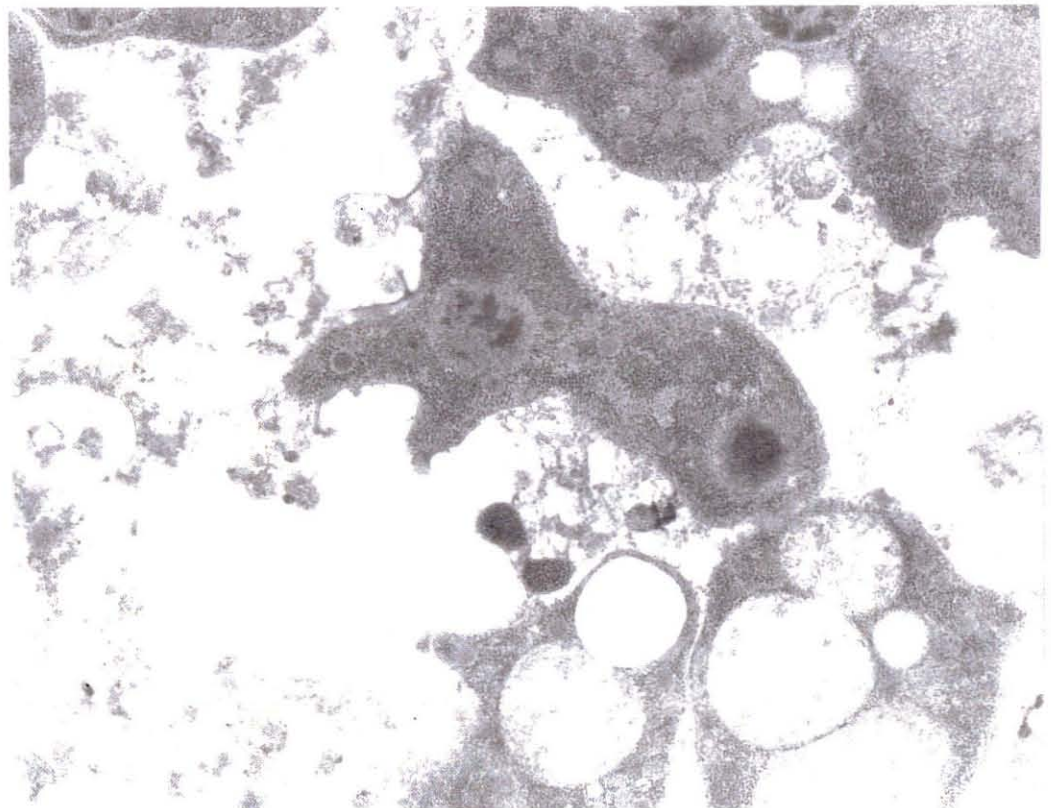


Analyse bibliographique : historique
de l'huître plate, *Ostrea edulis*, et la
Bonamiose, maladie due au
protozoaire *Bonamia ostreae*



FICHE DOCUMENTAIRE

Type de rapport : RST	
Numéro d'identification du rapport : DRV/RA/RST/2002-04 Diffusion : libre Validé par : Jean Barret Adresse électronique : - chemin UNIX : - adresse WWW :	date de publication nombre de pages : 51 bibliographie Oui illustration(s) Oui langue du rapport : Fr
Titre et sous-titre du rapport : Analyse bibliographique : historique de l'élevage de l'huître plate, <i>Ostrea edulis</i> , et la Bonamiose, maladie due au protozoaire <i>Bonamia ostreae</i> Titre traduit : Bibliography analysis : history of the European flat oyster, <i>Ostrea edulis</i> , culture, and the hemocytic disease, Bonamiosis, caused by the protozoan <i>Bonamia ostreae</i>	
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom Cochennec-Laureau Nathalie	Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER/RA/Laboratoire de Génétique et Pathologie/La Tremblade
Collaborateur(s) : nom, prénom	Organisme / Direction / Service, laboratoire
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse	
Titre du contrat :	n° de contrat Ifremer
Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)	
Responsable scientifique :	
Cadre de la recherche : Programme : Convention : Projet : Autres (préciser) : Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	

FICHE DOCUMENTAIRE

Résumé :

L'ostréiculture représente une part importante de l'aquaculture française. Cependant, les pertes liées aux maladies dans ce domaine d'activité sont aujourd'hui considérées comme l'un des principaux facteurs limitants de son développement au niveau mondial. Deux exemples récents suffisent à illustrer ce problème pour l'élevage de l'huître plate française. Il s'agit de la Marteiliose, due au parasite, *Marteilia refringens*, et de la Bonamiose due à *Bonamia ostreae*. Ce rapport présente une analyse bibliographique des principaux résultats obtenus concernant l'étude de la Bonamiose.

Abstract :

Oyster productions represent an important part of the french aquaculture. However, diseases are considered as the first limiting factors for the development of this activity around the world. Two exemples point out this problem for the french flat oyster production : Marteiliosis, the disease of the digestive gland, caused by *Marteilia refringens*, and Bonamiosis, the hemocytic disease, caused by *Bonamia ostreae*. This report proposes a bibliography analysis of major results obtained for Bonamiosis studies.

