 1975) schématisée sur la figure 11.

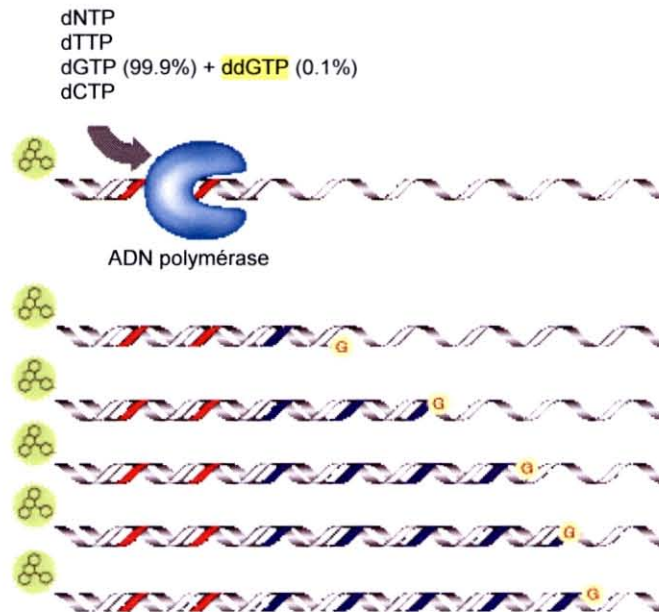


Figure 11: Schéma de la méthode de Sanger

La réaction de séquence est réalisée en utilisant les réactifs de Applied BioSystems et les amorces TopoF et TopoR dessinées dans le plasmide. Le mix réactionnel est décrit dans le tableau 9 :

Buffer terminator	1,8 µl
Primer topo 4 µM « Sens et/ou Anti-sens »	1,5 µl
Mix Bdv3 (mix de dNTP portant un fluorochrome spécifique à chacun des 4 nucléotides de l'ADN)	0,4 µl
ADN (4µl de produit amplifié pour TempliPhi ou 150 à 300ng d'ADN)	X µl
H ₂ O	qsp 10 µl

Tableau 9: Composition du mix de réaction de séquence

TopoF : GACCATGATTACGCCAAGC

TopoR : CCCAGTCACGACGTTG

Lors de la préparation du mix, la plaque doit être le plus possible préservée de la lumière après ajout du Bdv3.

L'amplification est réalisée par une dénaturation initiale à 96°C pendant 1min, suivie de 25 cycles de 10s à 96°C, 5s à 50°C et 4min à 60°C.

3. Purification des séquences

La dernière étape consiste à éliminer les produits non incorporés au cours de la réaction de séquence (amorces et dNTPs marqués). Il existe plusieurs méthodes de purification dont l'efficacité et le coût sont relativement variables. La précipitation à l'éthanol est l'une des solutions les plus efficaces et surtout la moins chère. Le protocole appliqué est le suivant :

- (1) Ajouter aux 10 μL de produits de réaction de séquence, 5 μL d'EDTA et 60 μL d'éthanol 100° fraîchement préparé (stocké à -20°C).
- (2) Après l'avoir rebouché et retourné 4 fois, incuber la plaque 15 min à température ambiante à l'obscurité
- (3) Centrifuger à 3000g pendant une durée de 30 min à 4°C
- (4) Vider le surnageant par retournement puis centrifuger la plaque à 185g pendant 1 min retournée sur une couche de papier absorbant
- (5) Laver avec 60 μL d'éthanol à 70% (stocké à -20°C)
- (6) Centrifuger à 1650g pendant une durée de 15 min à 4°C
- (7) Vider le surnageant par retournement puis centrifuger la plaque à 185g pendant 1 min retournée sur une couche de papier absorbant
- (8) Sécher au SpeedVac pendant 15 min
- (9) La plaque peut-être stockée 48 heures au congélateur à sec en attente du séquençage
- (6) Resuspendre les culots secs avec 10 μL de formamide Hi-Di (Applied Biosystems) pendant 30 min à 4°C à l'abri de la lumière

Enfin, les échantillons sont dénaturés (96°C , 5 min) puis placés sur glace. Les propriétés dénaturantes du formamide ainsi que le passage rapide des échantillons de 96°C à 4°C évitent la ré-association des deux brins complémentaires de l'ADN car les séquences doivent être lues sous forme mono-brin. Ces séquences sont placées dans un séquenceur à capillaires (ABI 3130, Applied Biosystems).

IV. Résultats et Discussion

A. Choix du matériel de départ et de la technique d'extraction d'ADN

Les différents types d'échantillons disponibles, manteaux, hypnospores et cultures, ont été testés par PCR PerKITS après extraction de l'ADN. Dans un premier temps, l'effort a été porté sur des échantillons de manteau pour lesquels il n'y a pas d'étape de concentration préalable et d'hypnospores qui permettent par le test de la culture en thioglycollate, largement utilisé, de déterminer la quantité de *Perkinsus* de manière sensible mais non spécifique. De plus, ces deux types d'échantillons étaient disponibles pour tous les sites de prélèvement. Différentes techniques d'extraction ont été testées en fonction de la nature des échantillons et sont récapitulées dans le *tableau 10*.

		Nombre d'échantillons analysés	Niveau d'infection	Quantité d'ADN (ng/mL) Max > Moyenne > Min	DO260/ DO280	PCR ITS
			Nbr de Perk/gr de branchie Max > Moyenne > Min			
Manteau	Quiagen	35	1 309 798 > 178 849,3 > 3 890	1660,9 > 528,7 > 55	1,62 > 1,47 > 1,29	6+
	DNAzol	100	17 105 263 > 521 683,4 > 3 890	1077,6 > 254,8 > 28,2	2,25 > 1,29 > 1,08	7+
	DNAzol + PK	30	2 748 494 > 398 874,8 > 16019	10 687 > 2772,7 > 331	1,53 > 1,30 > 1,19	5+
			Nbr de Perk/mL			
Hypnospores	Quiagen	21	454 500 > 142 190,7 > 5 438	178 > 35,6 > 0	1,83 > 1,39 > 0,98	2+
	DNAzol	4	454 500 > 196 750 > 16 000	16 > 9,2 > 5	1,63 > 1,30 > 1,08	0
Culture	Quiagen	25	Non déterminé	225 > 98,2 > 0	2,37 > 2,00 > 1,03	15+

Tableau 10: Résultats obtenus après extraction d'ADN et PCR PerKITS en fonction de la technique d'extraction utilisée et du type d'échantillon testé.

