

GUENN Julien

Institut Universitaire de Technologie
Département génie biologique
La Rochelle



Diplôme Universitaire et Technologique
Génie biologique
Option industries alimentaires et biologiques

69304
E630 GUE
E

Stage effectué du 18 avril au 24 juin 2006

Etude et optimisation des cultures cellulaires de *Perkinsus olseni* parasite de la palourde



IFREMER La Tremblade
Laboratoire de Génétique et Pathologie

Responsable scientifique : Mr CHOLLET Bruno
Tuteur de stage : Mr DHERBOMEZ Michel

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 03095

Sommaire

I. Présentation de l'IFREMER	2
A. Les missions de l'IFREMER:	2
B. IFREMER Ronce-les-Bains	3
II. Rappels bibliographiques	4
A. Les palourdes <i>Ruditapes philippinarum</i> et <i>Ruditapes decussatus</i>	4
1. Palourdes et répartition géographique	4
2. Ecologie – Biologie	4
3. Système immunitaire et cellules de défense	5
4. Maladies affectant les palourdes	6
B. Le parasite <i>Perkinsus olseni</i>	7
1. Le genre <i>Perkinsus</i> et ses principales espèces	7
2. Historique, distribution et espèces hôtes de <i>Perkinsus olseni</i>	8
3. Cycle de <i>Perkinsus olseni</i>	9
4. Effets sur l'hôte	10
5. Rappels sur la culture de <i>Perkinsus olseni</i>	10
III. Objectifs du stage	12
IV. Mode opératoire	13
A. Animaux analysés	13
B. Protocoles	13
1. Culture <i>in vitro</i> et cryoconservation de <i>Perkinsus olseni</i> .	13
2. Détection et quantification de <i>Perkinsus olseni</i> par la technique au thioglycolate et essai de culture des hypnosporos	17
V. Résultats	18
A. Culture de <i>Perkinsus olseni</i>	18
B. Cultures clonales	20
C. Suivi du cycle	21
D. Essais de cultures à partir des hypnosporos	25
VI. Conclusion, Perspectives	28
VII. Bibliographie	29
• Annexes	32
Annexe 1	33
Annexe 2	34
Annexe 3	36
Annexe 4	38
Annexe 5	39
Annexe 7	42
Annexe 8	43
Annexe 9	44

La conchyliculture connaît depuis une trentaine d'années une progression régulière de ses productions à travers le monde. Elle représente une activité économique importante avec plus de 240 000 tonnes de coquillage produit annuellement en France. Cependant le développement de cette activité peut être limité par des mortalités parfois massives dues à des maladies infectieuses.

L'augmentation des productions peut être expliquée par l'amélioration des méthodes d'élevage grâce à une meilleure connaissance de la biologie des bivalves et des processus physiologiques liés à leur reproduction : l'apparition de l'élevage larvaire en écloserie a permis de pallier le caractère aléatoire et souvent insuffisant du captage naturel.

Ces nouvelles techniques ont permis d'acquérir une certaine indépendance vis-à-vis des pontes naturelles, mais ont entraîné une augmentation des transferts d'animaux entre les bassins conchylicoles, une augmentation des densités de mollusques et le développement d'une espèce cible par bassin.

Ces actions ont contribué à l'apparition et à la dissémination de nouvelles maladies entraînant de très fortes pertes pour la conchyliculture.

De plus, la palourde, comme tous les mollusques marins, présente des caractéristiques biologiques qui laissent peu de possibilités d'actions pour protéger une production vis-à-vis de maladies infectieuses :

- La culture de ces espèces en milieu ouvert rend tout traitement impossible du fait des quantités de substance à utiliser, et de la forte probabilité de contamination des animaux. Cette méthode peut être appliquée dans le cas d'élevages intensifs : écloséries, nurseries.
- Le système immunitaire des mollusques est primitif, ils ne possèdent pas de lymphocytes B et lymphocytes T, ce qui empêche toute réponse immune spécifique et rend la vaccination impossible.

L'absence d'anticorps spécifique complique la recherche d'agent pathogène, celle-ci n'est possible que par un diagnostic direct, essentiellement réalisé grâce à l'histologie ou à la microscopie.

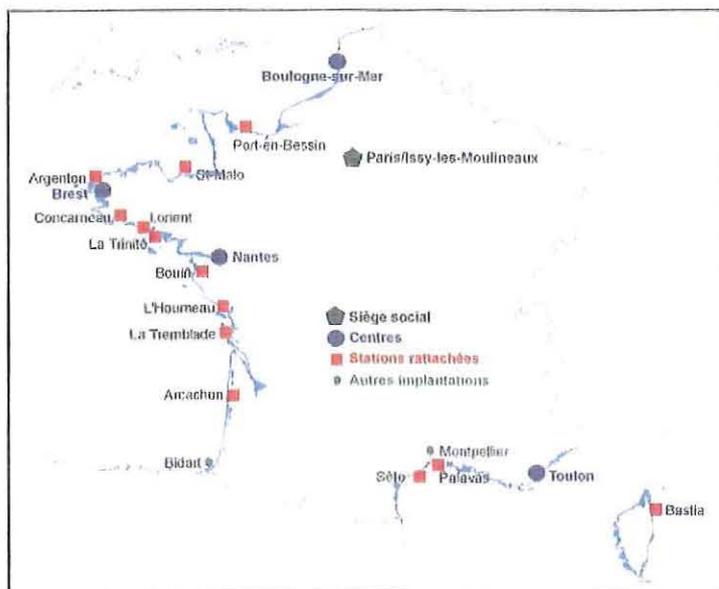
I. Présentation de l'IFREMER

L'IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer est un Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial (EPIC). Créé par le décret du 5 juin 1984, il résulte de la fusion entre le Centre National pour l'Exploitation des Océans (CNEXO) et l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM).

L'IFREMER emploie environ 1300 ingénieurs, chercheurs, techniciens et administratifs. Son budget annuel est d'environ 150 millions d'euros provenant principalement de subventions accordées par l'état.

Cet institut comporte cinq centres (Boulogne sur Mer, Brest, Nantes, Tahiti, Toulon) et 72 laboratoires ou services de recherche répartis sur tout le littoral métropolitain (Figure 1) et dans les départements et territoires d'Outre Mer. (Antilles, Guyane, Polynésie Française, La Réunion, Nouvelle Calédonie).

Figure 1 : Implantations de l'IFREMER en France



A. Les missions de l'IFREMER:

L'IFREMER a 4 missions principales :

- Connaître, évaluer et prévoir l'évolution des ressources des océans afin de permettre leur exploitation durable,
- Améliorer les méthodes de surveillance, de protection et de mise en valeur du milieu marin et côtier,
- Favoriser le développement socio-économique du monde maritime,
- Avoir un rôle de service public, de conseil et d'expertise auprès de l'état, des collectivités territoriales, professionnelles de la mer (marins pêcheurs, aquaculteurs...) et des industriels de la transformation et valorisation de ressources maritimes.

B. IFREMER Ronce-les-Bains

Située au cœur du bassin ostréicole de Marennes-Oléron, premier bassin ostréicole d'Europe (30 000 tonnes d'huîtres produites et 60 000 tonnes commercialisées chaque année), la station IFREMER de Ronce-les-Bains est composée de deux laboratoires effectuant des recherches dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral :

- **Le Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais (LERPC)** créé le 1^{er} Janvier 2004 par la fusion des laboratoires de la Direction de l'Environnement Littoral de La Rochelle et La Tremblade et d'un laboratoire de la Direction des Ressources Vivantes (La Tremblade). Ce nouveau laboratoire, dont le rayon d'action s'étend de Saint Gilles Croix de Vie en Vendée à la rive droite de la Gironde, travaille sur la collecte d'informations sur l'environnement côtier (température, salinité, salubrité...) et sur les espèces bivalves exploitées (principalement huîtres et moules)

- **Le Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP)** des mollusques marins :

Les principaux objectifs de ce laboratoire visent à développer des programmes chez les mollusques bivalves marins dans le domaine de :

- **La génétique** : Essai de nouvelles espèces, de nouvelles populations et d'hybrides pour limiter les risques liés à la monoculture, obtention de souches résistantes ou tolérantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent en cause les productions. Création de souches ou lignées présentant de nouvelles performances de croissance, de qualité de chair, une meilleure adaptation aux conditions d'élevage ou de faibles besoins métaboliques pour améliorer la productivité des entreprises.
- **La pathologie** : l'équipe de pathologie se divise en 2 entités :
 - une équipe de recherche étudie principalement la taxonomie et la virulence des principaux agents pathogènes des bivalves marins, mais également d'étudier les mécanismes de défense de ces organismes vis à vis des agents concernés.
 - une équipe de surveillance travaille sur la surveillance des cas de mortalités anormales et sur le suivi des maladies à déclaration obligatoire

Du fait de cette mixité recherche-surveillance, le LGP est Laboratoire Communautaire de Référence pour la pathologie des mollusques et dans ce cadre, a pour missions de :

- développer et optimiser des outils de diagnostic
- soutenir et encadrer les personnels des Laboratoires Nationaux de Références européens

J'ai effectué mon stage dans l'équipe de pathologie sur le thème de l'optimisation et suivi de la culture *in vitro* de *Perkinsus olseni*, parasite de la palourde.

II. Rappels bibliographiques

A. Les palourdes *Ruditapes philippinarum* et *Ruditapes decussatus*

1. Palourdes et répartition géographique

Les palourdes *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* sont les deux principales espèces de palourdes présentes en France (figure 2).

Figure 2 : palourde *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum*



R. decussatus, (palourde européenne), est l'espèce indigène en Europe. En France, elle est trouvée essentiellement en Méditerranée alors que *R. philippinarum*, (palourde japonaise), est principalement présente sur la côte Atlantique.

La palourde japonaise a été introduite en France dans les années 1970 à des fins d'élevage. Cette espèce présentant une meilleure croissance que *R. decussatus*, a été préférentiellement utilisée par les vénériculteurs.

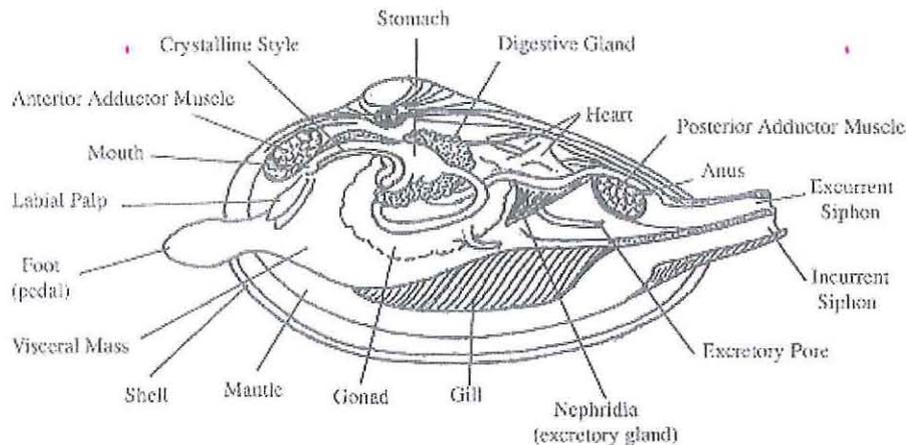
La vénériculture a fortement été perturbée fin des années 80-début 90 suite à l'apparition de la maladie de l'anneau brun, maladie d'origine bactérienne due à *Vibrio tapetis*. Actuellement la production de palourdes en France est assurée par la pêche sur les différents gisements naturels et par des importations d'Europe du sud.

2. Ecologie – Biologie

Les palourdes sont des mollusques bivalves ; elles ont une coquille divisée en deux valves reliées par une charnière dorsale. Elles vivent enfouies dans les sédiments (en particulier dans les sables vasards grossiers) en zones côtières abritées, au niveau des basses mers telles que les embouchures de fleuves, les lagunes, les baies.