Mots-clés : Huître plate, *Ostrea edulis*, *Bonamia ostreae*, bonamiose, pathologie

Keywords : European flat oyster, *Ostrea edulis*, *Bonamia ostreae*, bonamiosis, pathology

Commentaire :

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE	2
II. QUELQUES DONNÉES BIOGÉOGRAPHIQUES SUR LE GENRE <i>OSTREA</i>	3
III. L'ÉLEVAGE DE L'HUÎTRE PLATE, <i>OSTREA EDULIS</i> (LINNÉ, 1758).....	4
IV. LA BONAMIOSE : MALADIE DUE AU PARASITE <i>BONAMIA OSTREAE</i>	7
IV - 1. MORPHOLOGIE ET ULTRASTRUCTURE	7
IV - 2. TAXONOMIE	8
IV - 3. ÉVOLUTION SPATIO-TEMPORELLE DE LA BONAMIOSE	11
IV - 4. CYCLE DE DÉVELOPPEMENT ET TRANSMISSION	12
IV - 5. DÉTERMINATION DE LA PÉRIODE D'INFECTION.....	14
IV - 6. INFLUENCE DE FACTEURS BIOTIQUES SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA MALADIE	15
IV - 6.1. <i>L'âge des huîtres</i>	15
IV - 6.2. <i>La période de maturation</i>	15
IV - 6.3. <i>L'état physiologique des huîtres</i>	16
IV - 7. INFLUENCE DE FACTEURS ABIOTIQUES SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA MALADIE	16
IV - 7.1. <i>La température</i>	16
IV - 7.2. <i>Les pratiques culturales et zootechniques</i>	16
IV - 8. ESPÈCES SENSIBLES.....	17
IV - 9. DIAGNOSTIC	18
IV - 10. LES SOLUTIONS POUR LIMITER CETTE MALADIE	19
IV - 10.1. <i>La prophylaxie médicale</i>	19
IV - 10.2. <i>Le contrôle zoosanitaire</i>	19
IV - 10.3. <i>L'amélioration zootechnique</i>	20
IV - 10.4. <i>L'amélioration génétique</i>	20
V. LA BONAMIOSE : UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL D'ÉTUDE DES INTERACTIONS HÔTE/PATHOGÈNE	22
V - 1. LES HÉMOCYTES, SUPPORTS DE L'IMMUNITÉ CELLULAIRE DES MOLLUSQUES	22
V - 1.1. <i>L'origine des hémocytes</i>	24
V - 1.2. <i>Le nombre d'hémocytes</i>	24
V - 1.3. <i>Les fonctions des hémocytes</i>	25
V - 2. LES MÉCANISMES DE DÉFENSE CELLULAIRE	25
V - 2.1. <i>La phagocytose</i>	25
V - 2.2. <i>Les types cellulaires impliqués</i>	26
V - 2.3. <i>Les facteurs de reconnaissance et d'opsonisation</i>	27
V - 2.4. <i>L'internalisation</i>	28
V - 2.5. <i>Les phénomènes post-phagocytaires</i>	29
V - 3. LE SYSTÈME DE DÉFENSE HUMORALE	30
V - 4. REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DE LA BONAMIOSE	30
V - 5. INTERACTIONS HÉMOCYTES/ <i>BONAMIA OSTREAE</i>	30
VI. CONCLUSION.....	33
VII. BIBLIOGRAPHIE.....	ERREUR! SIGNET NON DÉFINI.

I. Introduction générale

L'ostréiculture représente une part importante de l'aquaculture française avec une production d'environ 145 000 tonnes, par an, ce qui place la France en quatrième position mondiale, derrière la Chine, le Japon et la Corée du Sud (FAO, 2000). Cependant, le développement de cette activité peut être limité par des mortalités d'origine infectieuse (parasites, bactéries et virus). En France, une maladie virale (virus apparenté aux *Iridoviridae*) a totalement décimé les populations d'huître creuse portugaise, *Crassostrea angulata*, entre 1966 et 1971 (Comps 1970a, Comps et Duthoit, 1976). L'absence de sensibilité à ce virus de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* a permis son élevage et la relance de l'économie ostréicole. Ultérieurement, l'huître plate, *Ostrea edulis*, a elle aussi subi l'impact de deux maladies : la Marteiliose et la Bonamiose qui ont engendré une chute importante de sa production.

En raison de l'impact économique considérable qu'elle a eu sur la production d'huîtres plates françaises et européenne, la Bonamiose a été retenue dans la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'Office International des Epizooties (OIE). Cette liste fait partie des Directives Européennes qui établissent depuis 1991 les mesures communautaires minimales de contrôle de la Bonamiose et de la Marteiliose.

Ce rapport propose, après quelques données biogéographiques sur le genre *Ostrea* et un rappel historique sur l'élevage de l'huître plate, un récapitulatif des principaux résultats obtenus concernant l'étude de la Bonamiose : épidémiologie descriptive, analytique, et étude des interactions entre l'hôte et le parasite, au niveau cellulaire, au niveau de l'huître, et de différentes populations d'huîtres.

