

STATION DE PATHOLOGIE ET DE GENETIQUE
DES INVERTEBRES MARINS
LA TREMBLADE



RAPPORT FINAL

MISE AU POINT DE CULTURES CELLULAIRES DE
MOLLUSQUES MARINS

Contrat FARI 85.02.08

LA TREMBLADE, Novembre 1986.



STATION DE PATHOLOGIE ET DE GENETIQUE
DES INVERTEBRES MARINS
LA TREMBLADE

RAPPORT FINAL

MISE AU POINT DE CULTURES CELLULAIRES DE
MOLLUSQUES MARINS

Contrat FARI 85.02.08

LA TREMBLADE, Novembre 1986.

Résumé

Le problème majeur allant à l'encontre du développement de l'aquaculture dans le monde, en particulier pour l'élevage des mollusques, est lié à des maladies infectieuses. Les agents responsables sont essentiellement des parasites et des microorganismes intracellulaires.

Les données acquises en pathologie des mollusques sont à l'heure actuelle en majorité descriptives, mais compte tenu de l'impact économique de ces maladies, des recherches doivent être développées pour élaborer des mesures prophylactiques et thérapeutiques.

Dans cette optique l'établissement de lignées cellulaires de mollusques marins constitue une priorité car, à l'instar des lignées cellulaires de vertébrés utilisées en pathologie humaine et vétérinaire, elles permettraient la production in vitro des agents pathogènes et de ce fait d'appréhender l'étude des relations hôte-pathogène à l'échelle cellulaire et moléculaire. Par ailleurs dans une optique plus finalisée, elles contribueraient à la mise au point de diagnostic fiable des agents pathogènes et la sélection expérimentale d'animaux résistants aux maladies.

Depuis une vingtaine d'années des essais ont été menés de façon fragmentaire par diverses équipes, mais à ce jour il n'existe toujours pas de lignée cellulaire de mollusque marin.

Nos travaux ont donc porté sur l'élaboration des bases méthodologiques. Ainsi, nous avons pu établir des protocoles d'aseptisation adaptés aux différents tissus adultes ou larvaires. Sur la base des caractéristiques biochimiques et physiochimiques de l'hémolymphe des bivalves et des connaissances acquises en culture de cellules animales, nous avons ensuite élaboré un milieu de culture. Celui-ci a alors été utilisé pour la réalisation de nombreuses primocultures de cellules de l'huître plate Ostrea edulis. Les cultures les plus dynamiques se sont avérées être d'origine larvaire bien que des survies cellulaires de plusieurs semaines aient été obtenues pour plusieurs tissus d'huîtres adultes. Par ailleurs ce milieu a permis le développement du parasite Bonamia ostreae dans des hémocytes maintenus in vitro pendant quelques semaines.

Compte tenu de l'importance que revêt l'établissement d'une lignée cellulaire de bivalves pour le développement des études en pathologie des mollusques, nos travaux seront poursuivis en multipliant les primocultures de cellules de larves grâce à la production de l'écloserie expérimentale I.F.R.E.MER de La Tremblade. Parallèlement des amendements du milieu de culture seront appréhendés par complémentation avec différentes fractions telles que, hémolymphe homologue ou extraits de ganglions cérébroïdes. D'autre part des essais d'induction de tumeurs seront entrepris par cancérogenèse chimique ou virale afin de disposer de cellules cancéreuses susceptibles de se multiplier in vitro.

Introduction

L'aquaculture constitue à l'échelle mondiale un domaine d'activités en pleine expansion parmi lesquelles la production de coquillages est la plus importante d'un point de vue économique. La conchyliculture subit cependant différents aléas, dont le principal est lié aux problèmes de pathologie. En effet des maladies infectieuses affectent, dans toutes les régions du monde, les différentes espèces de mollusques élevées. Ces maladies sont dues essentiellement à des agents pathogènes intracellulaires, virus, microorganismes ou parasites, et se traduisent par de véritables épizooties responsables de pertes économiques notables. L'histoire de l'ostréiculture française illustre parfaitement cette situation (fig.1).

Dans ce contexte, il importe de franchir l'étape descriptive des agents pathogènes où se trouve actuellement la pathologie des mollusques, et d'établir les bases de recherches nécessaires à l'élaboration de mesures prophylactiques et thérapeutiques adaptées. A l'instar des résultats acquis en pathologie humaine et vétérinaire, il apparaît que de telles mesures dépendent, entre autres, de la mise au point de cultures cellulaires permettant la culture in vitro des agents pathogènes intracellulaires.

En effet d'un point de vue fondamental, il serait possible d'appréhender les relations hôte-parasite à l'échelle cellulaire et moléculaire, alors que dans une optique plus finalisée, ces cultures cellulaires faciliteraient la production de parasites utilisables, par exemple pour modéliser la reproduction expérimentale de la maladie et dans le but de sélectionner des individus plus résistants; elles permettraient également la mise au point de diagnostics de microorganismes, ainsi que l'analyse précise de substances antiparasitaires.

Les premiers travaux réalisés sur la culture de cellules de mollusques marins datent des années 60, initialement stimulés par l'établissement de plusieurs lignées cellulaires d'insectes utilisées dans de nombreuses études de pathologie de ces animaux. Les essais ont porté essentiellement sur des tissus de bivalves avec des milieux de culture simples composés d'eau de mer complétés par du sérum de vertébré (Vago et al 1960, Tripp 1963, Tripp et al 1966, Chardonnet 1963, Perkins et al 1964). La survie des cellules était toujours limitée, de quelques jours à quelques semaines, bien que certaines publications annonçaient l'établissement de lignées cellulaires (Vago et al 1960, Doutko 1967).

Plus récemment, suite à plusieurs épizooties virales et parasitaires catastrophiques d'un point de vue économique (Sindermann 1976, Grizel et Comps 1974, Pichot et al 1980) des recherches furent à nouveau entreprises (Cousserans 1975, Hetrich et al 1981). Ces travaux, qui n'ont pas abouti

à l'obtention de lignées cellulaires, ont néanmoins montré l'intérêt d'utiliser des tissus larvaires qui s'avéraient particulièrement dynamiques lors de la mise en culture. Ces résultats rejoignent ceux obtenus en culture de cellules d'insectes pour lesquels la majorité des lignées cellulaires sont d'origine embryonnaire ou larvaire. Cependant l'absence d'écloserie expérimentale pour produire des larves toute l'année, et les difficultés d'obtention de tissus larvaires aseptiques, conduisaient ces équipes à cesser progressivement leurs investigations.

A ce jour il n'existe aucune lignée cellulaire de mollusques marins, le caractère infructueux de ces travaux soulignant des difficultés spécifiques : soit pratiques, pour obtenir régulièrement des tissus aseptisés favorables à la réalisation de primocultures, soit théoriques, liées au manque de données physiologiques nécessaires à l'élaboration de milieux de cultures adaptés.

Par contre l'établissement d'une lignée de cellules embryonnaires du mollusque gastéropode Biomphalaria glabrata (Hansen 1974) confère aux essais de culture cellulaire de bivalves une certaine faisabilité.

C'est dans ce contexte que l'équipe I.F.R.E.MER a entrepris en septembre 1985, ce programme de travail sur la "mise au point de cultures cellulaires de mollusques marins".

Nos travaux ont porté sur la culture de cellules de l'huître plate Ostrea edulis et de l'huître creuse Crassostrea gigas. Initialement, nous nous sommes attachés à la mise au point de protocoles de désinfection des tissus mis en culture et à l'élaboration d'un milieu de culture. Ensuite des primocultures cellulaires ont été réalisées en vue d'identifier les tissus les plus dynamiques in vitro.