Comme tous les mollusques fouisseurs, les palourdes ont un manteau présentant des extensions, les siphons, qui servent à aspirer et expulser l'eau de la cavité palléale. Les branchies interviennent dans la filtration de l'eau, la nutrition (acheminement des particules vers la bouche) et la respiration. La figure 3 représente l'organisation générale des organes de la palourde.

Figure 3 : Palourde *Ruditapes decussatus* d'après www.maine.gov, traduction en annexe 1



Les palourdes sont sédentaires (déplacements maximums de six mètres par mois) et se nourrissent par filtration du plancton en suspension et des dépôts sur le milieu (Barnabé, 1985). Elles sont donc très sensibles aux conditions du milieu (parasites, température, salinité, polluants...). Elles vivent le plus souvent groupées ce qui peut faciliter une prolifération des agents pathogènes si un individu est infecté.

3. Système immunitaire et cellules de défense

Le système hémolympatique

Les palourdes possèdent un système circulatoire de type semi-ouvert, comprenant un cœur, des vaisseaux et des sinus où circule l'hémolymphe (équivalent du sang chez les mammifères).

Ces animaux ne possèdent pas de lymphocytes, leur système de défense est principalement assuré par les hémocytes.

Les hémocytes

Les hémocytes sont les cellules circulantes chez la palourde, ils peuvent être retrouvés dans le système hémolympatique et dans les tissus. Ils sont la principale ligne de défense des mollusques en réalisant entre autre la phagocytose des corps étrangers (bactéries, levures, virus...).

4. Maladies affectant les palourdes

La palourde ayant un système immunitaire primitif, un grand nombre d'agents pathogènes peuvent être observés :

- Des bactéries :
 1. Des rickettsies ou des chlamydies, bactéries intracellulaires obligatoires, sont parfois observées dans les cellules épithéliales du tube digestif et des branchies. Ces bactéries semblent avoir un effet pathogène limité (destruction de la cellule infectée).
 2. *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun, a entraîné une forte diminution de l'élevage de palourdes dans les années 1980. Cette bactérie se localise au niveau du manteau et entraîne une modification de la sécrétion coquillière qui finit par empêcher la fermeture des valves.

- Des protozoaires :
 1. *Perkinsus olseni* : ce protozoaire est responsable d'importantes mortalités au Portugal, Japon, Corée et Chine. Ce parasite entraîne généralement une importante réduction de la capacité respiratoire des palourdes et semble modifier leur reproduction.
 2. *Marteilia* sp. : de rares cas de marteiliose ont été observés chez la palourde. Ce parasite de la glande digestive présente un réel effet pathogène sur les animaux infestés (invasion et destruction de la totalité de glande digestive).
 3. *Minchina tapetis* : c'est un parasite rarement observé chez la palourde. Il semble avoir un effet pathogène non négligeable (envahissement de tous les tissus conjonctifs de l'hôte).
 4. Les coccidies sont chez la palourde des parasites de l'épithélium rénal ; leur pouvoir pathogène n'est pas connu.

- Des métazoaires :
 1. Des copépodes (crustacés de petite taille, 0.3- 2.0 mm) dont ceux appartenant au genre *Mytilicola* : ils sont trouvés dans la lumière du tube digestif et peuvent provoquer des lésions tissulaires.
 2. Des turbellariés du genre *Paravortex* : ce sont des vers plats, localisés dans le tube digestif de la palourde.
 3. Des trématodes (vers plats caractérisés par des petites ventouses sur leur corps simulant des trémas.) On y trouve le genre *Labratrema* envahissant les gonades et tissus conjonctifs et le genre *Meiogymnophalus* moins pathogène. Ces deux genres utilisent les palourdes comme hôtes intermédiaires de leur développement.

B. Le parasite *Perkinsus olseni*

1. Le genre *Perkinsus* et ses principales espèces

Le genre *Perkinsus* correspond à des protozoaires cocoïdes dont certaines espèces infectent des mollusques marins. Ils peuvent induire chez certains mollusques des mortalités massives ou une perte de la valeur commerciale des produits.

La première description d'un parasite de ce genre affectant des mollusques a été faite en 1966 par Mackin, en Louisiane (Etat-Unis) ; ce parasite a été associé à des mortalités massives de l'huître américaine, *Crassostrea virginica*. Le parasite incriminé a été nommé dans un premier temps *Dermocystidium marinum*, puis *Labyrinthomyxa marina* et finalement *Perkinsus marinus*.

En effet, la classification des parasites du genre *Perkinsus* reste l'objet de controverses. Initialement classé dans l'embranchement des champignons (genre *Dermocystidium*), ces parasites ont été ensuite placés dans le genre *Labyrinthomyxa*, puis sur la base d'observations en microscopie électronique, ils ont été positionnés dans l'embranchement des Apicomplexa, genre *perkinsus* (Perkins, 1966). Récemment, l'analyse génétique a révélé que *Perkinsus* est plus proche de l'embranchement des Dinoflagellés que celui des Apicomplexa.

Actuellement cinq espèces infectant des mollusques ont été décrites dans le monde (tableau 1) (Villalba, 2004) dont *Perkinsus olseni*.

Tableau 1 : Les cinq espèces du genre *Perkinsus* et leurs hôtes associés

Espèce du genre <i>Perkinsus</i>	Espèces hôtes privilégiées	Principales localisations
<i>Perkinsus marinus</i>	Huître américaine <i>Crassostrea virginica</i>	Côte Est des Etats-Unis
<i>Perkinsus olseni</i> = <i>Perkinsus atlanticus</i> (synonymie proposée par Murrell <i>et al</i> , 2002)	Palourdes <i>Ruditapes philipinarum</i> et <i>R. decussatus</i> Ormeau <i>Haliotis ruber</i>	Australie, France, Espagne, Italie, Tunisie, Corée, Japon, Chine, Portugal
<i>Perkinsus qugwadi</i>	Pétoncle du Japon <i>Patinopecten yessoensis</i>	Canada
<i>Perkinsus chesapeakei</i> = <i>Perkinsus andrewsi</i>	Mye commune <i>Mya arenaria</i> , <i>Macoma baltica</i>	Etats-Unis
<i>Perkinsus mediterraneus</i>	Huître plate <i>Ostrea edulis</i>	Iles Baléares

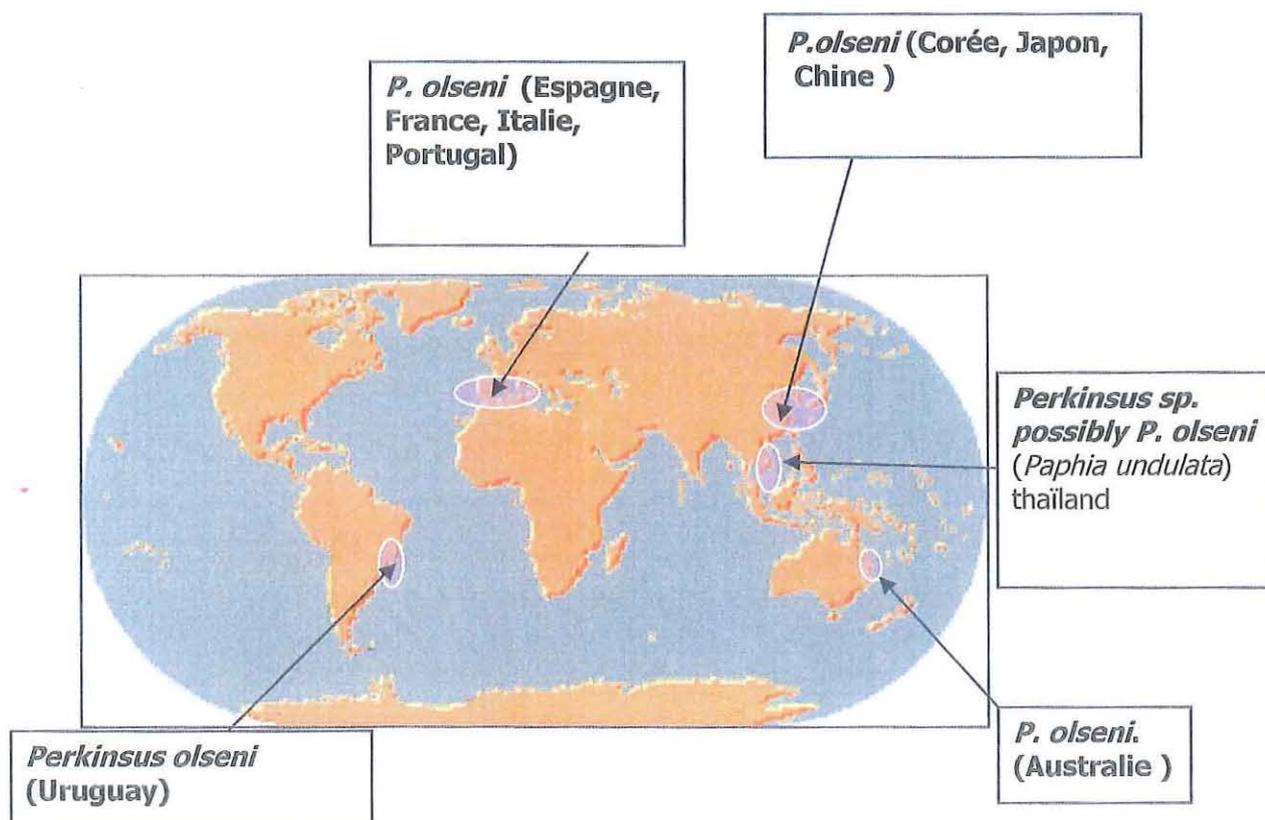
2. Historique, distribution et espèces hôtes de *Perkinsus olseni*

Perkinsus olseni a été décrit pour la première fois en Australie, en 1981 chez l'ormeau *Haliotis ruber* (Lester et David, 1981). Sa première description chez les palourdes date de 1989 au Portugal chez l'espèce *Ruditapes decussatus* (Azevedo, 1989); il avait été associé à des mortalités massives de palourdes. A cette époque, ce *Perkinsus* avait été nommé *Perkinsus atlanticus*.

Par la suite, les ressemblances génétiques entre *Perkinsus olseni* et *Perkinsus atlanticus* ont conduit à regrouper ces deux parasites sous le nom de *Perkinsus olseni* en 2002 (Murrell *et al*, 2002).

Perkinsus olseni est donc un parasite infectant affectant à la fois différentes espèces d'ormeaux mais également de nombreux vénéridés. Il est maintenant retrouvé dans le monde entier (figure 4) ; dernièrement, il a été décrit au Uruguay, c'était la première fois que ce parasite était observé en Amérique du sud.

Figure 4 : Répartition de *Perkinsus olseni* dans le monde



3. Cycle de *Perkinsus olseni*

Le cycle de développement de *Perkinsus olseni* est complexe et est composé de quatre principales étapes (figure 5) :

- La phase végétative : elle correspond à la multiplication dans les tissus de l'hôte du parasite. La multiplication dans l'hôte a lieu au niveau des branchies, des palpes, du manteau et du tube digestif (si le parasite est ingéré en même temps que de la nourriture). Le parasite est sous forme de trophozoïte.