Après extraction, le dosage montre que l'on obtient la plus grande quantité d'ADN pour le manteau. En effet, contrairement aux cultures et hypnospores, pour le manteau le matériel extrait est composé non seulement d'ADN de *Perkinsus* mais également de l'ADN de la palourde. On remarque que l'on obtient la plus grande quantité d'ADN avec la technique d'extraction au DNAzol précédée d'une lyse à la protéinase K. Bien que le test ait été effectué sur du manteau, cette forte quantité d'ADN peut également s'expliquer par le fait que cette technique allie broyage et protéinase K permettant un accès plus facile aux acides nucléiques.

Les rapport DO260/DO280 représentant la contamination en protéines et donc la qualité de l'extraction sont légèrement meilleurs pour la technique d'extraction Quiagen mais restent faibles. Ces techniques ne permettent donc pas d'éliminer la totalité des protéines. En revanche, les rapports obtenus pour les cultures sont en moyenne supérieurs à 1.7 ce qui démontre une faible contamination protéique. Les valeurs DO260/DO280 sont cependant généralement élevées (>1.9) ce qui peut traduire la présence de quantité importante d'ARN.

Les échantillons testés étaient tous positifs à la détection de *Perkinsus* par culture en milieu thioglycollate mais variaient en terme de charge parasitaire. Cependant, les résultats de PCR PerKITS montrent que quelle que soit la technique d'extraction utilisée, seulement 10% des échantillons de manteau, 8% des hypnospores et 60% des cultures sont apparus positifs. Les résultats obtenus pour le manteau peuvent s'expliquer par la présence d'inhibiteurs de PCR dans les tissus des palourdes. La faible détection du parasite à partir des échantillons d'hypnospores peut s'expliquer par la nature même des cellules. En effet, les hypnospores ont une paroi épaisse et résistante notamment à la soude. La lyse de ces cellules est donc difficile et de ce fait les acides nucléiques restent peu accessibles. En revanche, la présence de différents stades de croissance du parasite dans les échantillons de culture permet l'obtention de plus grandes quantités d'ADN tout en s'affranchissant des problèmes liés aux tissus.

De plus, pour le manteau et les hypnospores des problèmes de smears ont été observés pour 50% des échantillons alors que ce problème n'a pas été observé avec les cultures (*figure 12*). Un contrôle de la pureté de l'ADN a été réalisé par dépôt de l'ADN extrait à partir de tissus sur gel d'agarose 0.8%. Les résultats obtenus semblent montrer une dégradation de l'ADN qui pourrait se traduire après PCR par des smears. Ceci peut-être dû à la présence de substances dans les tissus qui pourraient dégrader l'ADN. Après étude des diverses publications scientifiques sur la détection et la caractérisation des parasites du genre *Perkinsus* (Reece et al, 1997, Reece et al, 2001, Abollo et al, 2006, Burrenson et al, 2005, Audemard et al, 2004) il est apparu que les cultures

étaient le type d'échantillons le plus utilisé. Cependant dans notre cas, le matériel n'était disponible que pour quelques sites. Cette étude bibliographique a également montré que dans la plupart des cas, les tissus utilisés étaient fixés à l'alcool or dans notre cas, les tissus étaient congelés sans cryoprotecteur ce qui pourrait avoir également contribué à la dégradation de l'ADN. Cette hypothèse reste encore à vérifier en utilisant des tissus frais de palourdes infectées.

Un autre couple d'amorces décrit par Park et al. (2006) a été testé, les résultats ont montré que des amorces fonctionnent également pour les cultures. Pour les tissus et hyphes elles éliminent les problèmes de smears mais ne permettent pas d'avoir des résultats positifs pour tous les échantillons.

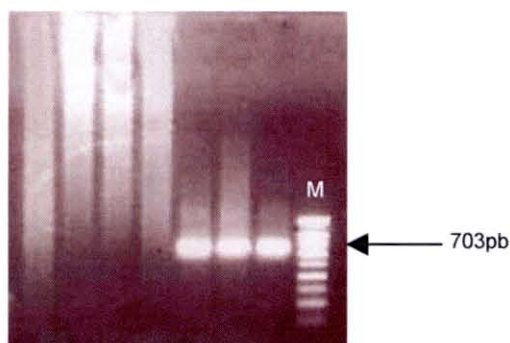


Figure12: Résultats d'une PCR PerKITS sur des échantillons de type manteau lot05-057 (A) et des cultures lot06-021 (B) extraits en Quiagen
M: marqueur de taille 100pb smart ladder (eurogentec)

Ces résultats ont donc permis de sélectionner principalement les échantillons de type culture et après extraction au minikit Quiagen pour lesquels on a obtenu le plus de résultats positifs et le moins de problèmes de smears avec la PCR utilisant les amorces « PerKITS » décrites par Casas et al. (2002) et celles décrites par Park et al. (2006).

B. Caractérisation du *Perkinsus* présent par secteur

Dans un premier temps, le degré de variabilité du parasite *Perkinsus* a été déterminé par PCR RFLP entre les différents secteurs géographiques pour lesquels des cultures étaient disponibles ou pour lesquels des échantillons de manteau ont permis l'obtention d'amplicons en PCR.