Résultats

I - METHODES D'OBTENTION DE TISSUS ASEPTIQUES :

L'environnement des bivalves, dans le milieu naturel ou au laboratoire, est relativement contaminé par divers types de microorganismes (bactéries, levures) et de protozoaires (amibes, ciliés). La majorité des tissus de ces animaux étant en contact direct avec l'environnement (Fig.2,3), une désinfection efficace doit nécessairement précéder la mise en culture des tissus afin d'éviter le développement ultérieur de ces contaminants. . Différentes méthodes ont été mises au point, selon la nature des tissus larvaires et adultes. Elles reposent sur l'utilisation d'antibiotiques bactériens et fongiques, de substances protozoocides et de désinfectants externes.

1 - Tissus de la glande digestive :

Cette glande correspond à plusieurs organes étroitement associés (rein, diverticules digestifs, estomac) au sein d'un tissu de type conjonctif. L'intérêt d'entreprendre la culture de ces tissus résidait dans la variété des agents pathogènes qui s'y développent (Rickettsies, Chlamydies, Marteilia). Cependant leur nature digestive s'est avérée constituer une difficulté insoluble pour une désinfection efficace, compte tenu du grand nombre de contaminants intrinsèques. En effet l'utilisation des

solutions désinfectantes relativement drastiques (KMnO₄ 0,1%, Alcool 70°; solution de white; hypochlorite de sodium), seules ou associées à des antibiotiques (pénicilline 0,1%; streptomycine 0,1%, chloramphénicol 0,05%, fungizone 25 ug/ml) indiquait une toxicité cellulaire notable sans toutefois éviter la contamination ultérieure par des protozoaires de type Labyrinthomorpha (Bowers 1986). Il faut noter que ces contaminants apparaissent tout à fait similaires aux formes cultivées par Cousserans (communication personnelle) et par Comps (1983) en tant que Bonamia ostreae parasite de l'huître plate.

2 - Tissus branchial, palpial et palléal :

L'intérêt de ces tissus pour établir des primocultures est lié à leur richesse en cellules conjonctives qui sont peu différenciées et de ce fait susceptibles de se développer in vitro.

Plusieurs solutions testées se sont avérées cytotoxiques aux concentrations efficaces (alcool, hypochlorite de sodium, solution de white).

La désinfection fiable de ces tissus a été obtenue par traitement au KMnO₄ (0,1 %) pendant 10 minutes et aux antibiotiques (pénicilline 0,1%, streptomycine 0,1%, chloramphenicol 0,01%) pendant 24 heures.

Cependant cette méthode s'est révélée à l'usage relativement stressante pour les cellules, ne permettant pas notamment la fixation des explants. Un protocole de désinfection moins traumatisants pour les cellules a alors été établi. Il consiste à effectuer une série de lavages des organes de l'huître avec de l'eau de mer stérilisée à laquelle est additionné du détergent Tween 80 à raison de 1%. Des explants sont alors prélevés et soumis pendant quelques minutes à un jet d'eau de mer stérilisée, Tween 80 1%. Les explants sont ensuite dissociés et maintenus pendant trois jours dans une solution d'antibiotiques bactériens, inhibiteurs spécifiques de la synthèse des peptidoglycanes pariétaux (penicilline 0,1%, bacitracine 0,05%). Dans ces conditions, seules des contaminations occasionnelles par des champignons ont eu lieu, le plus souvent enrayées par simple élimination des mycéliums.

3 - Tissus sanguin et cardiaque :

Leur culture s'avère particulièrement intéressante en raison de la diversité des agents pathogènes qui s'y développent (Iridovirus, Haplosporidies, Bonamia, Perkinsus).

Par ailleurs la localisation interne des tissus sanguin et cardiaque permet de les prélever aseptiquement après une simple désinfection externe du corps de l'animal par l'alcool 70°.

4 - Tissus larvaires :

A l'instar, des autres groupes d'invertébrés (insectes, arachnides, gastéropodes) pour lesquels la majorité des lignées cellulaires ont pu être établies à partir de tissus embryonnaires et larvaires, l'utilisation de ces tissus, relativement peu différenciés, était à priori favorable.

L'huître plate O. edulis étant larvipare, les larves qui mesurent de 50 à 200 um selon leur stade de développement, sont prélevées dans la cavité palléale des femelles gravides. Celle ci sont reconnaissables aisément, si elles sont maintenues dans des bacs à fond noir, car des embryons s'échappent des valves et s'accumulent sous la coquille de la mère.

Les larves sont réparties en fractions aliquotes de 100 000 environ et placées dans un dispositif autoclavable (cylindre de polypropylène h:15 cm; diamètre 2,5 cm) au fond duquel se trouve une toile nylon de 25 um de maille. De cette façon, il est facile de laver abondamment les larves avec de l'eau de mer stérilisée.

Dans les premiers essais, elles étaient alors immergées dans une solution KMnO₄ (0,1%, 5 mn) pour tuer les protozoaires contaminants. Ce traitement, relativement bien supporté par les stades larvaires âgés, s'est avéré toxique pour les stades plus jeunes particulièrement intéressants pour établir des primocultures.

La décontamination des tissus larvaires d'O. edulis a donc été axée sur l'importance des lavages et le maintien ultérieur dans une solution concentrée d'antibiotiques (pénicilline 0,1%, streptomycine 0,1%, chloramphenicol 0,01%). Dans ces conditions le développement in vitro des larves se poursuit normalement. Des cas sporadiques de contaminations par des champignons se sont produits mais ont été stoppés par simple élimination à la pipette.

Des essais de désinfection de larves de l'huître creuse Crassostrea gigas ont aussi été réalisés. Chez cette espèce ovipare la fécondation a lieu dans le milieu. Des larves produites dans une éclosérie privée, ont été traitées selon le protocole établi pour les larves d'O.edulis. Malheureusement la contamination des tissus larvaires, notamment par des protozoaires et des levures, a imposé l'utilisation de solutions de fungizone (25 ug/ml) et de dimetridazole (2 X 10. M) toxiques à ces concentrations efficaces.

Dans le but d'éviter ces problèmes de contamination précoce des tissus larvaires de Crassostrea gigas, des essais de prélèvement aseptique d'ovules et de spermatozoïdes et de fécondation in vitro ont été effectués avec succès. Cependant une telle démarche pour obtenir des tissus larvaires aseptiques de C.gigas s'est rapidement avérée trop lourde à mettre en oeuvre, comparativement à l'obtention de larves aseptiques de O.edulis.

II - ELABORATION D'UN MILIEU DE CULTURE :

Différents tissus pouvant être obtenus aseptiquement, nous avons établi la composition d'un milieu de culture sur la base de caractéristiques physicochimiques de l'hémolymphe des mollusques.

Les données biochimiques concernant l'hémolymphe se limitent aux concentrations en acides aminés libres (Bishop et al. 1983) aux teneurs en protéines totales et en sucres (De Zwaan 1983) et à certains constituants inorganiques (DEANE et al. 1979), mais il faut noter que ces données varient énormément en fonction des espèces, des individus et de leur état physiologique. Par contre des critères physicochimiques tels que la pression osmotique et le pH sont mieux définis.

Le milieu que nous avons établi (Fig.4 et 4 bis) tient compte de ces caractéristiques. Il repose sur deux milieux le M199 et le RPMI 1640 classiquement utilisés en culture de cellules animales. Un acide aminé, la taurine, présent dans les tissus d'huître et probablement impliqué dans l'osmorégulation cellulaire, a été ajouté à la concentration de 2,5 mg/l. Des ions Ca^{++} , intervenant dans les phénomènes d'adhésion cellulaire sur les substrats de culture, ont été introduits sous forme de $CaCl_2$ à une concentration voisine de celle de l'eau de mer.