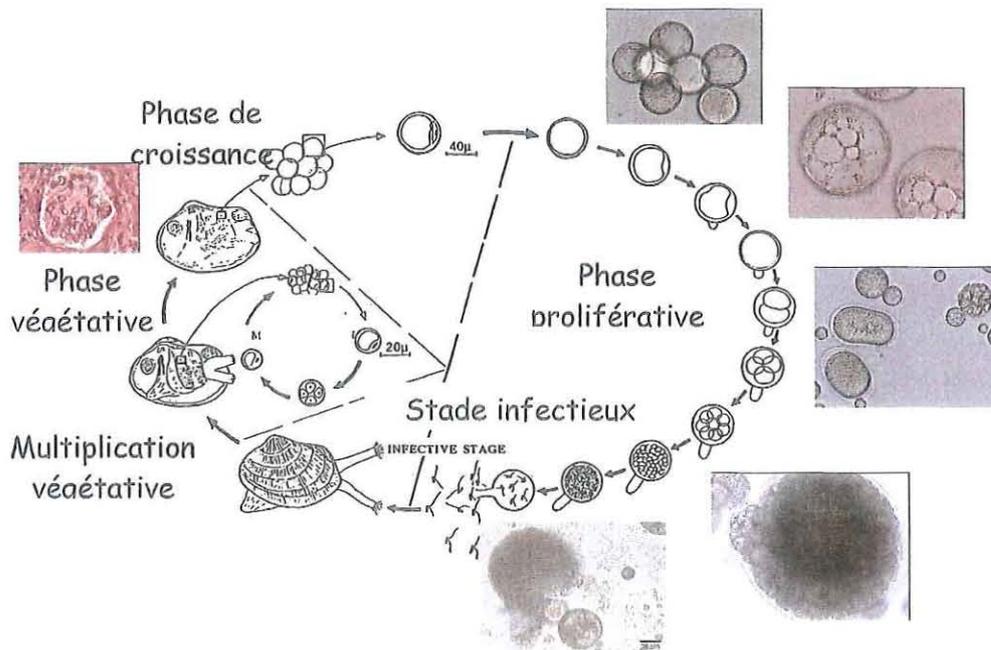
- La phase de croissance : les trophozoïtes se développent sous la forme d'hypnospores, entraînant un fort accroissement de leur taille. Ce stade se caractérise par une cellule sphérique de 50 à 100 microns de diamètre principalement constituée d'une vacuole centrale.

- La phase proliférative : elle correspond à la phase libre du cycle parasitaire. Les hypnospores libérées dans l'eau de mer commencent à se transformer en zoosporanges, si les conditions environnementales sont favorables.

- Le stade infectieux : les zoosporanges libèrent des zoospores correspondant à la forme infectieuse du parasite. Celles-ci, après avoir perdu leurs flagelles, pénètrent dans les cellules, au niveau des organes externes (branchies, manteau...) où elles s'enkystent ; le trophozoïte est généralement inclus dans un phagosome d'un hémocyte. Cette cellule de l'hémolymphe interviendrait alors dans le transport du parasite dans tous les tissus.

La transmission du parasite est directe, il ne nécessite pas un hôte intermédiaire.

Figure 5 : cycle de vie de *Perkinsus olseni* (d'après Auzoux-Bordenave et al 1995)



4. Effets sur l'hôte

La maladie causée par ce parasite est appelée perkinsose. Elle se traduit par des abcès blancs (figure 6), un amaigrissement, une inhibition du développement des gonades et un retard de croissance des palourdes.

Figure 6 : photographie de palourde infectée par le parasite *Perkinsus olseni*



La multiplication du parasite dans les tissus entraîne une dégradation des cellules des différents organes, une infiltration hémocytaire puis une obstruction des sinus et vaisseaux sanguins. Cette destruction progressive des tissus induit une diminution de la capacité respiratoire des palourdes qui pour compenser ce manque, montent en surface pendant la marée. Cette remontée les expose aux prédateurs comme les oiseaux (goéland, mouette, huître pie), les poissons (plie, daurade royale...) et les invertébrés marins (crabe vert, étoile de mer). Le développement du parasite semble pouvoir conduire à la mort de l'hôte par la destruction de ces branchies.

5. Rappels sur la culture de *Perkinsus olseni*

Les différents essais de culture de *Perkinsus* décrit dans la littérature, ont été synthétisés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Principaux essais de culture de *Perkinsus*

Espèce hôte	Parasite	Auteur	Tissu	Milieu
<i>C. virginica</i>	<i>Perkinsus marinus</i>	Kleinschuster & Swink, 1993.	Ganglions viscéraux	L 15
		La Peyre <i>et al.</i> 1993.	Cœur	JL ODRP-1
		Gauthier & Vasta, 1993, 1995	Hémolymphe	DME DME/ HAM's
		La Peyre & Faisal, 1995.	Hypnosporos	JL ODRP-1
<i>R. decussatus</i>	<i>Perkinsus olseni</i>	Ordas & Figueras, 1998.	Hémolymphe	Eau de mer artificielle DMEM DMEM/ HAM's
		S. M. Casas <i>et al.</i> , 2002.	Hémolymphe Branchies hypnosporos	JL ODRP-1 modifié DMEM/ HAM's

Au vu de ce tableau, différents milieux de culture ont été utilisés pour la culture de *Perkinsus*. Pour des raisons pratiques (milieu commercial), le milieu DMEM/Ham's ainsi que le milieu L15 ont été retenus dans un premier temps. Le DMEM/HAM's donnant de meilleurs résultats que le L15, il a été choisi pour réaliser les différents essais de culture de *Perkinsus olsenii*.

Par ailleurs, bien que l'hémolymphe soit souvent utilisée pour initier la culture de *Perkinsus* dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser les branchies car d'une part, *Perkinsus olsenii* se développe préférentiellement dans cet organe et d'autre part cet organe est facile à prélever.

III. Objectifs du stage

Ce stage s'intègre dans le cadre des missions du LCR (Laboratoire Communautaire de Référence) pour la réalisation d'une collection de parasites du genre *Perkinsus*.

Les différentes souches isolées pourront par la suite être utilisées lors d'une étude génétique afin de déterminer si les palourdes *Ruditapes philippinarum* et *Ruditapes decussatus* du territoire français sont infectées par une ou plusieurs souches du parasite *Perkinsus olseni*.

Une étude similaire menée sur *Perkinsus marinus* aux Etats-Unis a montré que plusieurs souches du parasite étaient présentes au sein d'une même zone géographique, voir d'un même individu (Reeces *et al*, 1997).

Pour ces raisons, mon stage avait pour objectifs :

- Isoler le parasite *Perkinsus olseni* de palourdes supposées infectées.
- Réaliser et optimiser des cultures cellulaires du parasite puis les cryoconserver afin de pouvoir les réutiliser ultérieurement.
- Suivre le cycle de développement de ce parasite *in vitro*.
- Réaliser des cultures clonales du parasite puis les cryoconserver afin qu'elles puissent être étudiées en biologie moléculaire pour déterminer si une ou plusieurs souches de *Perkinsus olseni* sont présentes en France.
- Réaliser des essais de culture du parasite à partir de sa forme hypnospore (forme de résistance du parasite) après isolement dans le milieu thioglycolate.

IV. Mode opératoire

A. Animaux analysés

Les différentes cultures ont été initiées à partir de deux lots de palourdes adultes du bassin d'Arcachon (figure 7). Ces échantillons sont issus des zones Château Madère (lot référencé 06/021) et les Argiles (lot 06/022). Ces deux points ont été choisis pour cette étude car ces zones sont connues comme fortement infectées par *Perkinsus olseni*.

Figure 7 : Lieux de prélèvement des échantillons – Carte du bassin d'Arcachon



Toutes les palourdes mises en culture appartiennent au genre *Ruditapes philippinarum*. La distinction de genre *R. philippinarum* et *R. decussatus* se fait par observation des siphons. Pour la première espèce, les siphons sont collés alors que la seconde, ils sont disjoints.

B. Protocoles

1. Culture *in vitro* et cryoconservation de *Perkinsus olseni*.

Cette manipulation comporte deux objectifs :

- Réaliser des cultures des *Perkinsus* présents dans les palourdes, puis à partir de celles-ci, mettre en place des cultures clonales afin de pouvoir entreprendre une analyse génétique.
- Suivre l'évolution du parasite régulièrement pour décrire son cycle *in vitro*.

Pour réaliser ces deux objectifs, le parasite a été mis en culture dans le milieu DMEM Ham's 1/2, milieu permettant sa croissance et sa multiplication.

La Composition du milieu DMEM Ham's 1/2 et de la solution d'antibiotique figurent en annexe 2

Toutes les manipulations sont effectuées sous hotte à flux laminaire horizontal.

1.1 Mise en culture du parasite

La mise en culture de parasite a été réalisée de la façon suivante (Protocole en annexe 3) :

Les palourdes sont lavées à l'eau courante puis séchées pendant quelques minutes sur un papier absorbant. Elles sont ensuite ouvertes à l'aide d'un couteau puis mises à égoutter la charnière vers le haut. Une branchie de chaque individu est mise à incuber dans du milieu au thioglycolate afin de vérifier le statut parasitaire de l'animal (cf. chapitre 2).

L'autre branchie est déposée dans un puits contenant de l'eau de mer filtrée stérile (EMFS). Après rinçage en EMFS, la branchie est ensuite décontaminée dans une solution d'antibiotiques. Les tissus sont à nouveau rincés dans de l'EMFS, broyés dans un microtube renfermant 250 μ L d'EMFS, puis mis en suspension dans un 1 mL d'EMFS.

Ce broyat est alors filtré afin d'éliminer les cellules résiduelles. Le filtrat est ensuite distribué dans 4 puits d'une plaque de cultures cellulaires renfermant du milieu DMEM/ HAM 's. Ces plaques sont ensuite mises à incuber dans une étuve ventilée à 26°C.

La mise en culture a été réalisée sur 2 lots de 24 individus, pour chaque individu 4 répliquas (4 puits par individu) ont été réalisés.

Les cultures sont contrôlées tous les deux jours au microscope inversé (figure 8).

Figure 8 : Microscope inversé Olympus 1X50



1.2 Suivi des cultures et cultures clonales

Les différentes plaques ensemencées sont observées tous les deux jours au microscope optique inversé. Les observations sont reportées dans des feuilles de lecture.

Le renouvellement du milieu des différentes cultures se fait généralement une semaine après ensemencement en déposant 100 µL de suspension dans 1 mL de milieu « neuf ». Les cultures sont ainsi conservées jusqu'à obtention d'amas de parasites dans le puits. A ce moment là, une partie des cultures est repiquée en flasque de 25 mL afin d'avoir d'importantes quantités de parasites pour la cryoconservation. L'autre partie est repiquée en plaque 24 puits afin d'obtenir des cultures clonales.

Les cultures clonales sont obtenues par dilutions successives ; 500 µL de la suspension sont dilués au demi dans le premier puits. Après homogénéisation, 500 µL de ce premier puits sont à leur tour déposés dans le puits suivant contenant 500 µL de milieu neuf et ainsi de suite jusqu'à la fin de la plaque.

A la fin, 500 µL de milieu sont répartis dans tous les puits sauf le dernier afin d'avoir un volume final de 1 mL dans chaque puits.

Les différentes plaques sont observées tous les deux jours, afin de noter le développement du parasite et de rechercher quel puits renferme la culture clonale. Celle-ci se caractérise soit dans les premières heures après ensemencement par la présence d'un seul parasite dans le puits, soit après quelques jours par un amas unique dans le puits.

Les différentes cultures clonales sont incubées à 26°C et conservées ainsi jusqu'à ce qu'elles soient en quantité suffisante pour être repiquées en plus grand volume et cryoconservées.

Les cultures clonales ont été initiées pour tous les puits des individus présentant un développement assez conséquent (culture visible, amas d'environ 1mm de diamètre).

1.3 Cryoconservation

La cryoconservation des cultures se fait de la façon suivante (Annexe 4) :

Les cultures présentant un développement parasitaire suffisant sont transvasées dans des tubes de 10 mL puis centrifugées à 800 tours/minute pendant 15 minutes.