Secteurs géographiques	Lieux	Numéro de lots	Individu n°	Nature de l'échantillon	Profil PCR RFLP		Profil PCR RFLP après clonage			Séquencage
					<i>RsaI</i>	<i>HinfI</i>	PCR PerKITS sur 20 clones	<i>RsaI</i>	<i>HinfI</i>	
Arcachon	Les Argiles	06-021	14	culture	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
			13	culture	profil PO/PM	profil PO	NF	19 profil PO	19 profil PO	NF
			11	culture	profil PO/PM	profil PO	17+	17 profil PO	16 profil PO 1profil 363pb-160/150pb-100pb (clone 14)	14
	Château Madère	05-067	3p2	culture	profil PO/PM	profil PO	10+ sur 10	10 profil PO/PM	10 profil PO	1 5 8
			3p2/1	culture	profil PO/PM	profil PO	12+	12 profil PO/PM	12 profil PO	10
Leucate	Nord2	05-069	2p2	culture	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
			4p3	culture	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
			6p1	culture	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
			1	culture	profil PO/PM	profil PO	16+	16 profil PO/PM	13 profil PO 3 profil 363pb-160/150pb-90pb (clones 6-8-12)	8 4
			4p1	culture	profil PO/PM	profil PO	3+	3 profil PO/PM	3 profil PO	10
	Nord1	05-068	1p3	culture	248pb-198/167pb-75pb PC	200pb-160pb-60pb	2+	2 profil PC	2 profil 200pb-160pb-60pb	1 13
			4p1	culture	248pb-198/167pb-75pb PC	200pb-160pb-60pb	10+ sur 10	10 profil PC	10 profil 200pb-160pb-60pb	1 5 8
			6p1	culture	profil PO/PM	profil PO	12+	12 profil PO/PM	10 profil PO 1profil 200pb-160pb-60pb (clone 11)	12_2
							10+ sur 10	10 profil PO/PM	10 profil PO	
			5p3	culture	profil PO/PM	profil PO	10+	10 profil 413pb-193pb-120pb-74pb	7 profil PO 2 profil 700pb-160/150pb (clone 5-9)	11_13_5_9_4
Golfe du Morbihan	Ile Tascon	05-063	2	culture	profil PO/PM	profil PO	15+ sur 32	15 profil PO/PM	15 profil PO	5
			1	culture	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
			6	culture	douteux	profil PO	3+ sur 13	3 profil PO/PM	3 profil PO	NF
	Le Lerm	05-064	2p2	culture	douteux	profil PO	11+	11 profil PO/PM	11 profil PO	10
			2	culture	douteux	profil PO	NF	NF	NF	NF
			2 clone	culture	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
			2/3	culture	douteux	profil PO	NF	NF	NF	NF
3p1	culture	douteux	profil PO	3+ sur 10	3 profil PO/PM	3 profil PO	NF			
Arcachon	Château Madère	05-067	49	tissus/ hydnospores	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
			57	tissus	profil PO/PM		NF	NF	NF	NF
			41	tissus/ hydnospores	profil PO/PM		NF	NF	NF	NF
	Piréou	04-099	15	tissus	NF	NF	NF	NF	NF	NF
			16	tissus	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Leucate	Nord1	05-068	45	tissus	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
			36	tissus	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
			35	tissus			0+ sur 10	NF	NF	NF
			44	tissus			1+ sur 15	1 profil PO/PM	1 profil PO	NF
			33	tissus	NF	NF	NF	NF	NF	NF
	34	tissus	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF		
	Sortie Grau	04-069	23	tissus/ hydnospores	NF	NF	NF	NF	NF	NF
			21	tissus/ hydnospores	NF	NF	NF	NF	NF	NF
25			tissus	NF	NF	NF	NF	NF	NF	
Etang de Thau	Méze	05-057	9	hydnospores	NF	NF	NF	NF	NF	NF
			24	hydnospores	NF	NF	NF	NF	NF	NF
			39	tissus	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
Normandie	Blainville sur Mer	05-043	33	tissus	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
			46	tissus	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
			49	tissus	profil PO/PM	profil PO	NF	NF	NF	NF
Golfe du Morbihan	Ile aux oiseaux	04-085	59	tissus	NF	NF	NF	NF	NF	NF
			1	hydnospores	NF	NF	NF	NF	NF	NF
			3	hydnospores	NF	NF	NF	NF	NF	NF
			13	hydnospores	NF	NF	NF	NF	NF	NF
			15	hydnospores	NF	NF	NF	NF	NF	NF
16	hydnospores	NF	NF	NF	NF	NF	NF			
21	hydnospores	NF	NF	NF	NF	NF	NF			

Tableau 11: Résultats positifs à *Perkinsus* sp. obtenus en PCR RFLP avant et après clonage sur les lots testés. NF : non fait ; pb : paire de base ; zone grisée : ininterprétable
 Profil PO/PM après digestion *RsaI*: *P. olseni*/P. marinus 413pb-193pb-74pb
 Profil PO après digestion *HinfI*: *P. olseni* 363pb-160pb
 Profil PC après digestion *RsaI* : 248pb-198/167pb-75pb

Ainsi, il a été possible d'obtenir des résultats positifs en PCR PerkITS ou ParkITS pour 49 échantillons (*tableau 11 et figure 13*). La digestion enzymatique par *Rsal* et *Hinfl* des produits obtenus révèle un profil type *Perkinsus olseni* (*Rsal*: 413pb-193pb-74pb; *Hinfl*: 363pb-160pb) pour l'ensemble des échantillons excepté deux individus provenant de Leucate (*tableau 11 et figure 14-15*). De plus, 4 échantillons de tissus testés pour lesquels les produits de PCR étaient de faible intensité n'ont pas donné de résultats permettant de déterminer un profil après digestion (05-067 individus 57 et 41 et 05-068 individus 35 et 44).

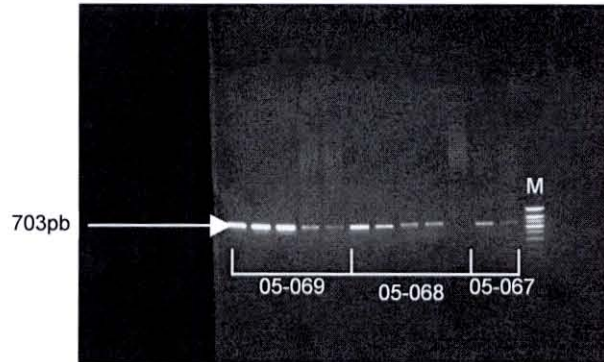


Figure 13: Résultats d'une PCR PerkITS sur des échantillons de type culture extraits en Quiagen
M: marqueur de taille 100pb smart ladder (eurogentec)

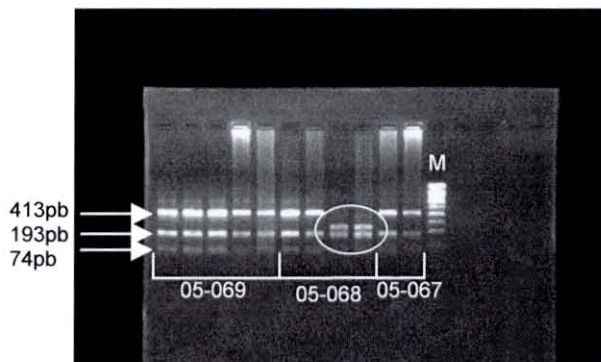


Figure 14: Résultats de la digestion enzymatique *Rsal*
M: marqueur de taille 100pb smart ladder (eurogentec)

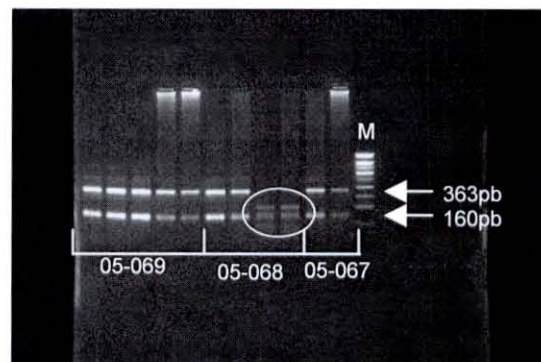


Figure 15: Résultats de la digestion enzymatique *Hinfl*
M: marqueur de taille 100pb smart ladder (eurogentec)

La présence d'une éventuelle coinfection par différentes souches voire espèces de parasite du genre *Perkinsus* a ensuite été déterminée par PCR RFLP après clonage des produits de PCR obtenus pour quelques individus positifs. Les produits de PCR PerkITS obtenus à partir de 18 échantillons correspondant tous à des cultures ont été clonés. 10 à 20 clones par échantillons ont été analysés par PCR. De 1 à 19 produits positifs en fonction des échantillons ont pu être digérés par *Rsal* et *Hinfl*. Les résultats obtenus sont homogènes entre clones ; les cultures semblent correspondre à des cellules d'une même souche de *Perkinsus* (*tableau 11*), c'est-à-dire *Perkinsus olseni* pour la plupart des échantillons et *Perkinsus chesapeaki* pour les échantillons 1p3 et 4p1 du lot 05-068 provenant de Leucate.