Par ailleurs ce milieu a été complété par du sérum de veau foetal (15%) et de l'hydrolysate de levure (440 mg/l), en tant que fractions non définies qui apportent notamment des précurseurs nucléotidiques et des facteurs de croissance.

Le milieu, tamponné par de l'Hepes (25 mM) à un pH de 7.4, a une pression osmotique ajustée à 1 000 mosm avec des "sea-salts" (Sigma) (22,25 g/l), mélange artificiel de sels basé sur la composition de l'eau de mer.

Ce milieu a été dans certains essais additionné en hémolymphe de C.gigas (10 %) pour fournir d'éventuels facteurs spécifiques nécessaires aux cellules cultivées.

Pour d'autres essais, des extraits de ganglions cérébroïdes du gastéropode Crepidula fornicata ont été incorporés au milieu de culture à la concentration de 1 ganglion/3 ml). En effet, ce sont les seuls organes endocrines de mollusques pour lequel certaines hypothèses font état de la présence d'un facteur mitotique peu spécifique (Lenpronne C., 1984). Cet extrait est préparé par broyage à l'homogénéiseur de Dounce des ganglions prélevés après dissection fine des crépidules (fig.10).

III - PRIMOCULTURES CELLULAIRES :

L'obtention régulière de tissus aseptiques, permet d'entreprendre la mise en culture des cellules. Ces primocultures peuvent être initiées soit par dissociation enzymatique des tissus, soit par dissociation mécanique.

Dans le premier cas, l'obtention de petits explants et de cellules isolées repose sur la digestion par la trypsine des protéines membranaires impliquées dans la cohésion tissulaire; la solution enzymatique de trypsine (fig.12) contient aussi de l'EDTA, agent chélateur des ions Ca^{++} qui interviennent également dans l'adhérence intercellulaire. Ce mode de dissociation tissulaire s'avère cependant inadapté pour les tissus de mollusques qui apparaissent très sensibles à la mise en contact avec l'enzyme.

Les primocultures ont donc été établies après dissociation mécanique des tissus, la taille des explants étant liée directement à l'importance de la fragmentation tissulaire. Les explants sont ensuite centrifugés afin d'éliminer les enzymes endocellulaires libérés des cellules lésées lors de la dissociation.

Les cultures devant être maintenues plusieurs semaines, des fioles de 25 cm² à bouchon vissable ont été utilisées car elles permettent des changements répétés du milieu sans risque de contamination. Afin de favoriser la fixation des explants, les fioles sont prétraitées avec une solution de polylysine (0,1 mg/ml; 2 ml/fiole) qui forme un revêtement de polymères chargés positivement.

La température d'incubation des cultures de cellules larvaires est de 25°C, celle des cellules de tissus adultes de 20°C.

La fréquence et le volume des changements de milieu dépendent évidemment de l'évolution de chaque primoculture. En moyenne, dans le but de maintenir constantes les caractéristiques du milieu de culture des cellules, un changement du tiers du volume est effectué chaque semaine.

L'observation des cellules mises en culture dans ce milieu, après dissociation mécanique des tissus, conduit aux commentaires suivants :

- les cellules provenant des tissus branchial, palpial et palléal sont de trois types :

* des cellules ciliées (8 μ m) constituant les épithéliums de ces tissus, semblent très fragiles lorsqu'elles sont isolées. Elles perdent rapidement leur ciliature après quelques jours de culture puis dégèrent. Par contre, au sein d'explants fixés, elles restent actives plusieurs semaines sans toutefois qu'il y ait de migration de ces cellules à partir de l'explant.

* des cellules sphériques de plus petite taille (6 μ m) peu différenciées et non fixées sont présentes en grand nombre. Assimilées à des cellules conjonctives leur évolution est difficile à appréhender car il n'apparaît pas de signe évident de dégénérescence, ou de transformation, ni de division cellulaire.

* des cellules plus ou moins réfringentes fixées sur le substrat correspondent aux hémocytes dispersés dans l'ensemble des tissus. Ces hémocytes (fig.8) restent actifs trois semaines environ, puis progressivement se vacuolisent, se remettent en suspension et dégènèrent.

Ces primocultures, au nombre de 500, ont été établies dans le milieu de culture de base. Parallèlement dix cultures de chacun de ces tissus ont été maintenues pendant trois mois dans ce milieu complété d'une part avec 10% d'hémolymphe de C.gigas et d'autre part avec l'extrait de ganglions cérébroïdes de C.fornicata. Le comportement de ces cellules a été similaire à celles entretenues avec le milieu de base.

- Les cellules larvaires d'O.edulis se sont avérées rapidement particulièrement favorables à l'établissement de primocultures. De plus les nombreux essais effectués avec les différents stades larvaires indiquent que les jeunes larves véligères représentent le stade optimal de différenciation (Fig.3). En effet, plus tôt les cellules sont trop chargées en réserves vitellines et par conséquent très fragiles, plus tard les tissus larvaires sont trop différenciés et les coquilles néoformées constituent un obstacle à la dissociation tissulaire.

La dissociation mécanique, par aspiration et refoulement à la pipette Pasteur, des tissus de larves véligères est préférable à une dissociation enzymatique des cellules particulièrement sensibles à un tel traitement.

Les primocultures cellulaires de tissus larvaires de larves véligères se caractérisent par une fixation des explants en quelques heures et une migration rapide des cellules dès le 2ème jour de culture (Fig.5). Après quelques jours de culture, la majorité des explants se sont étalés sur le substrat (fig.6). Le dynamisme de l'activité cellulaire reste évident pendant plusieurs semaines puisque des mouvements contractiles animent de façon rythmique certains explants. Simultanément des petites cellules se mettent en suspension et apparaissent sphériques (4 à 6 um) et très réfringentes.

Cependant à partir de la 6ème semaine de culture, les cellules s'altèrent progressivement et relarguent du matériel granulaire qui envahit peu à peu le milieu, malgré le changement régulier de ce dernier. Les cultures déclinent rapidement sans qu'il y ait eu de multiplication cellulaire observable.

Ce travail qui dépendait de l'approvisionnement en huîtres prélevées dans le milieu naturel a donc été limité à la période naturelle de reproduction de cette espèce (juin - septembre). De ce fait, des essais pour améliorer les conditions de culture n'ont pas été possibles, notamment pour tester des complémentations du milieu de culture avec différents additifs tels que hémolymphe, ou extraits de ganglions cérébroïdes.

- Tissus sanguin et cardiaque :

Compte tenu de la facilité d'obtention aseptique de ces tissus et du tropisme qu'ont pour eux de nombreux agents pathogènes, la culture in vitro des cellules sanguines et cardiaques constitue une priorité.

Les primocultures contiennent d'une part des explants de tissus cardiaques dont l'activité contractile atteste de la viabilité des cellules conjonctives et musculaires qui le constituent, et d'autre part de très nombreux hémocytes de type granulocytes et hyalinocytes fixés ou en suspension. Ceux-ci survivent parfaitement trois à quatre semaines puis commencent à montrer des signes de dégénérescence. Il n'y a pas de mitoses observables ce qui corrobore les données histologiques qui stipulent que ces cellules différenciées sont issues de cellules souches provenant probablement d'un organe hématopoïétique diffus.

Pour les différentes raisons énoncées ci-dessus, il apparaît que ces tissus constituent un modèle de choix pour des essais d'induction de mitoses par des agents chimiques ou viraux.