Le surnageant est alors éliminé, le culot est ensuite rincé avec 10 mL de milieu de cryoconservation (DMEM 1/1, plus riche en éléments afin de limiter l'éclatement des cellules lors de la cryoconservation) puis à nouveau centrifugé.

Après deux rinçages, les cellules sont remises en suspension dans 1 mL de milieu de cryoconservation puis transvasées dans un cryotube de 2 mL. Celui-ci sera étiqueté puis congelé à -20°C pendant une nuit et enfin à -80°C.

Toutes les cultures clonales et non clonales qui se sont bien développées ont été cryoconservées.

1.4 Suivi du cycle

Au cours des différents essais réalisés les années antérieures au LGP, différents stades parasitaires jusqu'alors non décrits ont été observés. Le suivi du cycle a été mis en place afin de compléter éventuellement la description réalisée par Casas *et al* (2002).

Pour cela, le restant du filtrat des 24 palourdes de chaque lot (Château Madère et les Argiles) utilisées précédemment ont été mises en culture comme précédemment décrit dans le paragraphe 1.1.

Dans ce cas, chaque filtrat est réparti dans 6 puits puis mis à incuber à 26°C.

Après une semaine d'incubation, 100 µL de chaque puits sont prélevés quotidiennement puis regroupés par individu dans un microtube. Les différents échantillons sont conservés au réfrigérateur après ajout de formol 2%. Le formol permet de tuer les différentes cellules sans en modifier leur structure ; il permet ainsi de conserver les échantillons pour les observer ultérieurement.

2. Détection et quantification de *Perkinsus olseni* par la technique au thioglycolate et essai de culture des hypnospores

La culture sur thioglycolate est généralement utilisée au laboratoire pour diagnostiquer *Perkinsus olseni* et déterminer sa charge parasitaire.

Ce milieu généralement utilisé pour la culture de champignons, est anaérobie ; il entraîne ainsi la formation d'hypnospores chez *Perkinsus* et empêche sa multiplication (Ray, 1952).

Le milieu thioglycolate contient des glucides nécessaires au grossissement des cellules, elles passent ainsi de la forme trophozoïte (2 à 5 microns) internalisée dans les cellules à la forme hypnospore (50 à 100 microns).

Des antibiotiques (Pénicilline 133 mg et streptomycine 64 mg) empêchent le développement de bactéries.

Cette technique est utilisable quelle que soit l'espèce de *Perkinsus* et quel que soit l'hôte.

2.1 Quantification du parasite

Pour cet essai, les palourdes utilisées sont les mêmes que pour la culture de parasite. Le prélèvement des branchies se fait comme décrit précédemment dans le paragraphe 1.1.

La quantification du parasite se fait selon la technique de lyse à la soude (protocole en Annexe 5) mise au point par Choi *et al.* (1989).

Les branchies sont incubées dans 10mL de milieu thioglycolate à l'obscurité à température ambiante. Au bout d'une semaine, les cultures sont centrifugées pendant 10 min à 1000 tours/min. Deux lyses cellulaires sont ensuite réalisées avec de la soude à 2 N.

Cette étape permet de détruire les cellules et tissus présents dans le milieu sans affecter les cellules parasitaires ; en effet, le parasite *Perkinsus olseni* est résistant à la soude sous sa forme hypnospore.

Après centrifugation, les hypnospores restantes sont placées dans une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline) puis comptées sur cellule de Malassez.

2.2 Essai de culture à partir des hypnospores

Les essais de culture sont réalisés selon le protocole décrit en annexe 6.

Les hypnospores précédemment obtenues sont centrifugées à 600g, décontaminées dans deux bains d'antibiotiques (solution d'antibiotiques de rinçage), puis rincées deux fois en EMFS.

Après rinçage, 200 μ L de la suspension de cellules sont distribués dans 6 puits (pour chaque individu), contenant 1 mL de milieu DMEM Ham's 1/2. Les différentes plaques sont placées dans une étuve à 26°C, puis observées une fois par semaine afin de contrôler le développement parasitaire.

V. Résultats

A. Culture de *Perkinsus olseni*

Evolution des cultures

Après 2 mois,, les cultures de *Perkinsus olseni* sont positives à 54% (soit 13 individus sur 24) et 87% (soit 21 palourdes sur 24) respectivement pour les lots 06/021 et 06/22.

Les cultures initiées ont permis d'obtenir du *Perkinsus* en quantité variable selon les individus (tableau 3).

Tableau 3 Evolution des cultures du lot 06-021

lot 06-021	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
jour 7	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	++	-	+	+	-	-	-	+	+	+	++	+	+	-
jour 30	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	++	++	-	-	++	-	+	-	+	+	++	-
jour 60	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	++	-	++	++	-	-	++	-	++	-	++	++	++	-
		+		+	+			+			+								+		+		+	

« - » Pas de *Perkinsus* visible

« + » *Perkinsus* visible

« ++ » *Perkinsus* en multiplication

« +++ » Grande quantité de *Perkinsus* (amas d'environ 1 mm)

Dans la majorité des cas, les parasites se sont multipliés après plusieurs semaines d'incubation (J20 à 30). Dans de rares cas, ils ont commencé à se multiplier après une semaine de culture (2 individus/sur 48).

Ce décalage dans le temps des cultures peut avoir différentes origines :

- une différence du nombre de parasites dans l'inoculum,
- une différence génétique des différents *Perkinsus* cultivés.

Chez certains individus, la vitesse de croissance et le développement du parasite ne sont pas équivalents d'un puits à l'autre ; par exemple, pour deux individus du lot 06/022, le parasite s'est bien développé dans un ou deux puits (culture confluite) alors que dans les autres, il ne s'est pratiquement pas multiplié bien qu'il soit présent. Ceci pourrait s'expliquer soit par la faible charge parasitaire dans le filtrat initial de branchies (pas de *Perkinsus* observé sur thioglycolate), soit par la présence de différentes souches de parasites au sein d'un même individu. Ce phénomène a déjà été décrit avec *P. marinus* aux Etats-Unis (Reece, 1997, 2000).

Observation des cultures

Les observations des premières cultures ont montré un grand nombre de cellules branchiales et de débris cellulaires dans tous les puits rendant la recherche de parasite difficile.

Pour remédier à ce problème, différents essais ont été entrepris :

- Variation du volume de l'inoculum. Pour plusieurs individus, 3 volumes ont été utilisés (50,100 et 200 μL), 100 μL présente le meilleur rapport quantité de parasite / qualité d'observation des cellules. Ce système présente l'inconvénient de diminuer le nombre de cultures positives dans le cas de palourdes faiblement infestées.

- Séparation des cellules du parasite et de l'hôte par filtration. En utilisant un filtre approprié, les cellules branchiales (taille < 15 μm) devraient se retrouver dans le filtrat et le parasite (taille > 15 μm) dans le filtre ; le filtre pourrait ensuite être déposé directement dans la plaque de culture. Le laboratoire ne disposait que de filtres de 20 et 30 μm ; malgré leurs gros maillages, ils ont été testés. Tous les parasites ont traversé les mailles des filtres et aucun parasite ne s'est donc développé dans les cultures.

Problèmes rencontrés

Différents points critiques ont été observés :

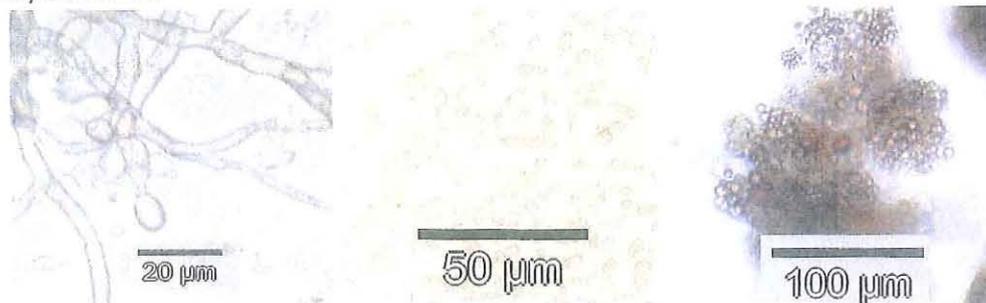
❖ Au cours de l'incubation en étuve, le milieu de culture s'évaporait de façon notable. Cette évaporation a été diminuée en abaissant la vitesse de ventilation de l'étuve et en plaçant du parafilm autour des plaques de culture afin de limiter les échanges d'air avec l'extérieur. Bien que permettant de diminuer l'évaporation, ce système a présenté les inconvénients suivants :

- Les plaques ne pouvaient pas être placées trop proche les unes des autres car le parafilm se déchirait,
- La pose du parafilm entraînait des mouvements de la plaque favorisant la dissémination de contaminations.

Pour pallier à ce problème il serait souhaitable d'incuber les cultures dans une étuve régulée en hygrométrie.

❖ Après trois semaines de culture, de nombreuses contaminations par des champignons ont été observées (figure 9). Les cultures initiales comportaient en moyenne 25% de puits contaminés. Ce phénomène de contamination a déjà été décrit dans des publications notamment par Casas *et al.* (2002) où jusqu'à 60% de contaminations bactériennes et fongiques étaient observées sur certaines cultures. Ce problème a été résolu par assèchement et rinçage à l'éthanol absolu des puits contaminés, suivi de repiquages sélectifs des plaques. (0% de contamination après 3 repiquages)

Figure 9 : exemples de contaminations respectivement aux grossissements 40, 20 et 10



Les plaques utilisées pour le suivi du cycle ont été les plus contaminées, laissant supposer que les contaminations ont eu lieu lors des prélèvements pour fixation. En effet les moisissures se développant en surface des boîtes, lors de l'ouverture du couvercle (tous les deux jours) des spores de champignons pouvaient être répandues dans les autres puits. La hôte à flux laminaire horizontal a peut être contribué aussi à la propagation des champignons dans les différents puits d'une même plaque.

L'origine de ces champignons n'est pas très claire, le fait que seules les premières plaques de cultures soient contaminées laisse supposer que ces contaminations provenaient de l'inoculum. Néanmoins, pour ces individus, aucun champignon ne s'est développé à partir des branchies après une semaine de culture en thioglycolate (il est à noter que les milieux thioglycolate incubés pendant 20 jours présentaient des contaminations).

Pour limiter les contaminations venant de l'extérieur et inter-puits, un film autocollant permettant les échanges gazeux pourrait être utilisé. Ce film ne serait utilisable que si les plaques de culture ne sont pas ouvertes régulièrement (risque de projection à l'ouverture).

B. Cultures clonales

Des cultures clonales ont été initiées (en moyenne après 20 jours de culture) à partir de 10 individus présentant un développement suffisant (cultures confluentes). Après observation des différentes plaques, le système de dilution utilisé (dilutions successives dans 24 puits) a permis d'obtenir dans tous les cas une cellule parasitaire unique dans un puits. Malheureusement, dans tous les cas, aucune de ces cellules ne s'est multipliée au bout de 30 jours de culture. Ce problème a déjà été observé les années antérieures (Chollet com. pers). Plusieurs causes peuvent être à l'origine de ce phénomène :

- Absence de facteurs de croissance : en effet, certains auteurs ont constaté qu'en utilisant un filtrat des cellules mères, ils stimulaient la croissance des cellules mises en culture. Ainsi, au cours de sa multiplication, le parasite pourrait relâcher dans le milieu des facteurs de croissance favorisant la multiplication et le développement des cellules filles.
- Ceci pourrait être également dû à une variabilité génétique. Les essais des années antérieures ont montré que pour certaines zones géographiques, aucune culture clonale ne s'est multipliée (Chollet com. pers.).
- Le type cellulaire du parasite se trouvant dans le dernier puits positif pourrait également être mis en cause, mais dans ce cas précis, au vue du nombre d'échecs, cela paraît peu probable.