II. Quelques données biogéographiques sur le genre *Ostrea*



Quarante trois espèces du genre *Ostrea* ont été décrites jusqu'à présent (Breisch et Kennedy, 1980). Le genre *Ostrea* possède une répartition très large dans les eaux chaudes et tempérées de tous les océans (Jaziri, 1985, Jaziri *et al.*, 1987, Matthiessen, 2001). Parmi les principales espèces, il faut noter :

- *Ostrea angasi* que l'on trouve en Australie, en Nouvelle Zélande, en Mer Rouge, à l'Ile Maurice, à Singapour.
- *Ostrea puelchana* répartie sur la côte atlantique sud-américaine, depuis le Brésil jusqu'en Argentine où elle est exploitée.
- *Ostrea denselamellosa* trouvée en Chine, Corée et Japon, dont l'exploitation commerciale est en déclin.
- *Ostrea lurida* (= *Ostrea conchaphila*) sur la côte pacifique américaine depuis l'Alaska jusqu'au Mexique.
- *Ostrea chilensis* présente au Chili et *Ostrea lutaria* sur les côtes de Nouvelle Zélande ont été récemment classées dans la nouvelle espèce *Tiostrea chilensis* (Chanley et Dinamani, 1980, Jeffs et Creese, 1996).
- *Ostrea edulis* répartie depuis la Norvège (65^{ème} degré de latitude Nord) jusqu'à la Baie d'Agadir au Maroc, en passant par le pourtour méditerranéen, Italie, Sicile, Tunisie et jusqu'en Adriatique et en Mer Noire. Cette espèce a été également introduite aux Etats-Unis, au Canada et au Japon pour des raisons commerciales. C'est l'huître indigène des côtes françaises.

III. L'élevage de l'huître plate, *Ostrea edulis* (Linné, 1758)

En France, les gisements naturels d'huîtres plates ont été exploités pendant des siècles par simple ramassage à marée basse ou par pêche à partir de bateaux dans des eaux plus profondes (figure 1). Les années 1850 se présentent comme l'époque charnière de la profession, avec un remodelage et une multiplication des exploitations du Domaine Public Maritime. Les premières cultures d'huîtres se développent dans des réservoirs de marais salants puis dans des bassins spécialement aménagés. Toutefois, les «huîtres» se voient confrontés à un problème vital : comment s'approvisionner en petites huîtres pour garnir les parcs et les marais ? Jusque là, les gisements naturels jugés inépuisables avaient été l'unique et facile mode de production. Pourtant, sous la double action du climat (gelées) et de la surpêche, ces ressources montraient quelques signes d'épuisement.



Figure 1 : Retour de la pêche aux huîtres sur les gisements naturels

Les scientifiques de la fin du XIX^{ème} siècle s'intéressèrent surtout à la reconstitution des gisements et au captage artificiel. Un biologiste, Quatrefages, proposa de repeupler les bancs au moyen d'œufs fécondés artificiellement et déposés sur le fond aux emplacements autrefois les plus riches. En 1853, De Bon, chef de service de la Marine à St-Servan, persuadé que l'huître pouvait se reproduire à un endroit où il n'y en avait jamais eu, entama une série d'essais pour tenter de fixer le «frai». Mais il revient au biologiste Coste, le mérite d'avoir accéléré et synthétisé l'ensemble des recherches. Les conclusions de Coste et de De Bon allant dans le même sens, tous deux tentèrent l'expérimentation des premiers collecteurs français : l'ostréiculture «moderne» était née (Ser, 1987).

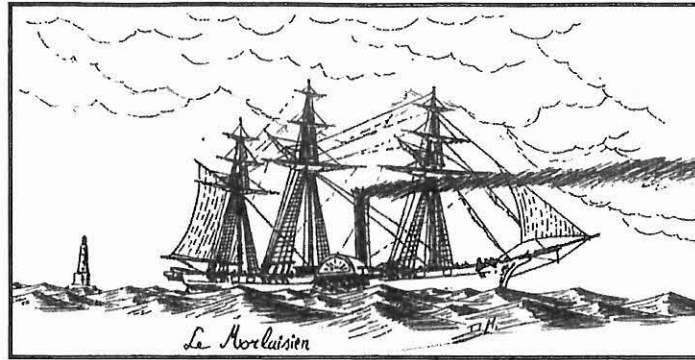


Figure 2 : le Morlaisien (D. Masson)

Dès 1860, des huîtres creuses, *Crassostrea angulata*, étaient importées depuis le Portugal vers le bassin d'Arcachon. Au cours d'un de ces transports, le bateau «Le Morlaisien» fût obligé, en pleine tempête, de se réfugier dans l'estuaire de la Gironde, et de rester à l'abris plusieurs jours (figure 2). Il fût contraint de jeter sa cargaison d'huîtres par dessus bord. Suite à cet incident de navigation (aux conséquences bénéfiques !) l'apparition massive de l'huître portugaise ne fut pas soutenue par tous. «*Ostrea edulis*» conservait d'ardents défenseurs et d'aucuns craignaient que les larves des portugaises ne recouvrent les collecteurs chargés de petites plates, étouffant ces dernières et les privant de nourriture en raison d'un pouvoir de filtration cinq fois supérieur. Malgré ces résistances (les naturalistes eux-mêmes hésitaient à considérer la portugaise comme une huître, la nommant gryphée – du nom scientifique qu'elle portait alors «*Gryphaea angulata*»), la portugaise s'implanta largement sur nos côtes. La production des deux espèces fût équilibrée jusque vers 1920 ou un épisode de mortalité inexplicable diminua considérablement la production de l'huître plate. Dans les années 67-70 ce fut au tour de l'huître portugaise d'être décimée par «la maladie des branchies» expliquée depuis par la présence d'un iridovirus (Comps et Duthoit, 1976). Le cheptel d'huîtres portugaises touché par de sévères pertes fut remplacé progressivement par l'introduction de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* (Grizel et Heral, 1991). Des huîtres hybrides *Gigas-Angulata* sont encore décrites aujourd'hui sur les côtes françaises (Huvet, 2000).