IV - CULTURE IN VITRO DU PARASITE BONAMIA OSTEAEE ET
PATHOLOGIE EXPERIMENTALE :

L'établissement de cultures cellulaires de mollusques, si possible de lignées cellulaires stables se multipliant de façon illimitée, à pour but essentiel de pouvoir cultiver et étudier in vitro les agents intracellulaires pathogènes pour ces animaux.

L'impossibilité à court terme de disposer de lignée cellulaire nous a conduit à aborder la culture in vitro de Bonamia ostreae, parasite intra-hémocytaire de l'huître plate, sur des primocultures de tissus sanguins.

Initialement, des primocultures d'hémolymphe parasitées ont été réalisées afin de vérifier si les conditions de culture, notamment le milieu de culture, ne perturbaient pas le développement du parasite. Celui-ci est identifié aisément dans des cellules en immunofluorescence indirecte (Fig.9). En effet nous disposons d'immunsérums spécifiques de Bonamia ostreae que nous avons préparés par immunisation de souris avec des suspensions hautement purifiées et concentrées de parasites (50 M/ml).

Par cette méthode nous avons observé, dans vingt primocultures infectées, une augmentation du nombre de parasites en fonction du temps.

Des infections expérimentales de cultures d'hémocytes sains ont été alors réalisées avec des suspensions de parasites, exemptes de microorganismes contaminants. Ces parasites sont obtenus à partir d'hémolymphe parasitée, prélevée aseptiquement et broyée à l'aide d'un homogénéiseur de type Dounce. Ainsi seuls les hémocytes sont cassés et les parasites sont concentrés par centrifugation (3 500 t/mn; 30 mn). Ils sont introduits dans des primocultures d'hémocytes sains. Bonamia ostreae se développe comme l'atteste le nombre de parasites par hémocyte qui est unitaire 48 h après l'infection des primocultures, et estimé à 6 à 8 Bonamia après 3 semaines de culture.

Il s'agit du premier exemple de développement in vitro d'un parasite intracellulaire obligatoire de mollusque. Ce résultat permet d'entreprendre maintenant une étude analytique des interactions hôte-parasite à l'échelle cellulaire et moléculaire et d'appréhender les mécanismes de pathogénicité.

Conclusions - Discussion

L'analyse des résultats obtenus au cours de cette première année d'investigations conduit à estimer que dans la mise au point de cultures cellulaires de mollusques, certains aspects peuvent être considérés comme acquis, alors que d'autres nécessitent encore de nombreux essais.

En ce qui concerne les premiers, les protocoles d'aseptisation élaborés pour les différents types de tissus se sont avérés particulièrement fiables vis à vis des différents types de microorganismes, bactéries, levures et champignons susceptibles de contaminer rapidement les primocultures. Par ailleurs, ils ne semblent pas traumatisants à l'égard des cellules. Ceci est particulièrement vrai pour les tissus larvaires qui constituent indéniablement la source de cellules la plus favorable pour établir des primocultures. Les essais que nous avons effectués avec les différents stades larvaires nous permettent de considérer que le stade veligère est le plus favorable. Ces observations coïncident avec les résultats obtenus pour les insectes chez qui la majorité des lignées cellulaires ont été établies à partir de tissus embryonnaires ou larvaires. La poursuite de nos essais doit donc être axée sur ce stade véligère, la production de larves étant maintenant possible pratiquement toute l'année suite à l'ouverture de l'écloserie expérimentale I.F.R.E.MER de La Tremblade.

Des difficultés persistent par contre dans l'élaboration d'un milieu susceptible d'induire efficacement les divisions cellulaires. En effet la qualité "nutritive" de notre milieu de culture semble correcte compte tenu de la multiplication effective du parasite intracellulaire Bonamia. Par contre la rareté des mitoses observées dans les différentes primocultures réalisées traduit l'absence de facteurs spécifiques que les connaissances actuelles en physiologie des mollusques ne permettent pas de déterminer.

Néanmoins, il est indispensable de poursuivre des essais en raison de l'importance que revêt l'établissement de cultures cellulaires pour l'évolution des recherches en pathologie des mollusques marins.

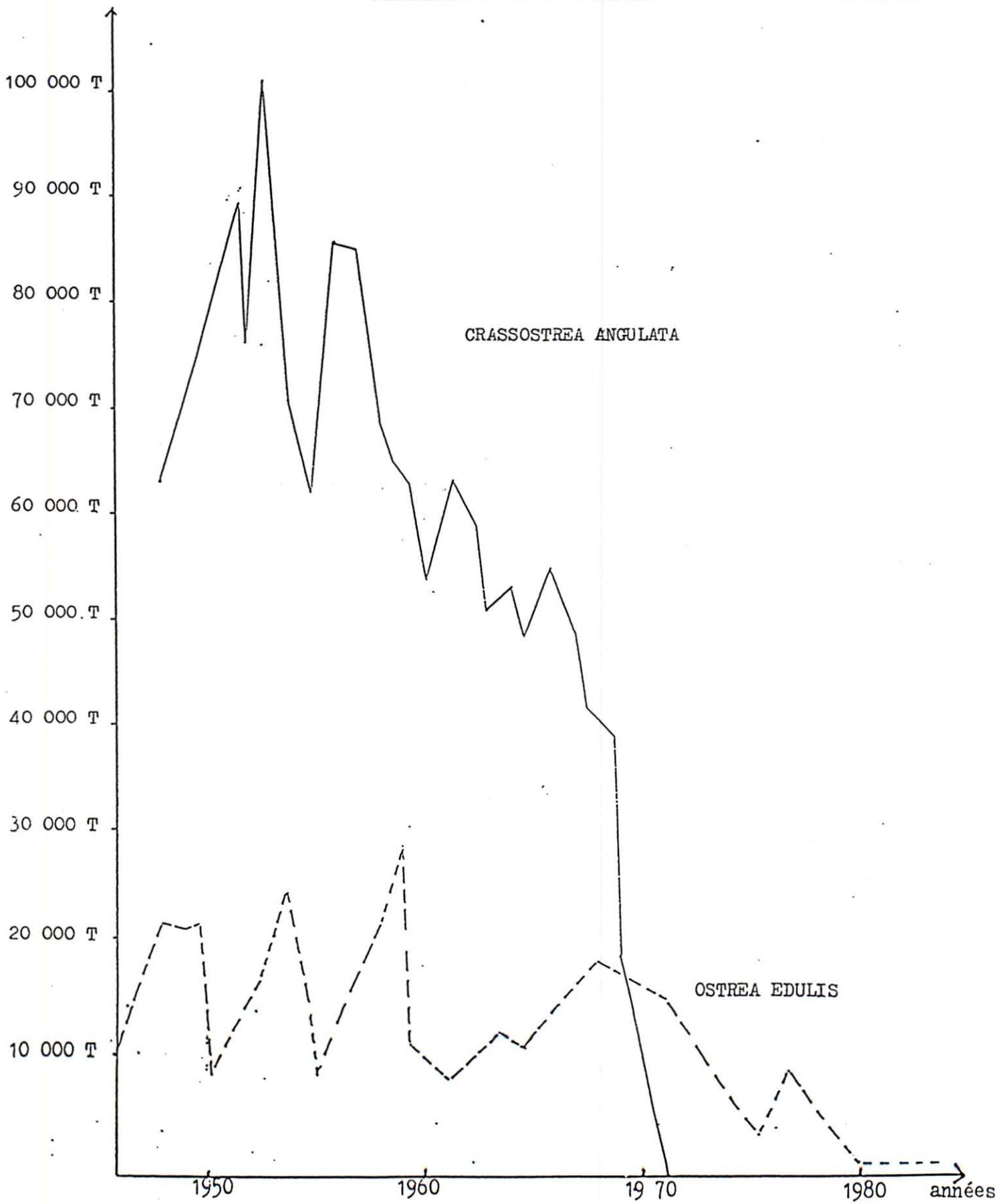
Une première voie d'investigations consiste à multiplier les primocultures avec ce même type de milieu. En effet l'obtention d'une lignée cellulaire stable résulte en général de la prolifération de quelques cellules dans une primoculture parmi un très grand nombre réalisées. Ce caractère aléatoire se retrouve en particulier pour les lignées cellulaires d'insectes cultivées dans des milieux similaires. Une telle démarche est possible notamment pour des tissus de larves de l'huître plate O. edulis produites en écloserie. Parallèlement, il sera utile de continuer de tester des milieux de cultures contenant des fractions variables de différents additifs tels que hémolymphe homologue ou extraits de ganglions cérébroïdes susceptibles de fournir en particulier des facteurs mitotiques spécifiques.