C. Suivi du cycle

Le suivi du cycle à partir des prélèvements s'est avéré délicat. Le prélèvement de 100 µL par puits tous les deux jours était trop élevé par rapport aux taux de renouvellement des cellules de *Perkinsus olseni*. Les puits présentant peu de cellules pouvaient être épuisés et les prélèvements réguliers entraînaient un fort risque de contamination. De plus, les contaminations importantes ont entraîné une diminution du nombre de puits disponibles.

De ce fait, un nouveau protocole a été mis en place. A partir de 5 palourdes du lot 06-021, une mise en culture a été effectuée comme décrite dans le paragraphe IV.B.1.1. Le suivi a été assuré quotidiennement par observation microscopique directe des puits (aucun prélèvement n'était réalisé). Cette méthode a permis une meilleure observation des différents stades parasitaires et a limité ainsi les contaminations. Les jours où l'observation n'était pas possible, les cultures étaient placées à 5°C pour ralentir le développement du parasite.

Ces observations ont permis de déterminer les formes dominantes observables chaque jour par rapport au nombre total de parasites vus. Aucune contamination n'a été constatée dans les cultures après un mois. Différents types de cellules ont été observés au cours de ce suivi, ce qui a permis de confirmer le cycle de développement du parasite (évolution d'un trophozoïte vers une zoospore) ainsi que de suggérer un cycle de multiplication au sein des cultures. Dans la littérature, Casas *et al.*, (2002) ont uniquement décrit les premières cellules intervenant dans ce cycle, l'évolution proposée n'est donc qu'une hypothèse.

Cycle de développement

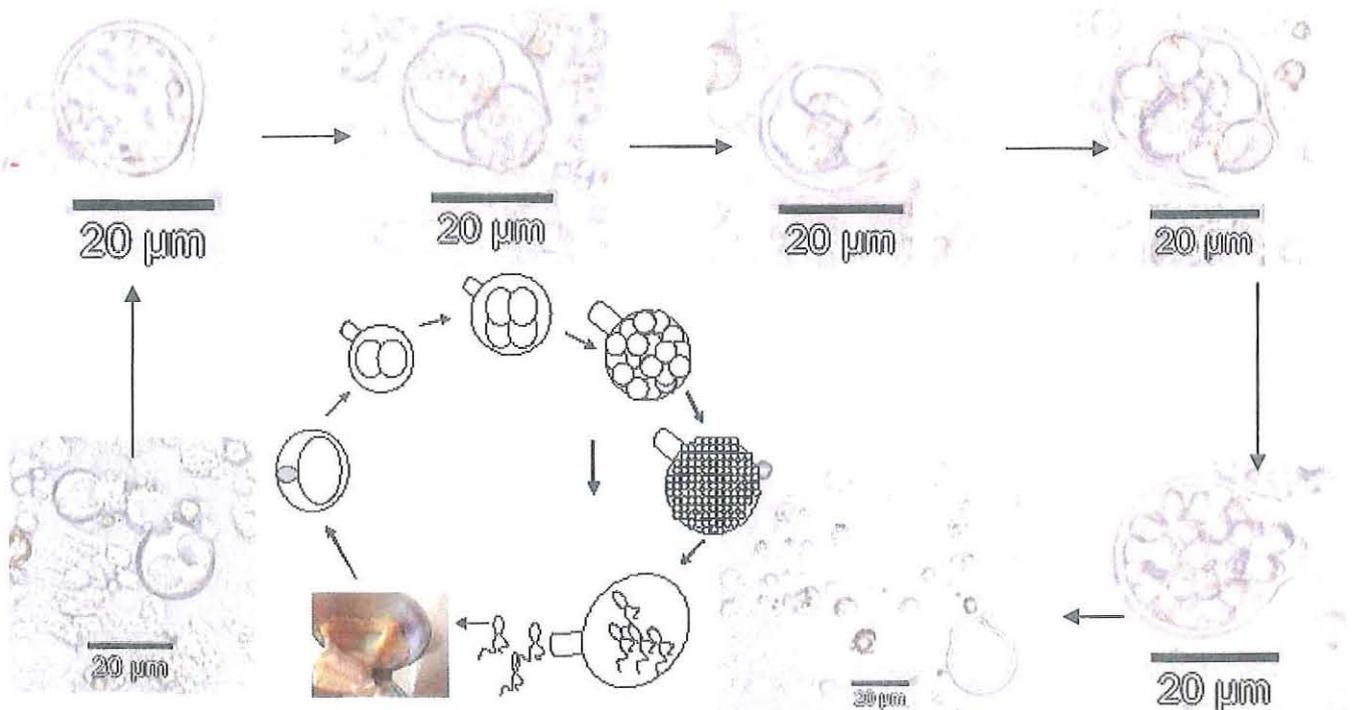
Le cycle de développement (Perkins, 1996) permet au parasite de passer de la forme trophozoïte à la forme zoospore (colonisante), il se déroule de la manière suivante (Figure 10) :

Le trophozoïte (cellule uninuclée renfermant une large vacuole lipidique) va s'accroître en taille ; sa vacuole lipidique va progressivement régresser alors que son noyau va augmenter en taille.

Cette cellule évolue ainsi en prézoospore, caractérisé par la présence d'un tube de « relargage » présent tout au long de ce cycle.

Le prézoospore, subit des divisions internes donnant un zoospore, renfermant une multitude de « cellules filles ». Ces dernières vont progressivement se transformer en zoospores qui seront émises dans le milieu extérieur par le tube de « relargage ». Ces zoospores sont la forme infectante du parasite et pourront donc infecter de nouveaux hôtes (palourdes, ormeaux) en milieu naturel ; en revanche, les zoospores n'évoluent pas en milieu de culture.

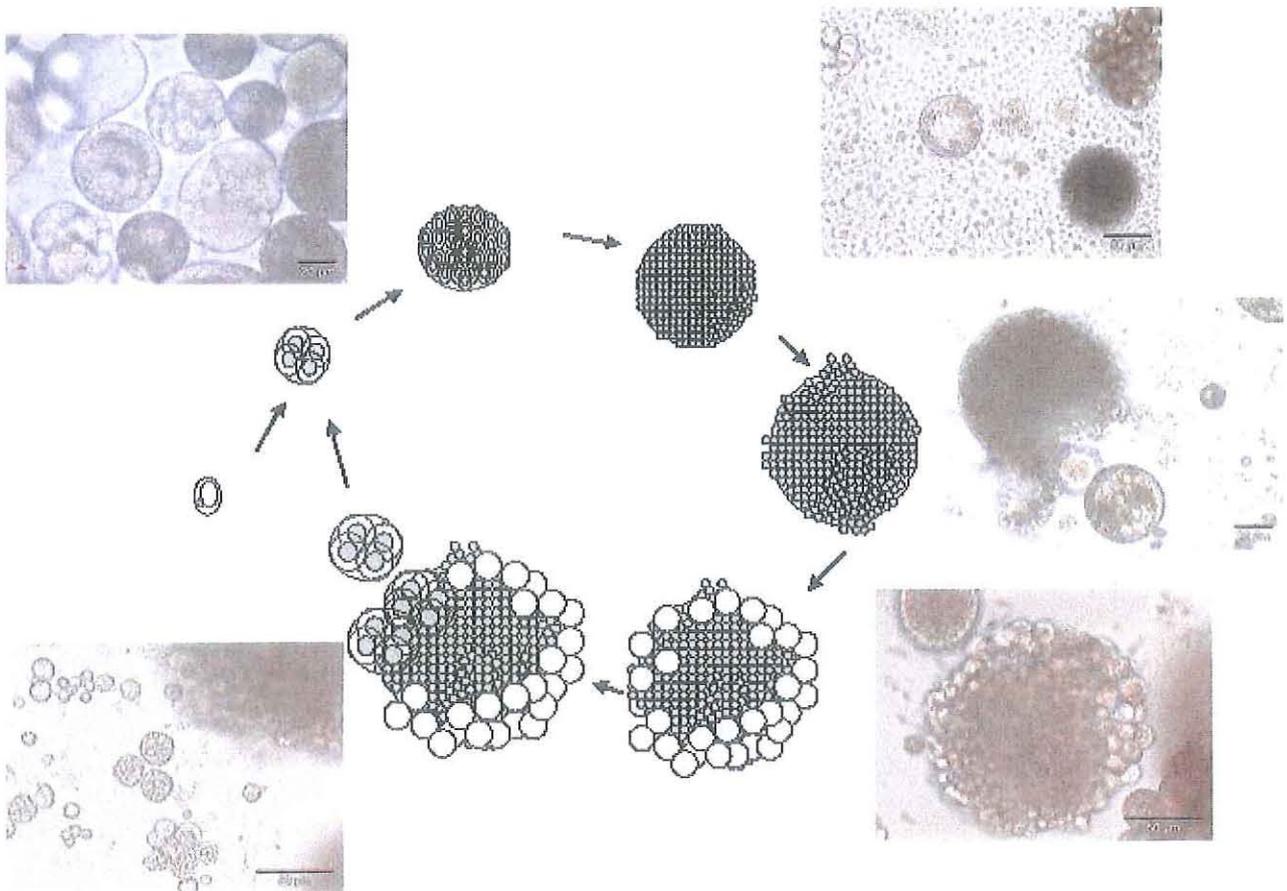
Figure 10 Cycle de zoosporulation de *Perkinsus olseni*



Cycle de multiplication

Nos observations laissent supposer que le cycle de multiplication du parasite dans les cultures pourrait être le suivant (figure 11). Comme précédemment, le trophozoïte va subir une succession de divisions internes donnant des cellules filles mais dans ce cas, la cellule mère ne présente pas de tube de « relargage ». Les cellules filles vont continuer de se multiplier jusqu'à éclatement de la cellule mère. Les cellules filles sont ainsi libérées dans le milieu et vont devenir à leur tour des cellules mères. Elles vont s'accroître et subir des divisions internes. Ces cellules vont donc initier un nouveau cycle de multiplication.

Figure 11 Hypothèse du cycle de multiplication de *Perkinsus olseni*



Observation globale des cycles

Cinq types cellulaires caractéristiques de l'évolution du parasite ont été définis (tableau 4), ce qui a permis de montrer que ces deux cycles interviennent pratiquement simultanément.

Comme le montre le graphique (figure 12) ci-dessous, le cycle de développement comprenant les types cellulaires 1, 3 et 4 évolue en 15 jours de la façon suivante : le nombre de trophozoïtes (type 1) diminue rapidement pour donner des zoosporanges (type 3), ces dernières libèrent leurs zoospores et des zoosporanges vides sont observées (type 4).

Le cycle de multiplication, comprenant les types 1, 2 et 5 est plus étalé dans le temps celui-ci a lieu pendant toute la durée des observations. Les trophozoïtes (type 1) évoluent en « trophozoïtes matures » (type 2) qui par divisions internes, donnent le type 5.