Cependant, pour certains échantillons quelques clones présentaient un profil de restriction différent. Ces résultats peuvent traduire une coinfection par différentes souches d'une même espèce ou une coinfection d'un individu par plusieurs espèces de *Perkinsus*. Ainsi, pour l'individu 05-067 3p2/1 provenant d'Arcachon, un clone sur 16 présentait un profil non attendu (406pb-118pb-74/75pb) après digestion par *Rsal* (*figure 17*) et un autre clone présentait également un profil non attendu (700pb-160/150pb) après digestion par *Hinfl*. Un profil non attendu (363pb-160/150pb-100pb) a aussi été obtenu pour un clone sur 17 de l'échantillon 06-021 11 et pour 3 clones sur 16 de l'échantillon 05-069 1. De plus, Pour l'individu 5p3 du lot 05-068 une bande à environ 120pb pouvant indiquer la présence d'un site de restriction supplémentaire est apparue pour tous les clones après digestion par *Rsal* (*figure 16*). La digestion de ces mêmes clones par *Hinfl* révèle des profils de restriction de type *Perkinsus olseni* pour tous les clones à l'exception de 2 clones (700pb-160/150pb).

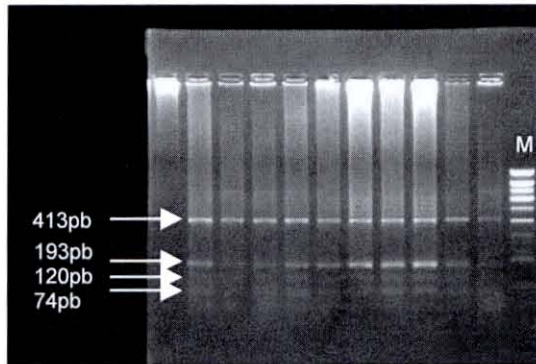


Figure 16: Résultats de la digestion enzymatique *RsaI* après clonage Lot 05-068 individu 5p3

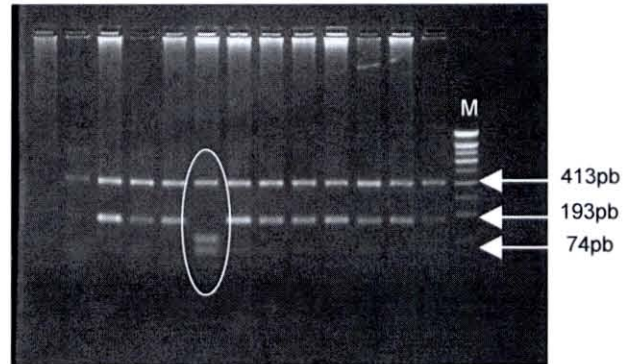


Figure 17: Résultats de la digestion enzymatique *RsaI* après clonage Lot 05-067 individu 3p2/1

Ces résultats semblent montrer que *Perkinsus chesapeaki* est présent chez 2 individus provenant du site de Leucate. D'autre part, les résultats obtenus après clonage montrent qu'il existe peut-être une coinfection de plusieurs souches et/ou espèces de *Perkinsus* chez certains individus. Afin de déterminer ou de confirmer à quelles espèces du genre *Perkinsus* ou à quelles souches de *Perkinsus olseni* ces profils correspondent, des travaux complémentaires de séquençage sont nécessaires.

C. Séquençage

26 clones dont ceux ayant présenté des profils de restriction non décrits par Abollo et al. (2006) ont été sélectionnés pour être séquencés à l'aide du séquenceur Genetic Analyser (tableau 11). Les séquences obtenues ont été analysées en utilisant le logiciel BLAST (Altschul et al, 1990) du National Center for Biotechnology Information (NCBI) puis analysées en utilisant l'algorithme de CLUSTALW (Thompson et al, 1994).

Secteurs géographiques	Lieux	Numéro de lots	Individu n°	Clone	Profils de restriction	Résultats (Blast)		
						Espèce	Identité	nucléotides similaires / nucléotides totaux
Arcachon	Château Madère	05-067	3p2	10	PO	<i>P. olseni</i>	99%	671/673
				12	PO	<i>P. olseni</i>	100%	673/673
			3p2/1	6	406pb-118pb-74/75pb	<i>P. olseni</i>	99%	667/673
				16	PO	<i>P. olseni</i>	99%	671/673
				13	700pb-160/150pb	<i>P. olseni</i>	99%	671/674
	Les Argiles	06-021	11	14	363pb-160/150pb-90pb	<i>P. olseni</i>	99%	672/673
				1	PO	<i>P. olseni</i>	99%	534/539
				5	PO	<i>P. olseni</i>	99%	535/538
				8	PO	<i>P. olseni</i>	99%	536/538
				10	PO	<i>P. olseni</i>	99%	612/614
Leucate	Nord2	05-069	4p1	10	PO	<i>P. olseni</i>	99%	612/614
				4	PO	<i>P. olseni</i>	99%	671/675
			1	8	363pb-160/150pb-90pb	<i>P. olseni</i>	99%	671/673
	Nord1	05-068	1p3	1	PC	<i>P. chesapeaki</i>	97%	670/689
				13	PC	<i>P. chesapeaki</i>	97%	671/689
			6p1	12	PO	<i>P. olseni</i>	100%	673/673
				2	PO	<i>P. olseni</i>	99%	671/674
			5p3	11	<i>RsaI</i> : 413pb-193pb-120pb-74pb <i>HinfI</i> : PO	<i>P. olseni</i>	100%	672/672
				13	<i>RsaI</i> : 413pb-193pb-120pb-74pb <i>HinfI</i> : PO	<i>P. olseni</i>	100%	673/673
				5	<i>RsaI</i> : 413pb-193pb-120pb-74pb <i>HinfI</i> : 700pb-160/150pb	<i>P. olseni</i>	99%	671/674
				4	<i>RsaI</i> : 413pb-193pb-120pb-74pb <i>HinfI</i> : PO	<i>P. olseni</i>	99%	670/675
				9	<i>RsaI</i> : 413pb-193pb-120pb-74pb <i>HinfI</i> : 700pb-160/150pb	<i>P. olseni</i>	99%	671/674
				1	PC	<i>P. chesapeaki</i>	97%	545/557
	4p1	5	PC	<i>P. chesapeaki</i>	97%	541/556		
		8	PC	<i>P. chesapeaki</i>	97%	545/557		
	Golfe du Morbihan	Ile Tascon	05-063	2	5	PO	<i>P. olseni</i>	99%
Le Lem		05-064	2p2	10	PO	<i>P. olseni</i>	99%	535/538