Par ailleurs, la mise en évidence de tumeurs spontanées chez des mollusques bivalves (Kinne, 1983), imputées dans certains cas à des polluants, nous a conduit à développer un deuxième axe de recherche sur l'induction expérimentale de tumeurs qui constitueraient alors un matériel favorable à l'établissement de primocultures à partir de cellules cancéreuses. Sur la base des données établies en cancérologie expérimentale, des essais d'induction de tumeurs seront réalisés in vivo et in vitro sur des primocultures par cancérogenèse chimique et par transformation des cellules avec de l'ADN de virus oncogènes.

PRODUCTION ANNUELLE COMMERCIALISEE PAR LES

ETABLISSEMENTS OSTREICOLES

Fig : 1



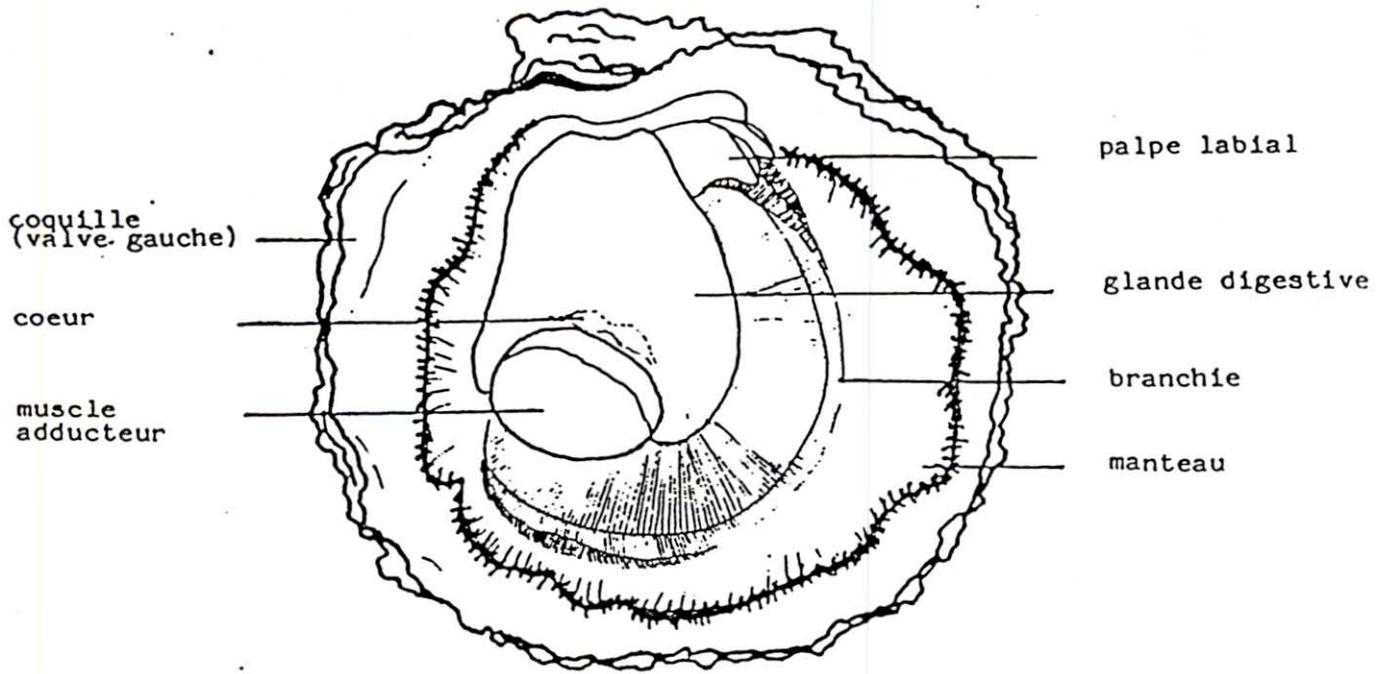


Fig. 2 Anatomie d'Ostrea edulis

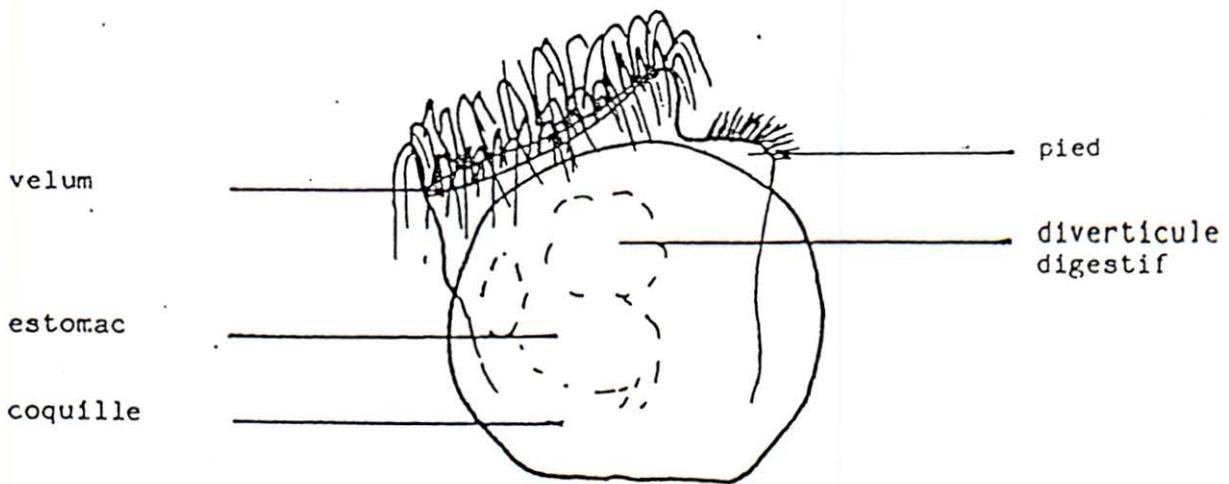


Fig.3 Larve véligère d'Ostrea edulis X 250

Milieu de culture : Pression osmotique 1000 Mos

pH 7,2

Composants	concentration / l
milieu RPMI 1640	7,5 g
milieu 199 avec sels de Earle	7,5 g
taurine	2,5 mg
glucose	5 g
galactose	1 g
tréhalose	1 g
Na H·CO ₃	850 mg
Sea Salts	22,25 g
Ca Cl ₂	580 mg
lactalbumine	4,5 g
Yeast autolysate	440 mg
sérum de veau fétal	15 ml
pénicilline	100 mg
streptomycine	100 mg