La production de l'huître plate alors limitée aux côtes bretonnes, connue dans les mêmes années 60-70 l'explosion de deux maladies, la marteillose, en 1968, due au parasite *Marteilia refringens* (Comps 1970b, Herrbach 1971, Grizel *et al.* 1974) et la bonamiose, en 1979, maladie due au protozoaire *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980, Comps *et al.*, 1980,

Comps, 1983). Ces deux maladies ont considérablement affecté la production qui est passé de 20 000 tonnes dans les années 70 à 2 300 tonnes en 1985 (Grizel, 1985, Gouletquer et Heral, 1997), celle-ci restant stable depuis (Données FAO, 2001) (figure 3).

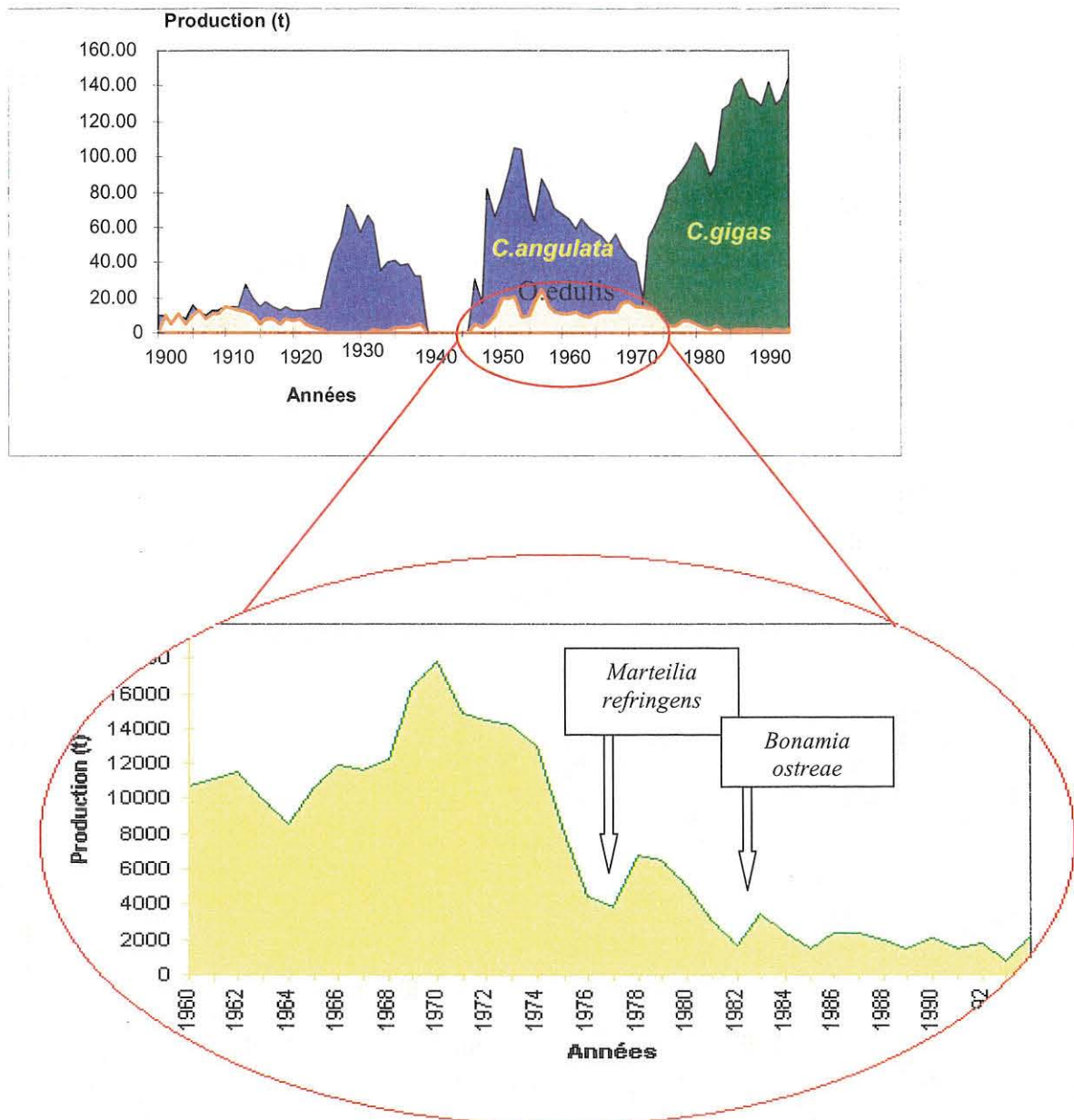


Figure 3 : Production des huîtres en France de 1900 à nos jours (d'après Gouletquer et Heral 1997)