Tableau 4

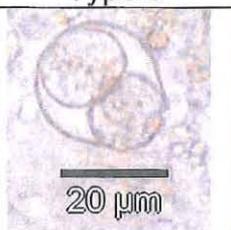
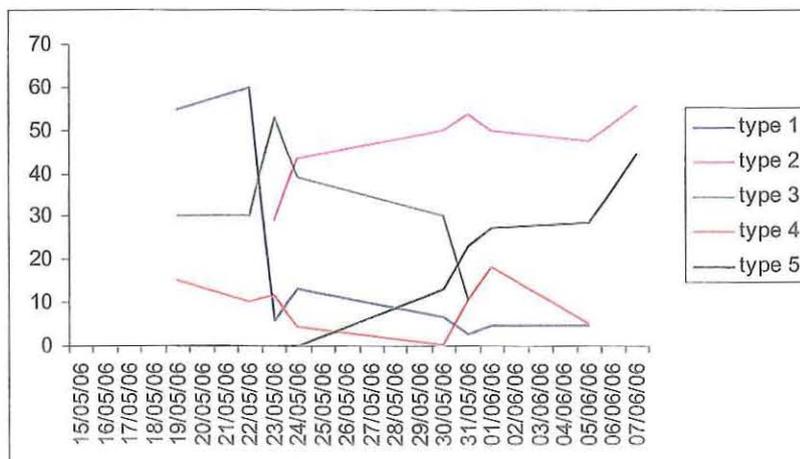
Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5
				
Les types 1 et 2 étaient difficilement différenciables les premiers jours de culture				

Figure 12 Nombre d'individus de type X / total individus comptés, en % (tableau en annexe 7), 15-05-06 = jour 0



D. Essais de cultures à partir des hypnospores

Résultats des dénombrements en milieu thioglycolate

Les résultats des cultures en thioglycolate sont résumés dans le tableau 5, le détail des résultats est disponible en annexe 8. Cette méthode est une technique quantitative qui permet d'obtenir le nombre de parasites présents dans une branchie.

Tableau 5 Comparaison des résultats obtenus en culture cellulaire (cult) avec ceux obtenus par détection en milieu thioglycolate.

Lot06/021

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
thio	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Nbre perk (dmbt thio)	3000	0	0	5000	36000	0	0	4000	0	9000	27000	0	0	11000	0	0	3000	0	31000	3000	16000	0.5	0.5	0
Cult	-	++ +	-	+++	+++	-	-	+++	-	+	+++	-	++	++	-	-	++	-	+++	-	+++	++	+++	-

Lot 06/022

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
thio	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Nbre perk (dmbt thio)	0	0.5	0	2000	0	3000	3000	0	3000	1000	0	0	20000	0	2000	12000	6000	0	0	0	0	5000	11000	20000
cult	-	+++	+	+++	-	+++	+++	+	+++	+	+	+	+++	+++	++	+++	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+++

Pour chacun des lots, 54% des palourdes (13 individus pour chaque lot) étaient infectées par *Perkinsus olseni* d'après les dénombrements en thioglycolate. Ces résultats semblent concordant avec le nombre de cultures positives en milieu DMEM/HAM's. Seuls les individus 1 et 20 du lot 06/021 n'ont pas présenté un développement du parasite en culture cellulaire bien que celui-ci soit présent (thioglycolate positif).

Pour la culture en milieu thioglycolate, onze individus ont donné des résultats négatifs alors que le parasite s'est développé en culture cellulaire.

Ceci peut avoir plusieurs causes :

- les individus étaient faiblement infectés et le milieu thioglycolate ne permet pas la multiplication du parasite contrairement à la culture cellulaire,
- le parasite n'a peut être pas été observé à cause du faible volume d'observation
- peut être qu'une seule branchie était infectée.

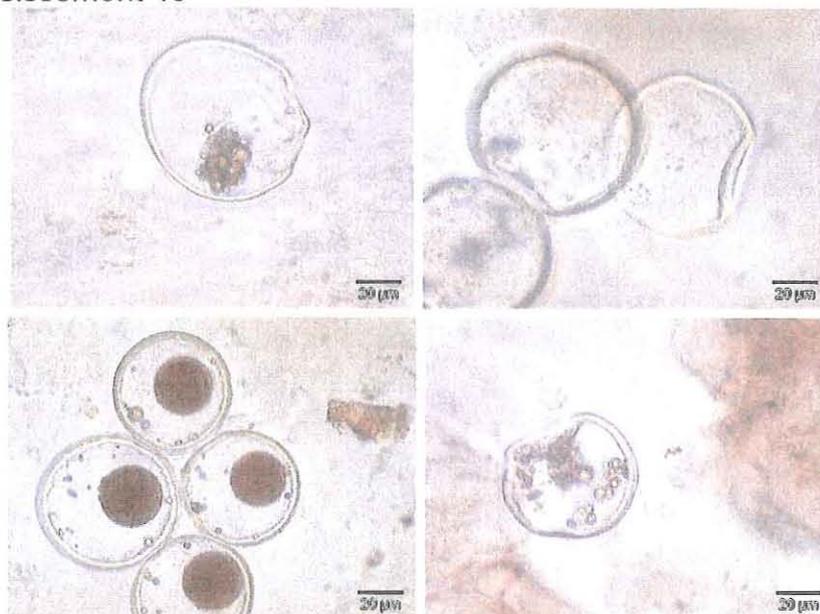
A cela s'ajoute le fait que des contaminations peuvent avoir eu lieu entre les puits d'une même plaque de culture cellulaire (par exemple en cas de choc) pouvant donner des résultats faussement positifs.

La méthode au thioglycolate est une technique plus rapide à mettre en œuvre mais semble moins sensible que la culture cellulaire puisque la culture de *Perkinsus* permet d'obtenir de meilleurs résultats de façon significative d'après un test de Mc Nemar réalisé par C. Garcia (annexe 9).

Mise en culture de *Perkinsus olseni* à partir d'hypnospores

Tous les individus positifs en thioglycolate ont été ensemencés en plaque. Au cours de l'ensemencement du milieu de culture avec les hypnospores, l'indicateur de pH du milieu (rouge de phénol) a viré du rose au rouge indiquant ainsi une augmentation de pH du milieu de culture. Le milieu est donc devenu basique indiquant ainsi que toute la soude n'avait pas été éliminée. Un pH de 8.8 a été mesuré à l'aide de bandelettes dans le milieu. Le parasite a donc très peu de chance de se développer puisque son pH optimum est de 6,7, par ailleurs, les hypnospores apparaissent plus ou moins déformés (figure 18). Ces images laissent également supposer que la soude tue le parasite sans le lyser. Sur les 26 individus mis en culture, aucune multiplication ni évolution du parasite n'ont été observés après 45 jours d'incubation,

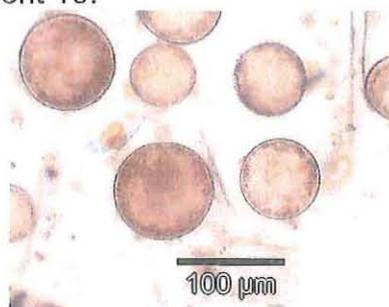
Figure 18 : Hypnospores de *Perkinsus olseni* après lyse à la soude et mise en culture. Grossissement 40



Suite à ces résultats, deux nouveaux essais ont été mis en place sur quelques individus : l'un sans aucune lyse, l'autre en remplaçant la soude par de la protéinase K.

Le mode opératoire sans aucune lyse s'est déroulé de la manière suivante: Après incubation le milieu thioglycolate est vortexé afin de mettre le parasite en suspension, puis centrifugé à 600g pour éliminer le surnageant. Une décontamination du culot est réalisée par deux bains de la solution d'antibiotique de rinçage (utilisée lors de la désinfection des branchies pour la culture cellulaire). Après rinçage et centrifugation (600g -15 min), le culot est remis en suspension dans 2 mL d'eau de mer stérile, puis ensemencé à raison de 100 μ L par puits. Après observation au microscope, les hypnospores semblaient intactes (figure 21) ; la centrifugation ne semble pas donc endommager les hypnospores et la lyse à la soude semble bien avoir une action néfaste sur les cellules parasitaires. Cette méthode permet donc d'obtenir des hypnospores viables, cependant après 3 jours de culture, un développement important de champignons a été observé rendant la culture inexploitable.

Figure 21 : Photographie d'hypnospores de *Perkinsus olseni* après centrifugation et mise en culture. Grossissement 10.



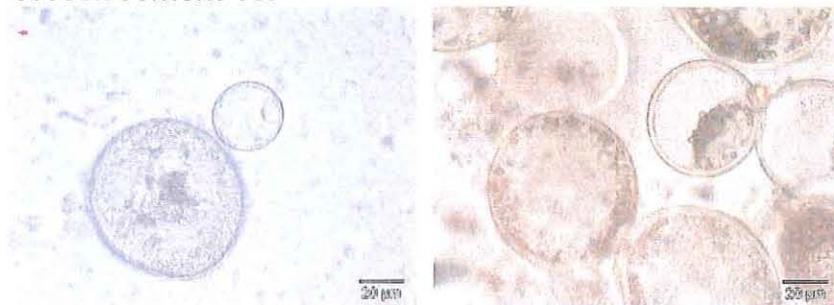
Le dernier protocole testé s'inspire des travaux de Leethochavalit (2004) qui effectue une lyse à la Trypsine. Ne disposant pas de cette enzyme au laboratoire, celle-ci est remplacée par de la protéinase K.

Après action de la protéinase K à une concentration de 0.1 mg/mL (1h30 à 37°C), les hypnospores sont rincées en tampon PBS (deux rinçages), puis distribuées dans les plaques de cultures.

L'observation au microscope avant ensemencement, révèle que la majorité des hypnospores semblent viables, des mouvements internes sont visibles au grossissement 40, deux heures après la lyse (figure 21).

Après 72 heures d'incubation, des contaminations fongiques apparaissent dans les cultures qui deviennent illisibles après cinq jours. Ces champignons sont également visibles dans les milieux thioglycolate après deux semaines d'incubation.

Figure 21 : Photographie d'hypnospores de *Perkinsus olseni* lyse à la protéinase K. Grossissement 40.



VI. Conclusion, Perspectives

Le parasite *Perkinsus olseni* se développe bien en milieu DMEM, seule la présence de nombreux champignons gêne sa culture, c'est pourquoi des études devront être réalisées afin de déterminer si des antifongiques peuvent être utilisés sans affecter la multiplication du parasite. Ce parasite étant relativement proche des champignons, l'utilisation de tels produits pourrait modifier son développement. Dans le cadre de cette étude, les repiquages sélectifs et l'élimination systématique des puits contaminés ont permis d'éliminer les champignons et de garder les cultures de tous les individus.

Les cultures clonales ne s'étant pas développées il faudra essayer d'ajouter du filtrat de culture dans les puits ne contenant qu'un parasite afin de vérifier si le parasite produit un facteur de croissance.

La description du cycle de zoosporulation est vérifiée par les observations, cependant le cycle de multiplication *in vitro* devra être vérifié lors de prochaines études.

L'observation quotidienne directe bien que contraignante semble être la meilleure méthode (par rapport à la fixation).

Cette étude a permis de définir les différents types cellulaires, de ce fait, le comptage et l'observation de celles-ci seront plus faciles lors de prochaines études.

Afin de rendre l'observation du cycle plus aisée lors des premiers jours de culture, il faudrait essayer de récupérer le parasite sous forme trophozoïte à partir du broyat sur des tamis de 10 à 15 μm , ce qui permettrait d'éliminer les débris cellulaires issus des palourdes (<10 μm).

Lors de ce stage des mélanges de cultures du parasites ont pu être cryconservés pour 16 individus, leur viabilité devra être vérifiée au cours du temps. Si la conservation de *Perkinsus olseni* est réussie, cela permettra de déterminer si une ou plusieurs souches du parasite sont présentes et ainsi d'expliquer éventuellement pourquoi des développements irréguliers du parasite ont été observés (hypothèse génétique).

La culture du parasite à partir d'hypnospores ne paraît pas envisageable avec une lyse à la soude puisque celle-ci altère les cellules du parasite, diminuant ainsi les chances de culture.

De nouveaux essais devraient être réalisés en utilisant la protéinase K ou sans aucune lyse afin de conclure sur ces deux protocoles.

La récupération du parasite sans lyse donnerait une meilleure conservation des hypnospores, néanmoins, ce protocole ne peut être utilisé pour le dénombrement du parasite dans les branchies. En effet, après 7 jours d'incubation en milieu thioglycolate, les branchies ne sont pas totalement dégradées et de nombreuses cellules parasitaires restent dans celles-ci.