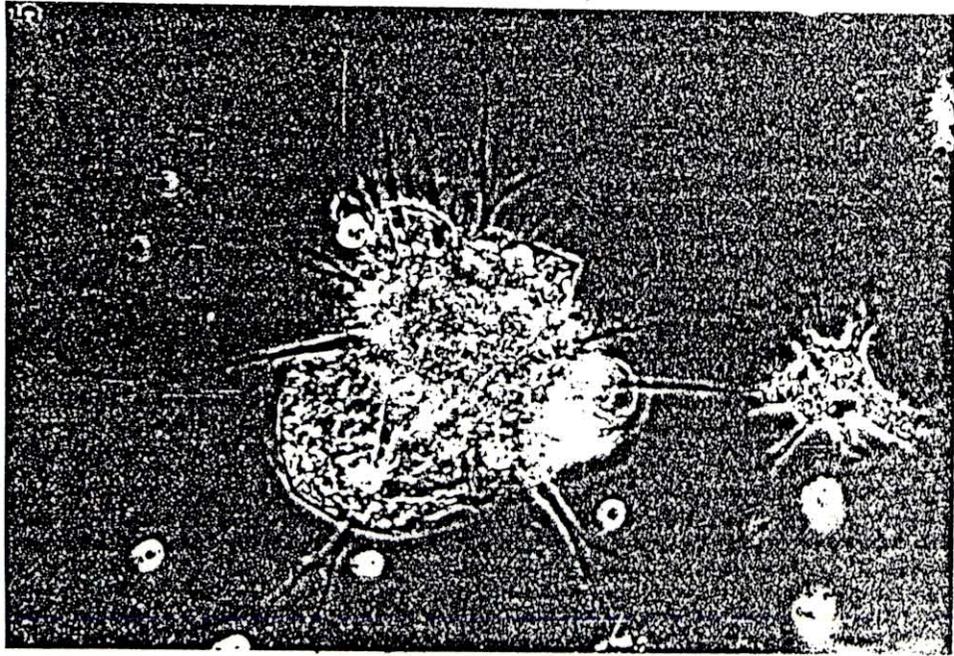
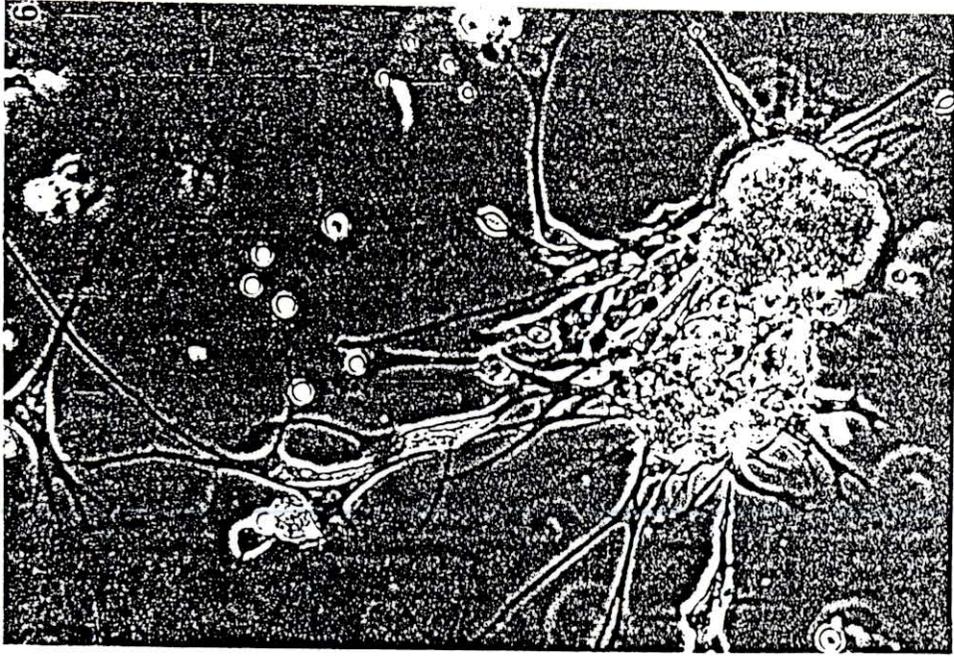
Fig. 4

Milieu 199

Sels Inorganiques	mg/L	mg/L
CaCl ₂ (anhyd.)	140,00	200,00
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0,72	0,72
KCl	400,00	400,00
KH ₂ PO ₄	60,00	
MgSO ₄ (anhyd.)		97,67
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200,00	
NaCl	8000,00	6800,00
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O		140,00
Na ₂ HPO ₄ (anhyd.)	47,70	
Autres constituants		
Sulfate d'adénine		10,000
Triphosphate d'adénosine (sel disodique)		1,000
Acide adénylique		0,200
Cholestérol		0,200
Désoxyribose		0,500
D-Glucose		1000,000
Glutathion		0,050
Guanine HCl (base libre)		0,300
Hypoxanthine (Na salt)		0,354
Rouge de phénol		20,000
Ribose		0,500
Acétate de sodium		50,000
Thymine		0,300
Tween 80*		20,000
Uracile		0,300
Xanthine (sel disodique)		0,344
Acides Aminés		
DL-Alpha-Alanine		50,000
L-Arginine HCl		70,000
DL-Acide aspartique		60,000
L-Cystéine HCl H ₂ O		0,110
L-Cystine (2HCl)		26,000
DL-Acide glutamique H ₂ O		150,000
L-Glutamine		100,000
Glycine		50,000
L-Histidine HCl H ₂ O		21,880
L-Hydroxyproline		10,000
DL-Isoleucine		40,000
DL-Leucine		120,000
L-Lysine HCl		70,000
DL-Méthionine		30,000
DL-Phénylalanine		50,000
L-Proline		40,000
DL-Sérine		50,000
DL-Thréonine		60,000
DL-Thryptophane		20,000
L-Tyrosine (sels disodique)		57,660
DL-Valine		50,000
Vitamines		
Acide ascorbique		0,050
Phosphate de alpha-Tocophérol (sel disodique)		0,010
d-Biotine		0,010
Calciférol		0,100
Pantothénate de calcium D		0,010
Chlorure de choline		0,500
Acide folique		0,010
I-Inositol		0,050
Ménadione		0,010
Niacine		0,025
Niacinamide		0,025
Acide para-aminobenzoïque		0,050
Pyridoxal HCl		0,025
Pyridoxine HCl		0,025
Riboflavine		0,010
Thiamine HCl		0,010
Vitamine A (acetate)		0,140

RPMI 1640

Sels Inorganiques	mg/L
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	100,00
KCl	400,00
MgSO ₄	48,84
NaCl	6000,00
Na ₂ HPO ₄ (anhyd)	800,00
Autres constituants	
D-Glucose	2000,00
Glutathione (réduit)	1,00
Rouge de phénol	5,00
Acides Aminés	
L-Arginine (Base libre)	200,00
L-Asparagine	50,00
L-Acide aspartique	20,00
L-Cystine (2HCl)	65,15
L-Acide glutamique	20,00
L-Glutamine	300,00
Glycine	10,00
L-Histidine (Base libre)	15,00
L-Hydroxyproline	20,00
L-Isoleucine (Sans allo)	50,00
L-Lecine (Sans méthionine)	50,00
L-Lysine HCl	40,00
L-Méthionine	15,00
L-Phénylalanine	15,00
L-Proline (Sans hydroxyproline-L)	20,00
L-Sérine	30,00
L-Threonine (Sans allo)	20,00
L-Tryptophane	5,00
L-Tyrosine (sel Na)	28,83
L-Valine	20,00
Vitamines	
Biotine	0,20
Pantothénate de Calcium D	0,25
Chlorure de choline	3,00
Acide folique	1,00
i-Inositol	35,00
Nicotinamide	1,00
Acide para-aminobenzoïque	1,00
Pyridoxine HCl	1,00
Riboflavine	0,20
Thiamine HCl	1,00
Vitamine B ₁₂	0,005