IV. La Bonamiose : maladie due au parasite *Bonamia ostreae*

IV - 1. Morphologie et ultrastructure

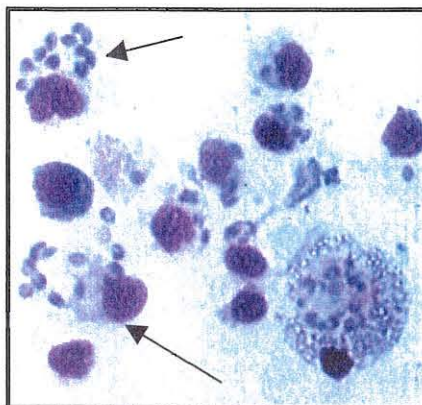
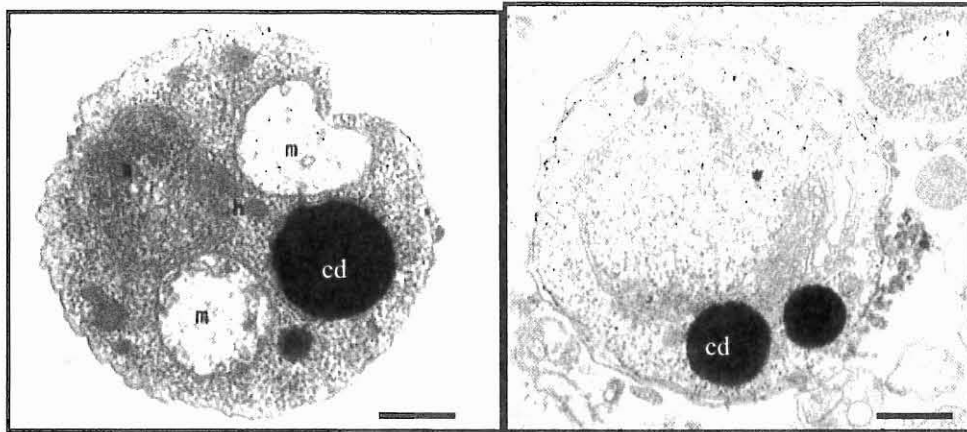


Figure 4 : Cliché d'une apposition de tissus cardiaques colorée à l'Hémacolor (x1000). Présence de nombreux parasites à l'intérieur des hémocytes (flèches)

Au début de l'été 1979, des mortalités inhabituelles, massives, ont été observées sur certains parcs d'élevage de l'huître plate de l'île Tudy en Bretagne. Un parasite encore inconnu sur les côtes françaises a été mis en évidence dans les hémocytes (ou cellules de l'hémolymphe) des huîtres atteintes (Pichot *et al.*, 1980, Comps *et al.*, 1980). Au niveau macroscopique, l'infection peut s'accompagner d'ulcérations branchiales. D'un point de vue anatomo-pathologique, l'infection se caractérise par l'accumulation d'hémocytes dans les lacunes de tous les tissus conjonctifs (Comps, 1983). Le parasite se présente comme de petites cellules de 2 à 3 μm de diamètre (figure 4). La présence de ces cellules est souvent associée à une dégradation du tissu conjonctif et à des ulcérations au niveau des branchies accompagnées d'importantes réactions inflammatoires. Différentes affinités tinctoriales permettent de mettre en évidence deux formes du parasite.

Ces deux formes parasitaires ont été mieux décrites en microscopie électronique : des formes denses et des formes claires (figures 5 et 6). Les formes denses sont les plus répandues. Ces cellules renferment un cytoplasme riche en grains denses qui correspondent à des ribosomes (Comps, 1983). Le noyau limité par deux membranes unitaires est constitué de matériel granuleux opaque aux électrons. Ces cellules renferment par ailleurs plusieurs mitochondries dont le diamètre varie entre 0.5 et 1.8 μm . A l'intérieur les replis

membranaires, peu nombreux, sont en forme de crêtes. Enfin, et suivant le plan de coupe, un corps dense sans structure apparente de 0.5 µm de diamètre est observé.



Figures 5 et 6 : clichés de microscopie électronique montrant une forme dense (5) et une forme claire (6) de *Bonamia ostreae*. m : mitochondrie, n : noyau, h : haplosporosomes, cd : corps dense (— = 300 nm).

Les formes claires, par rapport aux formes denses, présentent certaines différences structurales. Le noyau, tout d'abord, peut comporter un volumineux nucléole localisé en périphérie. Les mitochondries sont caractérisées par la présence de crêtes membranaires plus nettes et surtout plus nombreuses. Un troisième type d'organelle est représenté par des formes membranaires refermées en saccule. Les formes denses, plus répandues dans les tissus très parasités, et les formes claires, décrites dans les tissus d'huîtres peu parasitées, ont été interprétées respectivement comme les formes de résistance et les formes végétatives du parasite (Pichot *et al.*, 1980).

IV - 2. Taxonomie

Du point de vue de l'organisation ultrastructurale simple, ce parasite a été apparenté aux protozoaires mais il se distingue par la présence de quelques éléments structuraux : les particules denses structurées ou PDS présents dans les formes denses et les formes claires du parasite (figure 7). Ces PDS ont été rapprochés des haplosporosomes décrits chez certaines Haplosporidies (Perkins, 1979). Le rôle de ces particules denses structurées n'a pas été

clairement déterminé. La présence d'ADN à l'intérieur des PDS a toutefois été suspectée (Comps, 1983).