Un protocole comprenant une lyse enzymatique serait donc préférable pour avoir un comptage parasitaire plus exact. Ce mode opératoire permettrait dans un premier temps un diagnostic sur la quantité de parasite présent chez la palourde puis dans un deuxième temps si nécessaire, la culture de celui-ci.

Les contaminations fongiques peuvent poser un problème pour les deux derniers protocoles utilisés, celles-ci pourraient être éventuellement limitées par un ou deux bains d'antifongiques

VII. Bibliographie

Auzoux-Bordenave, S. et al (1995). In vitro sporulation of the clam pathogen *P.atlanticus* under various environmental conditions. Journal of shellfish research, 14, 469,475 p.

Azevedo, C. (1989). Fine structure of Perkinsus Atlanticus sp, parasite of the clam *R;decussatus* from Portugal. J;pathol. 75, 627-635 p.

Barnabé, G. (1986). Aquaculture. Lavoisier, volume I. 521 p.

Bower, S. (2004). *Perkinsus olseni* of Abalone. Fisheries and Oceans Canada - Pacific Region.

Caill-Milly, N. (2003). Evaluation du stock de palourdes du bassin d'Arcachon – Campagne 2003, Ifremer Aquitaine. 64 p.

Casas, S.M. (2002). Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussates* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. Diseases of aquatic organisms, vol.52: 217-231 p.

Choi, K.S. et al (1989). The energetic cost of Perkinsus marinus parasitism in oysters : Quantification of the thioglycolate method. Journal of shellfish research, 8, 125-131 p.

Daou, R. (1989). Action des facteurs hydrologiques et sédimentaires sur le budget énergétique de la palourde japonaise *Ruditapes Philippinarum* élevée dans un écosystème estuarien (bassin de Marennes-Oléron, France).Ecole nationale supérieure agronomique de Rennes. 195 p.

Freshney, R.I (1992). Animal cell culture. A practical approach. IRL PRESS Second edition. 329 p.

Garcia, C., Arzul, I. (2005). Bilan Repamo 2005, Ifremer, 46 p.

Gauthier, J.D., Vasta, G.R. (1995). In vitro culture of the Eastern Oyster Parasite *Perkinsus marinus* : Optimization of methodology. Journal of invertebrate pathology 66. 156-168p.

Goggin, C.L. (1990). Perkinsus spp. from tridacnid clams and other molluscs in Australia. Thèse. University of New South Wales. 172 p.

Gouletquer, P. (1989). Etude des facteurs environnementaux intervenant sur la production de la palourde Japonaise d'élevage *Ruditapes Philippinarum*. Université de Bretagne Occidentale. 347 p.

Henry, M. (1987). Glande digestive de la palourde *Ruditapes Decussatus* Vie marine. Hors série numéro 9. 440 p.

Joly, J.P. (1982). Contribution à la biologie de la palourde *Ruditapes Decussatus L.* Thèse. Université Pierre et Marie Curie, Paris. 113 p.

Kimberly, S.R., Bushek, D., Graves, J.E. (1997). Molecular markers for population genetic analysis of *Perkinsus marinus*. Blackwell Science, Inc. 197-206 p.

Kleinschuster, S.J., Swink, S.L. (1993). A simple method for the *In Vitro* culture of *Perkinsus Marinus*. *The nautilus* 107(2):76-78 p.

La Peyre, J.F., Faisal, M. (1993). In vitro Propagation of the Protozoan *Perkinsus marinus*, a pathogen of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. *Microbiol, School of marine science, Virginia.* 321-323 p.

La Peyre, J.F., Faisal, M. (1995). Improved Method for the initiation of Continuous Cultures of the Oyster Pathogen *Perkinsus marinus*. *American Fisheries society* 124. 144-146 p.

Lester, Davis, (1981). A new *Perkinsus* species from the Abalone *Haliotis ruber*. *Journal of Invertebrate pathology*, 37, 181-187 p.

Leethochavalit, S. (2004). Occurrence of *Perkinsus* sp. In undulated surf clams *Paphai undulata* from the gulf of Thailand. *Diseases of aquatic organisms*, vol. 60: 165-171 p.

Marckin, J.G., Ray S.M. (1966). The taxonomic relationship of *Dermocystidium marinum* Marckin, Owen and Collier. *Journal of Invertebrate pathology*, 62, 105-106 p.

Morana, D. (1987). Approche ultrastructurale des mécanismes de défense à médiation cellulaire chez les mollusques, hôtes intermédiaires des schistosomes. Thèse. Université de Neuchâtel. 76 p.

Murrell, A., S.N. Kleeman, S.C. Barker and R.J.G. Lester (2002). Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester and Davis, 1981 and *Perkinsus Atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 22: 258-265.

Ordàs, M.C., Figueras, A. (1998). In vitro culture of *Perkinsus atlanticus*, a parasite of the carper shell clam *Ruditapes decussatus*. *Diseases of aquatic organisms*. Vol 33 129-136

Perkins, F.O. (1996). The structure of *Perkinsus marinus* with comments on taxonomy and phylogeny of *P.spp.* *Journal of shellfish research* vol 15 67-68 p.

Perkins, F.O. (1966). Life history studies of *Dermocystidium marinum*, an oyster pathogen. Dissertation Florida State University. 273p.

Ralph A. Elston. (2004). *Perkinsus* sp. infection risk for Manila clams, *Venerupis philippinarum* on the Pacific Coast of North and Central America, *Journal of Shellfisheries Research*.

Reeces et al (1997). Total evidence refutes the inclusion of Perkinsus species in the phylum Apicomplexa. Virginia institute of Marine Science.

Ray, S.M. (1952). A culture technique for diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier in oyster. Science 116, 360 p.

Reece, K.S., Bushek, D., Hudson, K.L., Graves, J.E. (2000). Geographic distribution of *Perkinsus marinus* genetic strains along the Atlantic and Gulf coasts of the USA. Institute for Marine Biology and Coastal Research.

Taylor, A.E.R (1987). In vitro methods for parasite cultivation. Academic press 451p

Vilela, H (1950). Benthic life of Tapes Decussatus. Proc.Lisbon.mar.biol.stn, 5,1-79.

Villalba, A. (2004). Perkinsosis in mollusc: A review. Aquatic living Ressources, 17, 411-432 p.

Annexes

Annexe 1

Traduction de la figure 3 page 5

Anterior adductor muscle	Muscle adducteur antérieur
Crystalline style	cristallin
Digestive gland	Glande digestive
Excurrent siphon	Siphon exhalant
Foot	Pied
Gill	Branchies
Gonad	Gonades
Heart	Coeur
Incurrent siphon	Siphon inhalant
Labial palp	Palpe labial
Mantle	Manteau
Nephridia	Reins
Posterior adductor muscle	Muscle adducteur postérieur
Shell	Coquille
Stomach	Estomac
Visceral mass	Masse viscérale

Annexe 2

Récapitulatif : Composition des milieux et solutions

Solution d'antibiotique pour rinçage

Pour 1 Litre en eau de mer stérile :

- 245 mg de péniciline G
- 0.4 g de streptomycine sulfate
- 0.2 g de gentamycine
- 0.4 g de kanamycine A
- 0.2 mg de polymixine B
- 0.4 g d'érythromycine

Milieu de culture cellulaire : DMEM ½

Composition et mode opératoire pour 600 mL de milieu

On prépare un litre de solution d'antibiotiques à 10X en eau de mer stérile contenant :

- 613 mg de Péniciline G
- 1.310 g de Streptomycine sulfate

Dissoudre dans 400 mL d'eau de mer stérile :

- 2 g de DMEM
 - 4.25 g de Ham's
 - 7.15 g de Hepes (tampon)
 - 176 mg de bicarbonate de sodium
 - 30 mL de sérum de veau foetal
- Ajouter 60 mL de solution d'antibiotique à 10X
Ajuster le pH à 6.7 à l'aide de HCl ou NaOH.
Filtrer à 0.22 microns.

Poudre DMEM

- Glucose 1000 mg/L
- Pyruvate
- NaHCO₃

Poudre Ham's

- L-Glutamine
- NaHCO₃

Milieu au thioglycolate pour obtention des hypnospores

Pour un litre d'eau de mer stérile

- 29.4 g de milieu thioglycolate
- Puis le milieu est autoclavé.

Solution stock d'antibiotique pour milieu thioglycolate

- 6.66 g de péniciline G

3.2 g de streptomycine
1 L d'eau de mer stérile

Pour la recherche de *Perkinsus olseni* on place dans un tube 1mL de la solution stock d'antibiotique et 9mL de milieu thioglycolate.

Solution de protéinase K

Pour 100mL :

0.5 mL de solution stock de protéinase K à 10 mg/mL en eau distillée
99.5 mL de solution tampon pour protéinase K

Solution tampon pour protéinase K

5 mL de Tris à 1M
2 mL d'EDTA à 0.5M
200 microlitres de NaCl à 5M
100 mL d'eau distillée

Phosphate Buffer Saline

Pour 1 litre de solution à 1X :

8 g de NaCl
1.36g de KH₂PO₄
8.06g de Na₂HPO₄
1 g d'EDTA
0.1g de NaN₃

Annexe 3

culture in vitro

Milieu DMEM : Ham's F-12 (1:2)

Dissoudre dans de l'eau de mer stérile le DMEM et le Ham's F-12 avec un ratio de 1 pour 2.

Ajouter 50 mM de tampon Hepes, 3.5 mM de bicarbonate de sodium, 5% sérum de veau foetal, 100 U/mL de pénicilline G et 100 U/mL de streptomycine sulfate.

Ajuster le pH entre 6,6 et 6,8.

Filtrer ensuite la solution à 0,22µm.

Milieu DMEM : Ham's F-12 (1:1)

Dissoudre dans de l'eau de mer stérile le DMEM et le Ham's F-12 avec un ratio de 1 pour 1.

Ajouter 50 mM de tampon Hepes, 3.5 mM de bicarbonate de sodium, 5% sérum de veau foetal, 100 U/mL de pénicilline G et 100 U/mL de streptomycine sulfate.

Ajuster le pH entre 6,6 et 6,8.

Filtrer ensuite la solution à 0,22µm.

Solution d'antibiotiques de rinçage

400 000 U pénicilline G

0,4 g streptomycine sulfate

0,2 g gentamycine

0,4 g kanamycine A

0,2 mg neomycine

0,2 g polymyxine B

0,4 g érythromycine

1 litre d'eau de mer stérile

Mélanger et conserver la solution au réfrigérateur

Protocole de culture in vitro

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

1. Mise en culture à partir des branchies de palourde
2. Nettoyer et sécher la palourde à l'aide d'un papier absorbant
3. L'ouvrir à l'aide d'un couteau
4. Prélever les deux feuilletts d'une branchie à l'aide de ciseaux et d'une pince.
5. Les mettre dans 10 mL d'eau de mer stérile (plaque 6 puits) et les rincer trois fois. Renouveler l'eau de mer stérile entre chaque rinçage
6. Décontaminer les 2 fois 30 minutes dans la solution d'antibiotiques, la solution d'antibiotique étant renouvelée entre les deux décontaminations
7. Les rincer 3 fois dans un tube contenant 10 mL d'eau de mer stérile de la même manière qu'à l'étape 5
8. Placer les dans un microtube de 1.5mL contenant 250 µL d'eau de mer stérile et broyer les à l'aide d'un piston

9. Ajouter 750 μL d'eau de mer stérile et mélanger
10. Filtrer le broyat sur un filtre à 100 μm
11. Ensemencer avec 100 μL de filtrat 4 puits dans une première plaque (culture du parasite), 6 puits dans une seconde plaque (suivi du cycle) dans 1 mL de milieu DMEM/HAM's
12. Incuber les plaques à 26°C en chambre humide

Annexe 4

Cryoconservation

Milieus de cryoconservation

Milieu DMEM : Ham's F-12 (1:1)

Dissoudre dans de l'eau de mer stérile le DMEM et le Ham's F-12 avec un ratio de 1 pour 1.