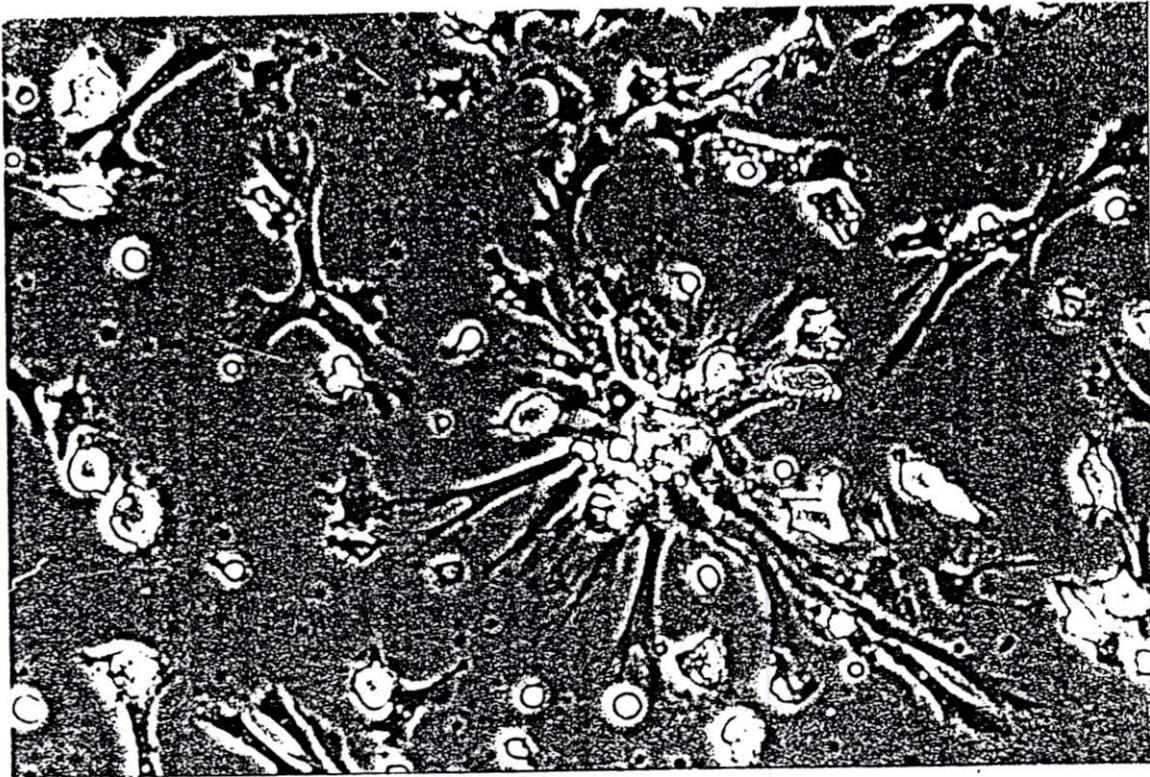


Fig.8 : Primoculture de cellules cardiaques et d'hémocytes X 400

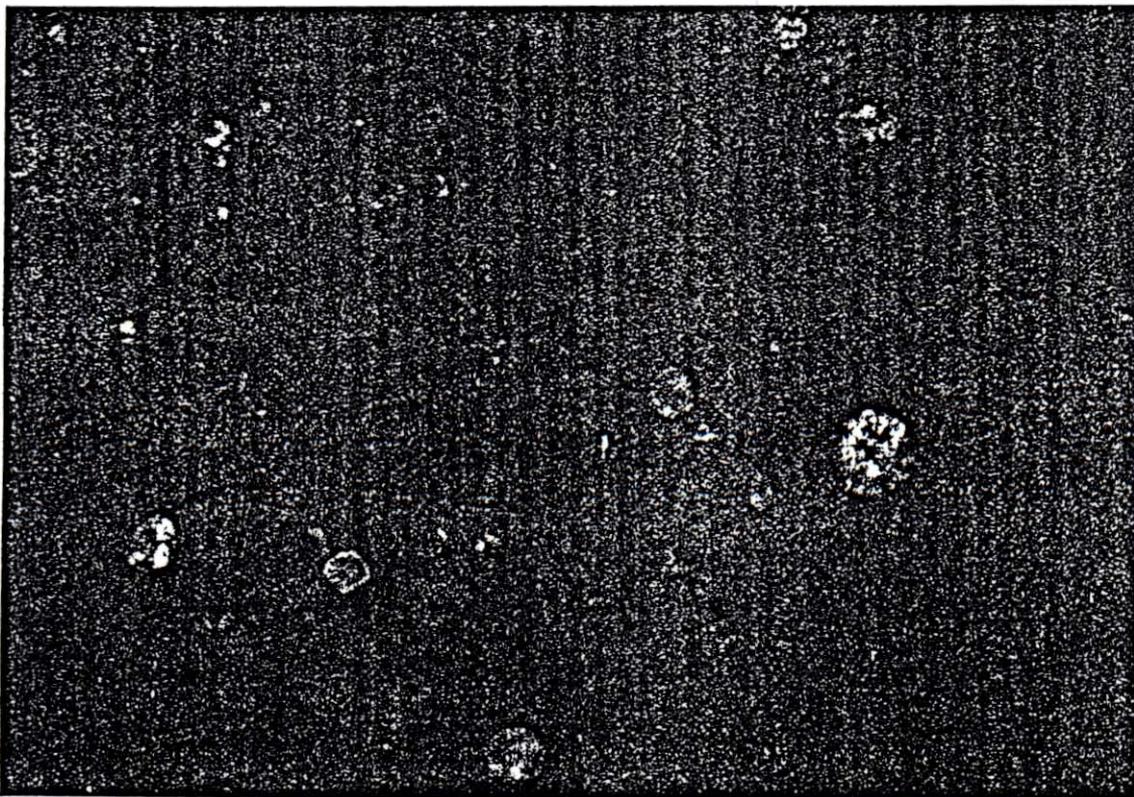


Fig.9 : Culture in vitro de Bonamia ostreae à trois semaines
(Immunofluorescence indirecte X 1 000)