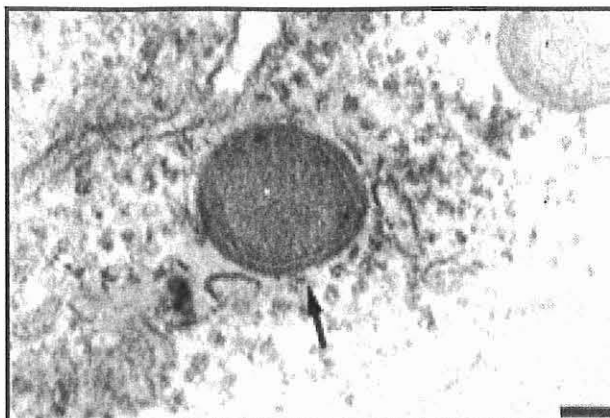


Figure 7 : Agrandissement d'une particule dense structurée (ou haplosporosome)
(barre = 100nm)

Devant l'impossibilité de rattacher ce parasite à un groupe déjà connu, un nouveau genre et une nouvelle espèce ont été créés : *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n. (Pichot *et al.*, 1980).

Comps *et al.* (1980) et Levine *et al.* (1980) établissent des similitudes entre ce parasite et les parasites du groupe «microcell» décrits par Katkansky (1969) et Farley *et al.* (1988). Ces parasites, *Mykrocytos mackini* et *Mikrocytos roughleyi*, ont été décrits en association respectivement, avec la maladie de « Denman Island » sur l'île de Vancouver en Colombie britannique (Canada) sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas* et avec la « Winter mortality » qui affecte la Sydney Rock oyster, *Saccostrea commercialis (glomerata)*, en Australie (Farley *et al.*, 1988). Les parasites « microcell » sont caractérisés par leur petite taille et leur localisation intracellulaire. Plusieurs particularités ont justifié de leur appartenance à un genre différent : la description de lésions histologiques focalisées au site de description du parasite, leur spécificité pour les huîtres de genre crassostréidés et l'absence de mitochondries chez *M. mackini* (Farley *et al.* 1988, Hine *et al.*, 2001).

Une deuxième espèce de *Bonamia* a été décrite chez des huîtres plates, *Ostrea chilensis* (= *Tiostrea chilensis*) en Nouvelle Zélande et a été associée à de fortes mortalités depuis la fin de 1985 (Dinamani *et al.*, 1987, Hine, 1991, Hine et Jones, 1994 ; Doonan *et al.*, 1994, Hine, 1996). L'histoire de la bonamiose en Nouvelle Zélande reste imprécise. Hine et Jones (1994) ont diagnostiqué *Bonamia* sp. chez des huîtres infectées fixées en 1964, sans

description de lésions histologiques associées. En 1991, des mortalités sur l'huître australienne *Ostrea angasi* (Tasmanie) ont été clairement associées à la description d'un parasite du genre *Bonamia*. La description récente d'un parasite de type *Bonamia* sp. au Chili (Kern, 1993, Campalan *et al.*, 2000) sur des huîtres chiliennes, *O. chilensis*, suggère que *Bonamia* serait un parasite ancien enzootique de l'hémisphère sud (Hine, 1991). La distinction de cette espèce a été basée sur des différences ultrastructurales et antigéniques (Dinamani *et al.* 1987, Mialhe *et al.* 1988b, Hine 1991). L'analyse du gène d'intérêt phylogénétique 18S a permis de créer une nouvelle espèce pour le parasite *B. sp.* de Nouvelle Zélande, *Bonamia exitiosus* (Hine *et al.*, 2001).

Pichot *et al.* (1980) ont placé *B. ostreae* dans le phylum des *Ascetospora*. Ce phylum regroupait plusieurs genres, tous inclus dans la classe des *Stellatosporea* : *Marteilia*, *Haplosporidium* et *Minchinia*. Levine *et al.* (1980) fait des rapprochements entre *Bonamia* et les haplosporidies sur la seule présence des haplosporosomes. Cette classification a été remise en cause par Perkins (1990) et Corliss (1994). Ce dernier a proposé la description d'un nouveau phylum, *Haplosporidia*, sur base de la présence d'haplosporosomes et de spores. Les genres *Haplosporidium* et *Minchinia* sont alors placés dans la classe des *Haplosporea*, le genre *Marteilia* dans la classe des *Paramyxea*. Perkins (1990) place le genre *Bonamia* dans la classe des *Haplosporidia* malgré l'absence de processus de sporulation. Le phylum *Haplosporidia* regroupe aujourd'hui trois genres, *Haplosporidium*, *Minchinia* et *Urosporidium* qui se définissent par l'ornementation de leurs spores (figure 8) : *Haplosporidium* possède des spores dont l'orifice est couverte par un opercule, *Minchinia* possède en plus des extensions visibles au microscope optique, *Urosporidium* possède des spores dont l'orifice est recouverte d'une « langue » de la paroi extérieure de la spore (Perkins, 1996). La classification basée sur les données ultrastructurales a été complétée par l'étude moléculaire des gènes 18S de *B. ostreae* et *B. exitiosus*. La connaissance de ces gènes permet de confirmer l'appartenance des deux parasites au phylum des *Haplosporidia* (Cochennec *et al.*, 2000, Carnegie *et al.*, 2000, Hine *et al.*, 2001).