Tableau 12: Résultats du séquençage selon le profil obtenu en PCR-RFLP après clonage sur les lots testés

Profil PO/PM après digestion *RsaI*: *P. olseni*/*P. marinus* 413pb-193pb-74pb

Profil PO après digestion *HinfI*: *P. olseni* 363pb-160pb

Profil PC après digestion *RsaI*: 248pb-198/167pb-75pb

Remarque : L'espèce retenue suite à l'analyse de la séquence par BLAST correspond au groupe présentant le maximum d'homologie avec la séquence obtenue.

Toutes les séquences correspondent à *Perkinsus olseni* exceptées pour 2 individus de Leucate correspondant au *Perkinsus* type *P.chesapeakei* :

- 05-068 1p3 2 clones
- 05-068 4p1 3 clones

Des identités allant de 99% à 100% pour *Perkinsus olseni* et 97% pour *P.chesapeakei* ont été obtenues (tableau 12).

Pour les autres clones dont le profil de restriction était inattendu, le séquençage a montré une homologie de 99% avec *Perkinsus olseni*.

Ces résultats sont bien illustrés par le phylogramme de la figure 18 obtenu à l'aide du logiciel PhiloWin. Les 5 clones correspondant à *Perkinsus chesapeakei* se relient bien au sein du groupe « *chesapeakei* » sur ce phylogramme de type Neighbor joining dont les valeurs de bootstrap n'apparaissent que si elles sont supérieures à 70.

On retrouve également les séquences de clones correspondant à *P.olseni* dans le groupe de *P.olseni* mais plus éclatées, ce qui peut laisser entendre une variabilité génétique.

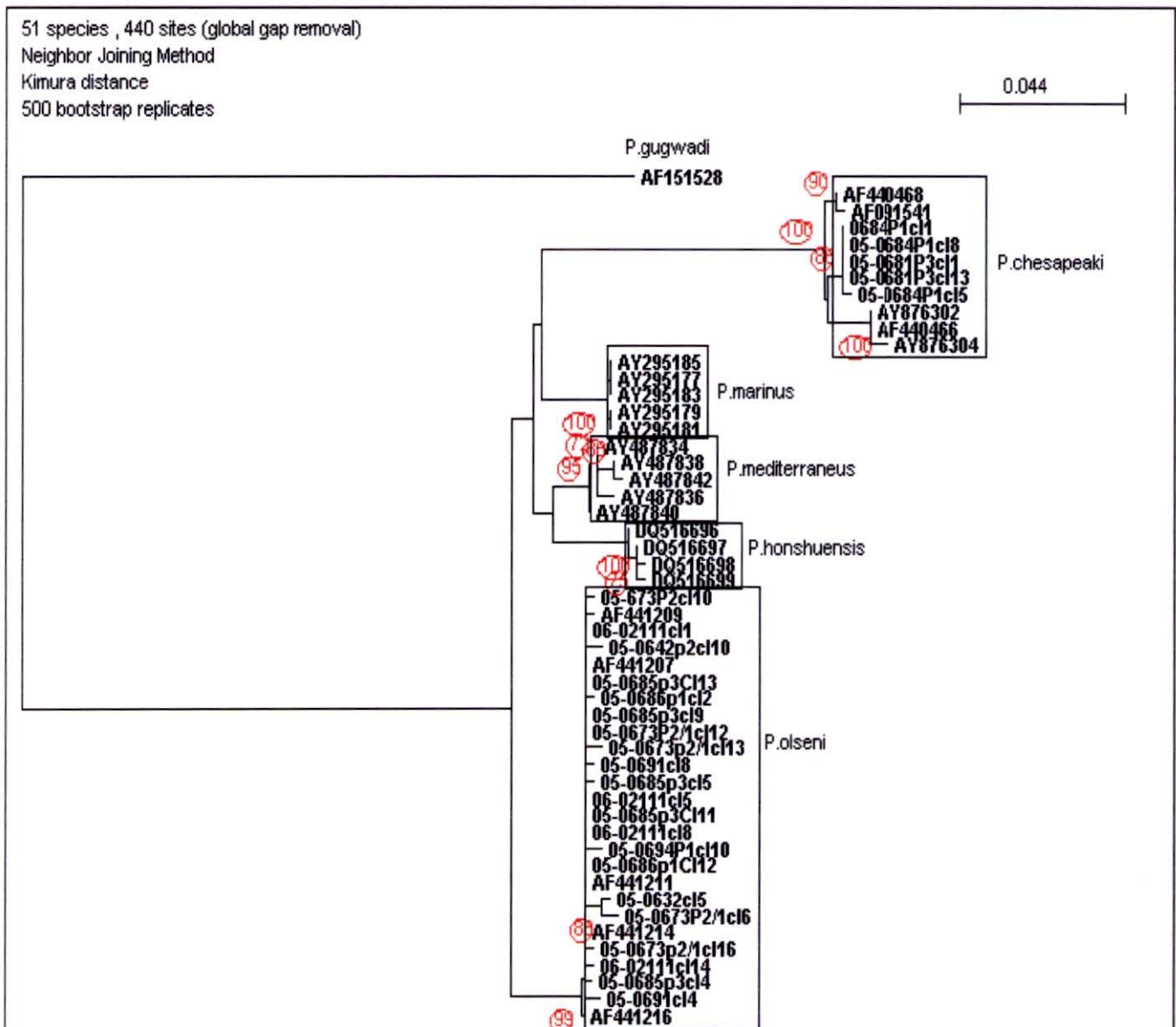


Figure 18: Phylogramme de type Neigbor joining.
 Valeurs de bootstrap > 70 ; 500 replicats.
 (Kimura parameter 2)

Conclusion

L'objectif du stage était de caractériser d'un point de vue moléculaire le parasite du genre *Perkinsus* affectant les palourdes en France et d'en étudier le polymorphisme génétique en fonction de son origine géographique mais également entre individus d'un même secteur et en intra-individuel.

L'outil PCR RFLP a permis de compléter l'image que l'on a de la perkinsose en France. Ainsi, il en ressort que l'espèce présente sur les sites géographiques étudiés est principalement *Perkinsus olseni*. Cependant, des profils non attendus ont permis de mettre en avant une variabilité entre individus (Leucate) mais également en intra-individuel après clonage (Arcachon).