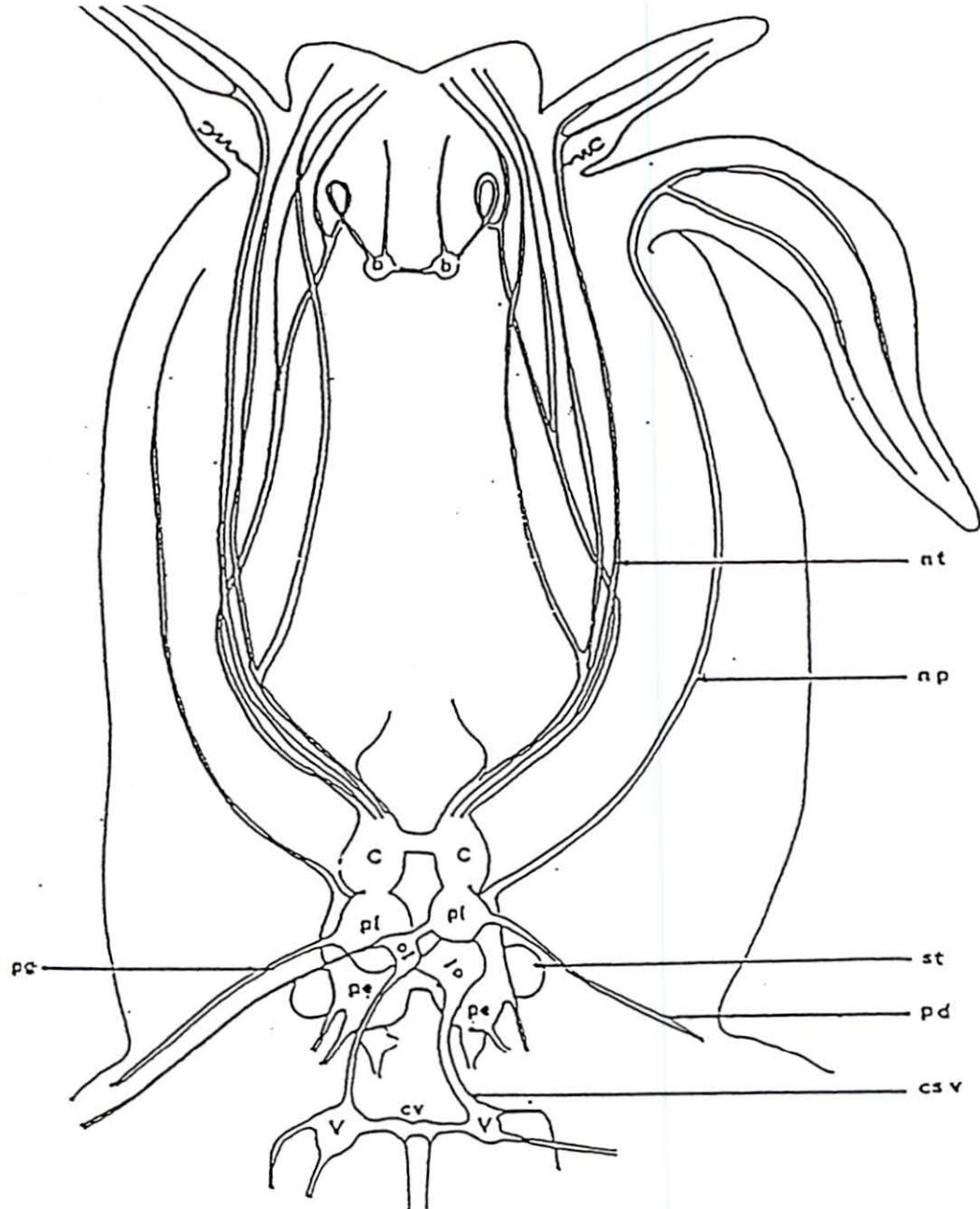


Figure:10 Schéma du système nerveux antérieur en vue dorsale,

- b : ganglions buccaux
- c : ganglions cérébroïdes
- cs v : connectif sous-oesophagien viscéral
- cv : commissure viscérale
- np : nerf pénien
- nt : nerf tentaculaire
- o : ganglion sous-oesophagien
- o/ : ganglion sus-oesophagien
- pé : ganglions pédieux
- pd : nerf palléal droit
- pg : nerf palléal gauche
- pl : ganglions pleuraux
- st : statocyste
- v : ganglions viscéraux

Figure 11 : Dissociation Enzymatique

Composants	concentration/l
Na Cl	800 mg
K Cl	20 mg
Na ₂ HPO ₄	110 mg
KH ₂ PO ₄	20 mg
EDTA	40 mg
Trypsine	200 mg

- BISHOP S.H., ELLIS L.L. et BURCHAM J.M., 1983.
Amino acid metabolism in molluscs, in "The Mollusca" ed by WILBUR K. M. and YONGE C.M., Academic Press, 1, 244-328.
- BOWER S.M., 1986. The life cycle and ultrastructure of a new species of Thraustochytrid (Protozoa : Labyrinthomorpha) pathogenic to small abalone. 2nd intern. Colloq. Pathol. marine aquac. 7.11 Sept., Porto, Portugal, 35-36.
- CHARDONNET Y., et PERES G., 1963
Essai de culture de cellules provenant de mollusque : Mytilus galloprovincialis. C.R. Soc. Biol., 157, 1593-1595.
- COMPS M., 1983.
Culture in vitro de Bonamia ostreae, parasite hemocytaire de l'huître plate Ostrea edulis. C.R. Acad. Sc. Paris, D, 296.
- COUSSERANS F., 1975.
Recherche sur la culture de cellules de mollusques marins et sur l'emploi de ces systèmes cellulaires en pathologie marine. Thèse Doct. 3^{ème} cycle, Université des Sciences et Techniques du Languedoc. 189 p.
- DEANE E.M. et O'BRIEN R.W., 1979.
Composition of the haemolymph of Tridacna maxima (Mollusca : Bivalvia). Comp. Biochem. Physiol., 66A, 339-341.
- DE ZWAAN A., 1983.
Carbohydrate catabolism in bivalves, in "The Mollusca" ed by WILBUR K.M. and YONGE C.M., Academic Press, 1, 138-169.
- DOUTKO Y.P., 1967.
Obtention d'une lignée de cellules transplantables d'un foie de Mytilus galloprovincialis L. Cytologia Genetica 1, 61-64.
- GRIZEL H. et COMPS M., 1974.
Etude d'un parasite de la glande digestive observée au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. C.R. Sci.Paris, 279, D, 783-784.
- HANSEN E.L., 1976.
A cell line from embryos of Briomphalaria glabrata (Pulmonata) : Establishment and characteristics, in "Invertebrate tissue culture : research applications". Ed by MARAMOROSCH K., Academic Press, 75-99.

- HETRICK F. M., STEPHENS E., LONAX N. et LUTRELL K., 1981.
Attempts to develop a marine molluscan cell line.
Technical report Maryland sea grant program, UM. SG.
TS. 81-06, 81 p.
- KINNE O., 1983
Neoplasia, in "Diseases of marine animals", Biologische
Amstalt helgoland, II, 863-879.
- LENGRONNE C., LE GALL P., FERAL C., et LEGALL S., 1984
Mise au point d'un test biologique in vitro permettant de
contrôler la présence du facteur mitogène chez Crepidula
fornicata L. (Mollusque mesogasteropode) C.R. Acad, Sc.
Paris, 299, III, 306-310.
- PERKINS F. O. et MENZEL R.W, 1964.
Maintenance of oyster cells in vitro, Nature, 204,
1106-1107.
- PICHOT Y., COMPS M., TIGE G., GRIZEL H. et RABOUIN M.A., 1980.
Recherches sur Bonamia ostreae gen.m., sp.m, parasite
nouveau de l'huître plate Ostreae edulis L. Rev.Trav.
Inst. Pêches marit., 43, 131-140.
- ROBERTON J.D., 1984.
Osmotic and ionic regulation, in "Physiology of mollusca"
ed by WILBUR K.M. and YONGE C.M., Academic Press. 1,
283-311.
- SINDERMANN C.J., 1976
Oyster mortalities and their control in "Advances in
aquaculture". FAO Technical conference on aquaculture,
Kyoto, Japan. Fishing News Books Ltd, 349-361.
- TRIPP M.R., 1963
Cellular response of molluscs. Ann. New York. Acad. Sci.
113, 467-474.
- TRIPP M.R., BISIGNANI L.A. et KENNY M.T., 1966.
Oyster amoebocytes in vitro. J. Invertebr. Pathol. 8,
137-140.
- VAGO C. et CHASTANG S., 1960.
Culture de tissus d'huîtres. C.R. Acad. Sci., Paris,
250, 2751.