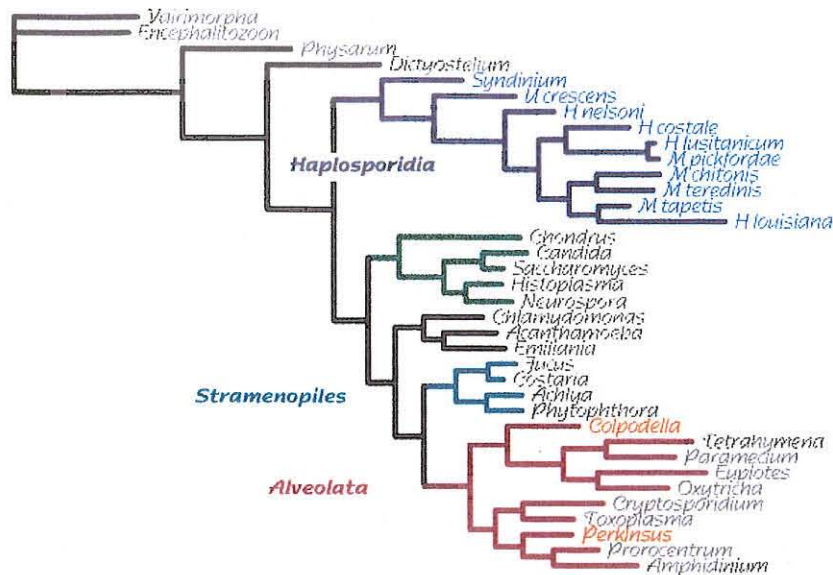


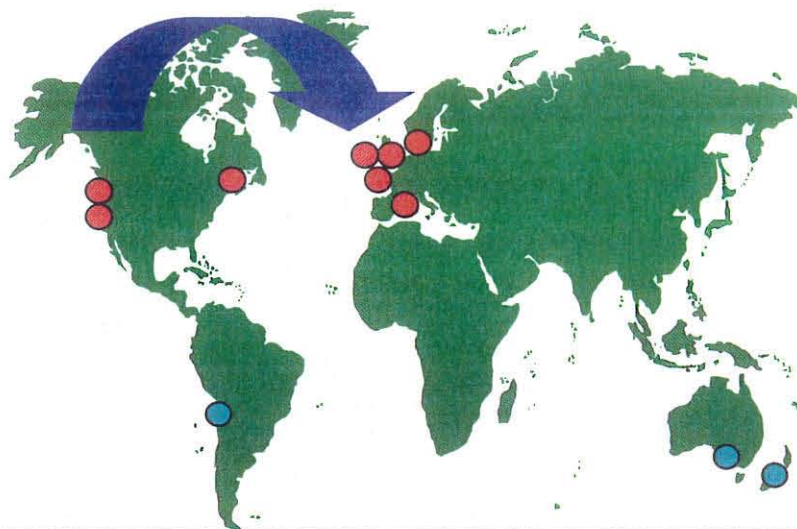
Figure 8 : Position taxonomique des *haplosporidia* (Flores *et al.*, 1996).

IV - 3. Evolution spatio-temporelle de la bonamiose

Depuis sa description en 1979 à l'île Tudy en Bretagne, cette parasitose s'est rapidement étendue à tous les centres ostréicoles français comme l'a montrée la situation épidémiologique établie par Tigé *et al.* (1982) et Grizel (1985), et ce vraisemblablement à la suite de transferts d'huîtres infectées. La prévalence varie d'un site à un autre de 10 à 70%. Les mortalités associées peuvent atteindre 80 à 90%.

La maladie touche presque tous les pays producteurs européens et récemment elle a été décrite dans l'état du Maine (Barber et Davis, 1994, Friedman et Perkins, 1994) (figure 9). Pour la plupart des pays, l'origine de la contamination a été un transfert d'animaux infectés. Différentes études ont également suggéré que les eaux de ballast où des huîtres collées sur les bateaux pouvaient être à l'origine de la propagation des contaminations (Minchin *et al.*, 1993, Minchin et Sheehan, 1998, Hayes, 1998, Ruiz *et al.*, 2000).

Dès 1963, des mortalités importantes affectant des huîtres plates en Californie (USA) avaient été décrites associées à la présence de petits parasites «microcell» (Katkansky, 1969). Ce parasite a été assimilé à *Bonamia ostreae*, en 1985, sur la base d'une description en microscopie électronique (Elston *et al.*, 1986). L'importation d'huîtres infectées de Californie serait à l'origine de la bonamiose en France (Balouet, 1983, Grizel, 1985, Elston *et al.*, 1986, Cigarria et Elston, 1997) mais également en Espagne (Figueras, 1991, Montes *et al.*, 1988), dans le Maine (Friedman et Perkins, 1994) et dans l'état de Washington (Elston *et al.*, 1986).