Malgré les quelques résultats obtenus, la quantité de secteurs testés est faible (Arcachon: Les Argiles et Château Madère, Leucate: Nord 1 et 2, Golfe du Morbihan: Ile Tascon, Etang de Thau: Mèze). En effet, des problèmes ont été rencontrés pour l'extraction de l'ADN des échantillons de manteau contenant peut-être des inhibiteurs de PCR ou des substances dégradant l'ADN mais également pour l'extraction à partir d'hypnospores dont la paroi est très résistante. Seules les cultures pour lesquelles peu de secteurs étaient disponibles ont permis une extraction d'ADN efficace. D'autre part, la pertinence du protocole de PCR RFLP peut-être remise en question car des profils non représentés par Abollo et al (2006) ont été obtenus pour deux individus de Leucate (05-069 1 et 05-068 5p3) et deux individus de Arcachon (06-021 11 et 05-067 3p2/1).

Les informations obtenues par séquençage permettent de conclure que ces individus et ces clones présentant un profil de restriction non attendu sont probablement infectés par des variants génétique de *Perkinsus olseni*. Cependant, les résultats sont à compléter par d'autres analyses sur d'autres secteurs géographiques en réalisant des tests sur manteaux et hypnospores dont l'analyse est plus facile à mettre en place en diagnostic de routine (pas d'étape supplémentaire de mise en culture). Du manteau de palourdes fraîches infectées pourrait être testé en privilégiant la fixation des tissus à l'éthanol plutôt que la congélation et des tests d'extraction après immersion dans l'azote liquide ou sonication pourraient être réalisés sur les hypnospores pour essayer de détruire leur paroi afin d'avoir un meilleur accès aux acides nucléiques. D'autres couples d'amorces sont disponibles et pourraient également être testés.

La variabilité génétique observée pourrait être associée à des différences de virulence potentielles parmi les souches. En effet, Leucate et Arcachon ayant les plus fortes prévalences en *Perkinsus* sont les deux seuls secteurs pour lesquels des profils de restriction différents ont été obtenus. L'existence de souches de *Perkinsus marinus* en fonction de l'origine géographique a été rapportée et mise en relation avec des différences de virulence aux Etats-Unis (Reece et al, 2001). Une situation équivalente pourrait exister pour *Perkinsus olseni*, un parasite à large spectre d'hôte et présent dans de nombreuses régions du monde.

D'autre part, deux espèces ont été détectées sur les sites géographiques étudiés : *Perkinsus olseni* et *P.chesapeaki* ce dernier, uniquement sur Leucate.

C'est la première fois que la présence de *Perkinsus chesapeaki* est rapportée en Europe.

Cependant, sa présence est décrite aux Etats-Unis mais reste inexplicée en France.

Les principales espèces hôtes de ce parasite présentes en Europe sont (Bower et McGladdery, 2005 ; Quéro et al, 1998 ; Hayward et al, 1996) :

- *Mercenaria mercenaria* importé des Etats-Unis. Il est présents pour l'Atlantique en Grande-Bretagne, au Pays-Bas, en Belgique en France principalement dans le bassin de la Seudre, au Portugal, dans le sud de l'Espagne et au Maroc. En Méditerranée, il n'y en a qu'en haute Adriatique et en Sicile.
- *Macoma balthica* est présents de la Norvège arctique jusqu'aux côtes atlantique du Portugal.
- *Mya arenaria* est présents dans le Pacifique Nord, en mer Blanche, en mer du Nord, en Manche, dans le Nord-Ouest et le Nord-Est de l'Atlantique jusqu'au sus de la péninsule Ibérique, en Adriatique et en mer Noire.

Ces résultats nécessitent d'être complétés par des analyses moléculaires ciblant d'autres gènes tels que l'actine ou LSU. Par ailleurs, considérant le faible nombre d'individus analysés, ces résultats doivent également être complétés par la caractérisation du parasite sur un plus grand nombre d'échantillons.

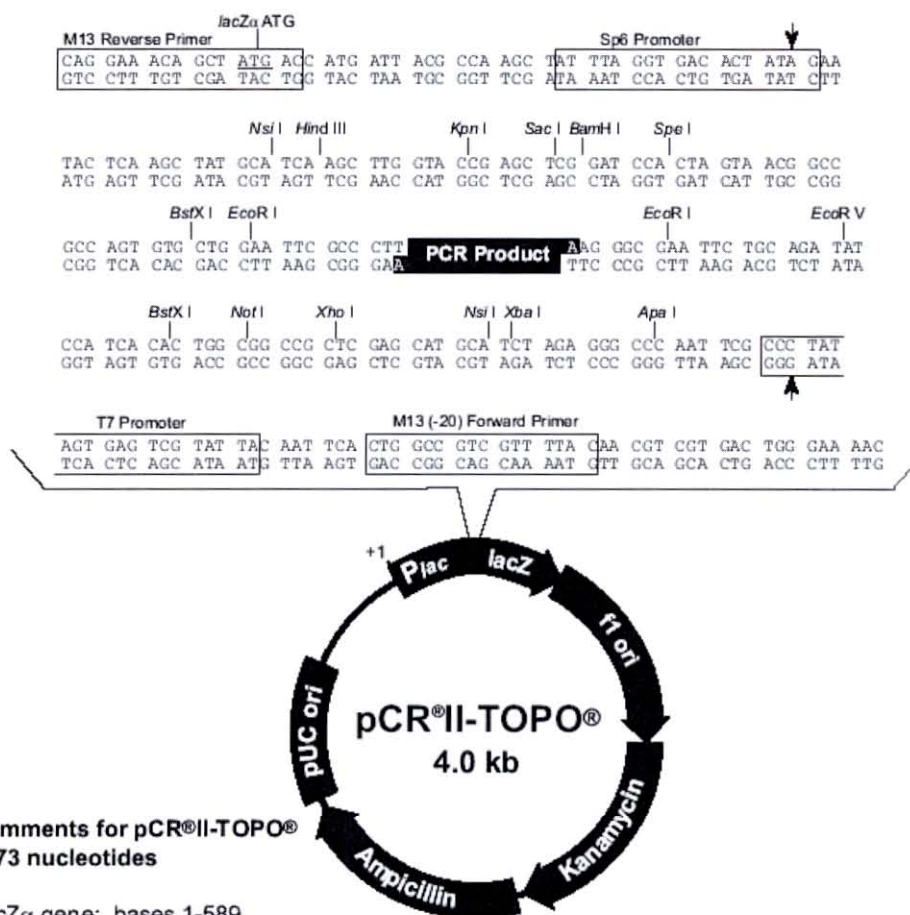
Annexe 1

Récapitulatif des lots testés

Secteurs géographiques	Lieux	Numéro de lots	Nombre d'individus analysés	Nombre d'individus infectés	Fréquence de détection %	Nb moyen Perkinsus / g branchies
Arcachon	Les Argiles	06-021	24	13	54	6166,71
	Château Madère	05-067	30	28	93,33	75 404,45
	Piréou	04-099	30	30	100,00	176 525,31
Leucate	Nord1	05-068	30	29	96,67	84 421,75
	Nord2	05-069	30	30	100,00	39 497,46
	Sortie Grau	04-069	30	30	100,00	146 053,39
Golfe du Morbihan	Est Tascon	05-063	30	12	40,00	9 889,14
	Le Lern	05-064	30	9	30,00	2 802,18
	Ile aux oiseaux	04-085	30	21	70,00	43 909,81
Etang de Thau	Mèze	05-057	22	20	90,91	33 401,60
Normandie	Blainville sur Mer	05-043	30	25	83,33	65 716,78