Ajouter 50 mM de tampon Hepes, 3.5 mM de bicarbonate de sodium, 5% sérum de veau foetal, 100 U/mL de pénicilline G et 100 U/mL de streptomycine sulfate.

Ajuster le pH entre 6,6 et 6,8.

Filtrer ensuite la solution à 0,22µm.

Pour les cultures sur milieu DMEM : Ham's F-12

40% du milieu DMEM : Ham's F-12 (1:1)

10 % de DMSO

50 % de sérum de veau foetal

Filtrer la solution à 0,22µm et la conserver au réfrigérateur.

Cryoconservation de *Perkinsus olseni/atlanticus* à partir des cultures

1. Prélever le milieu de culture et les cellules parasitaires en phase de multiplication dans les flasques de culture
2. Centrifuger les pendant 15 minutes à 800 x g à 25°C. Jeter le surnageant et suspendre le culot dans 1 mL de milieu de culture (milieu de DMEM : Ham's F-12 (1:2) Renouveler 2 fois ce rinçage
3. Suspendre le culot dans le milieu de cryoconservation et répartir dans des cryotubes
4. Refroidir les cryotubes une nuit à -20°C et les mettre ensuite à -80°C

Annexe 5

Quantification de Perkinsus par la méthode au thioglycolate

I – Préparation des milieux

✱ **Milieu au thioglycolate pour 1000ml**

- 29.4 g milieu thioglycolate
- 800 ml d'eau de mer stérile

pH 7, qsp 1000 ml, porter à ébullition sous agitation. Autoclaver.

✱ **Solution stock d'antibiotique**

- 6.66 g pénicilline G
- 3.2 g de streptomycine
- 1000 ml d'eau distillée stérile

Filtrer et aliquoter dans des falcons de 50 ml, conservation au réfrigérateur.

✱ **Solution de NaOH 2 M**

- 80 g NaOH
- 1000 ml eau distillée

Conserver à température ambiante.

II – Mode opératoire.

- Répartir 9 ml de milieu au thioglycolate par tube.
- Ajouter 1 ml des solutions stock d'antibiotique.
- Essuyer les coquilles des animaux avec un papier absorbant
- Inscrire le numéro de l'individu sur la coquille afin de recherche ultérieurement de l'anneau brun.
- Ouvrir l'animal puis éliminer le liquide intervalvaire. Rincer le couteau à l'alcool entre chaque individu.
- Ponctionner à l'aide d'une aiguille courber le liquide extrapalléale (liquide se trouvant entre la coquille et le siphon), le déposer dans un microtube afin de rechercher du vibrio tapetis par PCR. Congeler les tubes. Rincer l'aiguille à l'eau distillée (8 fois) entre chaque prélèvement.
- Décoquiller l'animal et le peser, mettre la coquille dans un sachet minigrip.
- Prélever un morceau du manteau, le peser et le congeler dans un microtube. (extraction d'ADN ultérieur).
- Prélever les 4 feuillets branchiaux à l'aide d'une pince ou ciseaux, les peser, puis incubé dans le milieu au thioglycolate.
- Mettre le reste des tissus dans un sachet minigrip tarer, peser l'ensemble et le congeler
- Incuber pendant 1 semaine à l'obscurité et à température ambiante.
- Centrifuger les tubes 1000 tr/min pendant 10 minutes à température ambiante
- Enlever 5 ml de surnageant à la pipette (bidon récup).
- Ajouter 5 ml de NaOH 2N, incubé au minimum 1 heure à 50°C.
- Vortexer, centrifuger les tubes 1000 tr/min pendant 10 minutes à température ambiante.

- Enlever 5 ml de surnageant à la pipette(bidon récup).
- Ajouter 5 ml de NaOH 2N , incuber au minimum 1 heure à 50°C.
- Vortexer, centrifuger les tubes 1000 tr/min pendant 10 minutes à température ambiante.
- Enlever le surnageant à la pipette et ne laisser que 1 ml de liquide.
- Mélanger vigoureusement l'échantillon, déposer l'échantillon sur la cellule de Malassez.
- Compter au microscope(objectif X10) les parasites ,soit sur la totalité de la cellule ou, sur 10 rectangles. Pour chaque échantillons faire 4 comptages. Si le nombre de parasite est trop important, rajouter 1 ou 2 ml de soude afin de diluer l'échantillon. Refaire les comptages.
- Pour tous les échantillons ayant du Perkinsus, rincer le culot avec 10 ml de tampon PBS 1x
- Centrifuger les tubes 1000 tr/min pendant 10 minutes à température ambiante. Refaire ces deux dernière étape une deuxième fois.
- Resuspendre les culots avec 1 ml de PBS , transférer dans un microtube de 1.5 ml et les congeler.

III – Calcul du nombre de parasites par gramme de chair

Pour une lecture sur 10 rectangles :

Nbre de perkinsus/ millilitre de suspension (NPml)= $\Sigma X/4 \times 10000 \times V$

Pour une lecture sur 1 cellule complète.

Nbre de perkinsus/ millilitre de suspension (NPml)= $\Sigma X/4 \times 1000 \times V$

X : nombre de parasites observés

V : volume de surnageant

Nbre de perkinsus/ gramme de chair = NPml /Y

Y : poids des branchies

ANNEXE 6

Mise en culture à partir d'hypnospores

Milieu DMEM : Ham's F-12 (1:2)

Dissoudre dans de l'eau de mer stérile le DMEM et le Ham's F-12 avec un ratio de 1 pour 2.

Ajouter 50 mM de tampon Hepes, 3.5 mM de bicarbonate de sodium, 5% sérum de veau foetal, 100 U/mL de pénicilline G et 100 U/mL de streptomycine sulfate.

Ajuster le pH entre 6,6 et 6,8.

Filtrer ensuite la solution à 0,22µm.

Mise en culture à partir d'hypnospores de *Perkinsus olseni/atlanticus*

1. Récupérer les hypnospores après quantification de ces dernières.
2. Les mettre dans un tube contenant 10 mL d'eau de mer filtrée stérile et centrifuger à 600 x g pendant 10 minutes. Jeter le surnageant et renouveler ce rinçage 2 fois.
3. Les décontaminer 30 minutes dans 10mL de solution d'antibiotiques puis centrifuger à 600 x g pendant 10 minutes. Jeter le surnageant et renouveler une fois la décontamination.
4. Les rincer 3 fois comme dans l'étape 2.
5. Les remettre en suspension dans 1 mL d'eau de mer stérile et centrifuger pendant 3 minutes à 50 x g.
6. Récupérer le surnageant contenant les hypnospores
7. Centrifuger 2 fois le surnageant en eau de mer stérile à 400 x g pendant 10 minutes.
- 8.ensemencer les cellules d'hypnospores par puits dans 6 puits contenant 1 mL de milieu de DMEM : Ham's F-12 (1:2).
9. Incuber les plaques à 26°C en chambre humide.

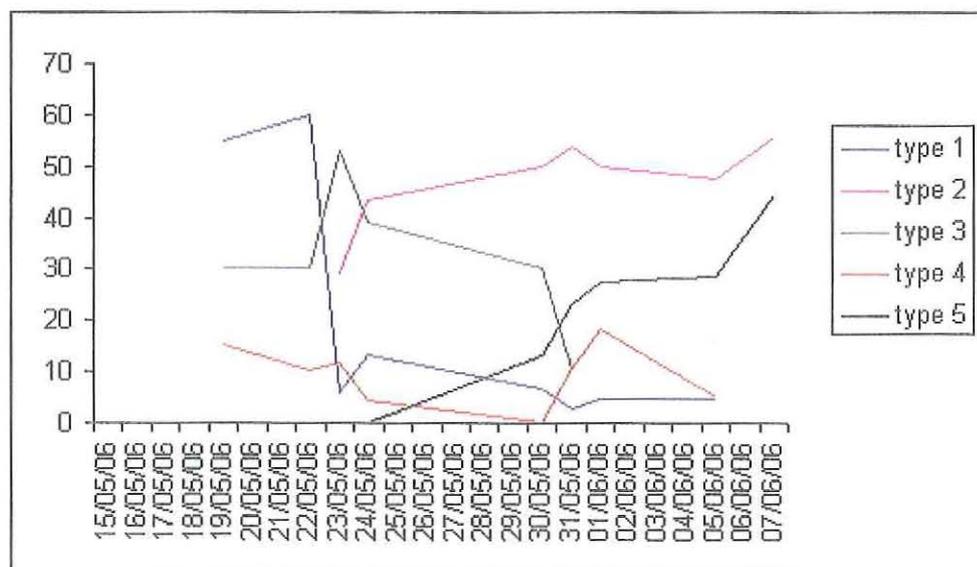
Annexe 7

lot 06-021 échantillon

27

nombre d'individus de type X / total individus comptés, %

date	type 1	type 2	type 3	type 4	type 5	total
19/05/06		55	30	15	0	100
22/05/06		60	30	10	0	100
23/05/06	6	29	53	12	0	100
24/05/06	13	43	39	4	0	100
30/05/06	7	50	30	0	13	100
31/05/06	3	54	10	10	23	100
01/06/06	5	50		18	27	100
05/06/06	5	48	14	5	29	100
07/06/06		56			44	100



Annexe 8

Nombre de Perkinsus présents dans une branchie par la méthode au thioglycolate

	lot 06-021	lot 06-022
échantillon	Nombre de perkinsus dans 1mm ³	Nombre de perkinsus dans 1mm ³
1	3	0
2	0	0,5
3	0	0
4	5	2
5	36	0
6	0	3
7	0	3
8	4	0
9	0	3
10	9	1
11	27	0
12	0	0
13	0	20
14	11	0
15	0	2
16	0	12
17	3	6
18	0	0
19	31	0
20	3	0
21	16	0
22	0,5	5
23	0,5	11
24	0	20

Annexe 9

Individus	thio	Nbre perk	Culture
1	+	3000	-
2	-	0	+++
3	-	0	-
4	+	5000	+++
5	+	36000	+++
6	-	0	-
7	-	0	-
8	+	4000	+++
9	-	0	-
10	+	9000	+
11	+	27000	+++
12	-	0	-
13	-	0	++
14	+	11000	++
15	-	0	-
16	-	0	-
17	+	3000	++
18	-	0	-
19	+	31000	+++
20	+	3000	-
21	+	16000	+++
22	+	0,5	++
23	+	0,5	+++
24	-	0	-
25	-	0	-
26	+	0,5	+++
27	-	0	+
28	+	2000	+++
29	-	0	-
30	+	3000	+++
31	+	3000	+++
32	-	0	+
33	+	3000	+++
34	+	1000	+
35	-	0	+
36	-	0	+
37	+	20000	+++
38	-	0	+++

39	+	2000	++
40	+	12000	+++
41	+	6000	+++
42	-	0	+
43	-	0	+++
44	-	0	+
45	-	0	+++
46	+	5000	+
47	+	11000	+++
48	+	20000	+++

**Test de Mc
Nemar**

Hypothese : pas de difference de detection entre les deux methodes

		thio		total
		positif	negatif	
cuture	positif	24	11	35
	negatif	2	11	13
Total		26	22	48

$$A = 1,692308$$

$$B = 0,307692$$

$$\ln A = 0,526093$$

$$\ln B = -1,17865$$

$$G = 6,859428$$

$$Q = 1,038462$$

G
corrige = 6,605375

G supérieur au chi 2 à 1 degré de liberté donc on rejette l'hypothèse.

Il y a une différence entre les deux méthodes