Annexe 2

Carte du vecteur pCR®2.1 (www.invitrogen.com)



Annexe 3

Composition du milieu de culture LB (Luria-Bertani)

Peptone de caséine 10 g/L

Extrait de levure 5 g/L

NaCl 10 g/L

(Agar agar 12 g/L)

pH 7.0

Dissoudre 37g de milieu pour un litre d'eau pour LB agar et 25g pour LB bouillon.

Après autoclavage ajout de 1 mL d'ampicilline à 50 mg/mL

Conservation des milieux à 4°C.

Annexe 4

Protocole de culture in vitro de cellules de branchies de palourde

Toutes les étapes se font sous la hotte à flux laminaire avec du matériel stérile.

- Nettoyer et sécher la palourde à l'aide d'un papier absorbant.
- L'ouvrir à l'aide d'un couteau.
- Prélever les deux feuillets d'une branchie.
- Les mettre dans 10 mL d'eau de mer stérile et les rincer 3 fois. Renouveler l'eau de mer stérile entre chaque rinçage.
- Les décontaminer 2 fois dans une solution d'antibiotiques renouvelée entre les deux décontaminations pendant 30 min.
- Les rincer 3 fois dans 10 mL d'eau stérile.
- Les placer dans un microtube contenant 250 µL d'eau de mer stérile et les broyer à l'aide d'un piston.
- Ajouter 750 µL d'eau stérile et mélanger
- Filtrer le broyat sur un filtre 100 µm.
- Ensemencer 100 µL de filtrat dans 1 mL de milieu DMEM/HAM's
- Incuber les plaques à 26°C en chambre humide.

Bibliographie

- Abollo, E., Casas, S.M., Ceschia, G. & Villalba, A. 2006.** Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Molecular and cellular probes*. vol20 N°6: p323-329.
- Agreste Cahiers Conchyliculture, 2005.** Recensement de la conchyliculture 2001. *Ifremer*. N°1: p89.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. 1990.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* vol215: p403-410.
- Andrews, J.D. 1996.** History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *J Shellfish Res.* vol15 N°1: p13-16
- Audemard, C., Reece, K.S. & Bureson, E.M. 2004.** Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*. vol70: p6611-6618.
- Audemard, C., Ragone-Calvo, L.M., Paynter, K.T., Reece, K.S. & Bureson, E.M. 2006.** Real-time PCR investigation of parasite ecology: in situ determination of oyster parasite perkinsus marinus transmission dynamics in lower Chesapeake bay. *Parasitology*. vol132: 827-842.
- Auzoux-Bordenave, S., Vigario, A.M., Ruano, F., Domart-Coulon, I. & Doumenc, D. 1995.** In vitro sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *Journal of Shellfish Research*. vol14 N°2: p469-475.
- Azevedo, C. 1989.** Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of clams, *Ruditapes decussatus*, from Portugal. *J. Parasitol.* vol75: p627-635.
- Bassem, A. & Le Pennec. 1998.** Rôle des fluides extrapalléaux des bivalves dans la défense immunitaire: cas de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage, *Ruditapes philippinarum* [en ligne]. Université de Brest - CNRS. Disponible sur //cat.inist.fr.
- Bower, S.M. & McGladdery, S.E. 2005.** Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish [en ligne]. Disponible sur http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/toc_e.htm
- Bureson, E.M., Reece, K.S. & Dungan, C.F. 2005.** Molecular, Morphological, and Experimental Evidence Support the Synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. *J. Eucaryot. Microbiol.* vol52 N°3: p258-270.
- Casas, S.M., Villalba, A. & Reece, K.S. 2002.** Study of the perkinsosis of the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis. Aquat. Org.* vol50: p51-65.
- Casas, S.M., Grau, A., Reece, K.S., Apakupakul, K., Azevedo, C. & Villalba, A. 2004.** *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*. vol58: p231-244.
- Caceres-Martinez, J., Vasquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizabal, G. & Del Río Portilla, M.A. 2008.** *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *J Invertebr Pathol*.
- Chagot, D., Comps, M., Boulo, V., Ruano, F. & Grizel, H. 1987.** Histological study of a cellular reaction in *Ruditapes decussatus* infected by a protozoan. *Aquaculture*. vol67: p260-261.
- Choi, K.S., Wilson, E.A, Lewis, D.H., Powell, E.N. & Ray, S.M. 1989.** The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. *Journal of Shellfish Research*. vol8 N°1: p125-131.

- Chomczynski, P., Mackey, K., Drews, R. & Wilfinger, W. 1997.** DNAzol: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques*. vol22: p550-553.
- CNC. 2006.** La conchyliculture française [en ligne]. Disponible sur <http://www.huitre.com/maj/presse/documents/conchyliculture2006.pdf>
- Cremonte, F., Balseiro, P. & Figueras, A. 2005.** Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms*. vol64: p85-90.
- DaRos, L. & Canzonier, W.J. 1985.** *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the Mediterranean basin. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. vol5: p23-25.
- Dungan, C.F., Hamilton, R.M., Hudson, K.L., McCollough, C.B. & Reece, K.S. 2002.** Two Epizootic Diseases in Chesapeake Bay Commercial Clams *Mya arenaria* and *Tagelus plebeius*. *Diseases of Aquatic Organisms*. vol50: p67-78.
- FAO. 2007.** *La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture, 2006*. FAO Département des pêches, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. FAO, Rome. p162. Disponible sur <http://www.fao.org/docrep/009/A0699e/A0699e00.htm>
- Garcia, C., Arzul, I., Chollet, B., François, C., Goubet, A., Joly, J.P., Miossec, L. & Robert, M. 2004.** Bilan 2004 du réseau REPAMO. LGP de la Tremblade. p23-32.
- Garcia, C., Arzul, I., Chollet, B., François, C., Goubet, A., Joly, J.P., Miossec, L. & Robert, M. 2005.** Bilan 2005 du réseau REPAMO. LGP de la Tremblade. p21-34.
- Garcia, C., Ricardo, L. & Arzul, I. 2008** Parasites of the genus *Perkinsus*. *Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry*. Villalba, A. p18-31
- Goggin, C.L. & Lester, R.J.G. 1995.** *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* vol46: p639-646.
- Hayward, P., Nelson-Smith, T. & Shields, C. 1996.** Guide des bords de mer. *Lausanne : Delachaux et Niestlé*. p351.
- Hine, P.M. 2001.** Problems of applying risk analysis to aquatic organisms. In: Rodgers CJ (ed) Risk analysis in aquatic animal health. *Office Internationale des Epizooties, Paris*. p71-82.
- Hopkins, J., Fowler, R., Krishna, S., Wilson, I., Mitchell, G. & Bannister, L. 1999.** The plastid in *Plasmodium falciparum* asexual blood stages: a three-dimensional ultrastructural analysis. *Protist*. vol150: p283-295.
- La Peyre, J.F., Chu, F.L.E. & Meyers, J.M. 1995.** Haemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish and Shellfish Immunology*. vol5: p179-190.
- La Peyre, J.F. & Faisal, M. 1995.** Improved method for the initiation of continuous cultures of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa). *Transactions of the American Fisheries Society*. vol124: p144-146.
- Lester, R.J.G. & Davis, G.H.G. 1981.** A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone, *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.* vol37: p181-187.
- Mackin, J.G., Malcolm, H. & Collier, A. 1950.** Preliminary Note on the Occurrence of the New Protistan Parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica*. *Science*. vol111 N°. 2883: p328-329.
- Mackin, J.G. & Ray, S.M. 1966.** The taxonomic relationship of *Dermocystidium marinum*, Mackin, Owen and Collier. *J. Invert. Pathol.* vol8: p544-545.

- Marsh, A.G., Gauthier, J.D. & Vasta, G.R. 1995.** A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Parasitol.* vol81: 577–583.
- McLaughlin, S.M. & Faisal, M. 2000.** Prevalence of *Perkinsus* spp. in Chesapeake Bay soft-shell clams, *Mya arenaria* Linnaeus, 1758 during 1990-1998. *Journal of Shellfish Research.* vol19: 349-352.
- Miossec, L. 2006.** Infection of two species of clams by *Perkinsus olseni* in France, DIPnet - Disease Interactions and Pathogen exchange between farmed and wild aquatic animal populations. *A European network. Newsletter.* vol43: p2. Disponible sur <http://www.dipnet.info/>
- Moss, J.A., Xiao, J., Dungan, C.F. & Reece, K.S. 2008.** Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. Parasite in Oysters of Southern China. *J. Eucaryot. Microbiol.* vol55 N°2: p117-130.
- Norton, J.H., Shepherd, M.A., Perkins, F.O. & Prior, H.C. 1993.** *Perkinsus*-like infection in farmed golden-lipped pearl oyster *Pinctada maxima* from the Torres Strait, Australia. *Journal of Invertebrate Pathology.* vol62: p105-106.
- O'Donoghue, P.J., Phillips, P.H. & Shepherd, S.A. 1991.** *Perkinsus* (Protozoa: Apicomplexa) infections in abalone from South Australian waters. *Transactions of the Royal Society of South Australia.* vol115: p77-82.
- OIE. 2006.** Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals [en ligne]. Disponible sur http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm
- Park, K.I. & Choi, K.S. 2001.** Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. *Aquaculture.* vol203: p9–22.
- Park, K.I, Ngo, T. T.T., Choi, S.D., Cho, M. & Choi K.S. 2006.** Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedoensis* in Korean waters. *Journal of Invertebrate Pathology.* vol93 :81-87.
- Perkins, F.O. 1966.** Life history studies of *Dermocystidium marinum*, an oyster pathogen. Dissertation. Florida State University. p273.
- Quéro, J.C. et al. 1998.** Les fruits de mer et plantes marine des pêches françaises. *Lausanne : Delachaux et Niestlé.* p256.
- Ray, S.M. 1952.** A culture technique for diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier in oysters. *Science.* vol116 N°3014: p360-361
- Reece, K.S., Bushek, D. & Graves, J.E. 1997.** Molecular markers for population genetic analysis of *Perkinsus marinus*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology.* vol6 N°3: p197-206.
- Reece, K.S., Siddall, M.E, Burreson, E.M. & Graves, J.E. 1997.** Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *Journal of Parasitology.* vol83 N°3: p417-423.
- Reece, K.S., Bushek, D., Hudson K.L. & Graves, J.E. 2001.** Geographic distribution of *Perkinsus marinus* genetic strains along the Atlantic and Gulf coasts of the USA. *Marine Biology.* vol139: p1047-1055.
- Robledo, J.A.F., Gauthier, J.D., Coss, C.A., Wright, A.C. & Vasta, G.R. 1998.** Species-specificity and sensitivity of a PCR-based assay for *Perkinsus marinus* in the eastern Oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with the fluid thioglycollate assay. *J. Parasitol.* vol84: p1237–1244.
- Ruano, F., 1985.** The massive mortality of the clams, *Venerupis* sp. on the coast of Algarve, to associated Dermocystidiose. *First Colóq. Iberian Delctiopatologia.*

- Sanger, F. & Coulson, A.R. 1975.** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* vol94: p441–448.
- Teles-Grilo, M.L., Tato-Costa, J., Duarte, S.M., Maia, A., Casal, G. & Azevedo, C. 2007.** Is there a plastid in *Perkinsus atlanticus* (Phylum Perkinsozoa) ? *European Journal of Protistology.* vol43: p163-167.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994,** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.* vol22: p4673-4680.
- Tirard, C.T., Grossfeld, R.M., Levine, J. & Kennedy-Stoskopf, S. 1995.** Effect of hyperthermia in vitro on stress protein synthesis and accumulation in oyster haemocytes. *Fish shellfish immunol.* vol5: p9-25.
- Villalba, E. European Community Through the Sixth Framework Programme. 2008.** Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry. p163.
- Villalba, A., Reece, K.S., Ordas, M.C., Casas, S.M. & Figueras, A. 2004.** Perkinsosis in mollusc: a review. *Aquatic Living Ressources.* vol17: p411-432.
- Volety, A.K. & Chu, F.L.E. 1994.** Comparison of infectivity and pathogenicity of meront (trophozoite) and prezoosporangiae stages of the oyster pathogen *Perkinsus marinus* in eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *J. Shellfish. Res.* vol13: p521–527.
- Volety, A.K. & Chu, F.L.E. 1997.** Acid phosphatase activity in *Perkinsus marinus*, the protistan parasite of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *The Journal of Parasitology.* vol83: p1093-1098.