Pays	Année de description
France	1979 (Pichot <i>et al.</i> , 1980)
Hollande	1980 (Van Banning, 1989)
Grande Bretagne	1982 (Bannister et Key, 1982, Hudson et Bill, 1989)
Danemark	1982 (Bannister et Key, 1982)
Espagne	1984 (Polanco <i>et al.</i> , 1984)
Irlande	1987 (McArdle <i>et al.</i> , 1989)
Italie	1991
Maine	1991 (Barber et Davis, 1994)
Washington	1986 (Elston <i>et al.</i> , 1986)
Californie	1963 (Katansky, 1969)
Nouvelle Zélande (<i>B. sp.</i>)	1985 (Dinamani <i>et al.</i> , 1987b)
Australie (<i>B. sp.</i>)	1991 (Hine, 1991)
Chili (<i>B.sp.</i>)	1992 (Kern, 1993)

Figure 9 : Evolution spatio-temporelle de la Bonamiose

IV - 4. Cycle de développement et transmission

L'étude de *B. ostreae*, en microscopie électronique, a permis d'observer à l'intérieur de la cellule hôte, l'hémocyte, différents stades de division cellulaire correspondant à un mode de multiplication de type schizogonique par divisions binaires simples du parasite. Au cours de la mitose, la présence de microtubules dans la partie médiane du noyau a été rapprochée de celle décrite par Perkins (1975a) dans les noyaux en cours de mitose chez *Minchinia nelsoni*. Des formes plasmodiales binucléées, peu fréquentes, ont été également décrites. Les noyaux sont accolés à la manière des diplocaryons décrits chez certaines microsporidies ou dans les jeunes stades de *Minchinia sp.* (Perkins, 1975b). Des formes plasmodiales contenant jusqu'à 5 noyaux ont été rapportées chez des huîtres post-mortem (Bréhelin *et al.*, 1982). L'observation, rare, de ces formes suggèrent leur fugacité. Ainsi il semble qu'il y ait deux types de multiplication à l'intérieur de l'hôte. Le premier faisant intervenir la simple division binaire

pourrait correspondre à un stade précoce de la maladie. Le second, faisant intervenir une multiplication du parasite à partir de plasmodes, correspondrait soit à un mode de multiplication fugace, soit à un mode prédominant au développement explosif du parasite en fin de maladie.

Van Banning (1990) a suggéré que le stade intrahémocytaire serait en fait le stade final de la multiplication du parasite et a proposé un cycle d'infection qui passerait par un premier stade chez les huîtres femelles dans le tissu ovarien (figure 10). L'infection des hémocytes interviendrait après qu'ils aient phagocyté des ovules infectés.

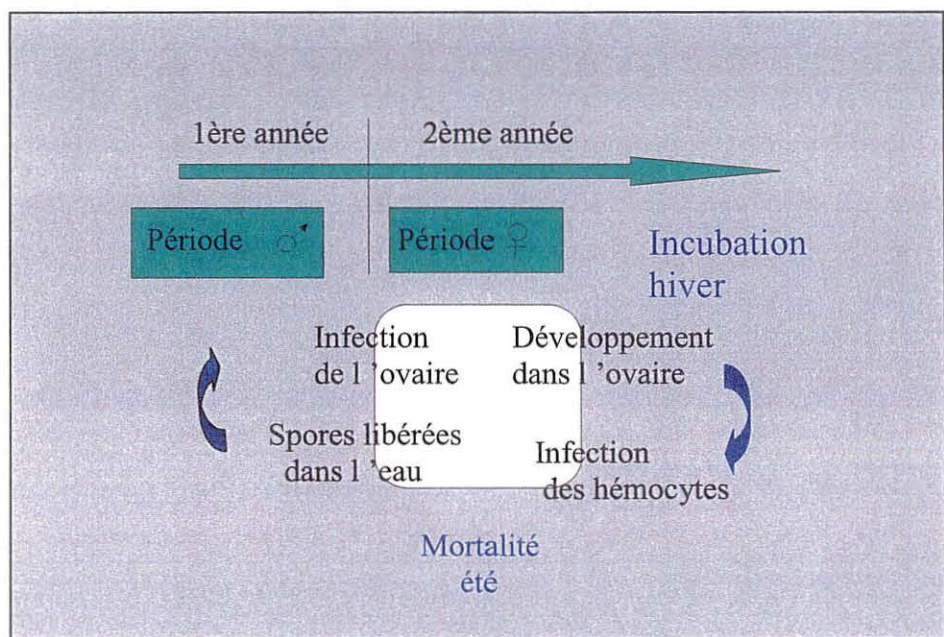


Figure 10 : Cycle de développement possible de *B. ostreae* proposé par Van Banning, 1990.

Une étude en microscopie électronique réalisée par Montes *et al.* (1994) a permis de décrire la présence de *B. ostreae* dans des cellules épithéliales de branchies. La présence du parasite à ce niveau suggérerait que le parasite est libéré dans le milieu par les cellules épithéliales. L'hypothèse que le site d'entrée du parasite puisse être aussi les branchies ne peut toutefois être exclue. En effet, les branchies sont continuellement en contact avec l'eau de mer qui peut contenir des parasites. En outre, elles ne possèdent qu'une mince couche protectrice de cellules à mucus séparant le milieu environnant du système circulatoire (hémocytes). D'autre part, les lésions histologiques, caractérisées par des réactions inflammatoires localisées, confirmeraient cette dernière hypothèse. On ne peut toutefois omettre l'élimination de parasites dans les fécès puisque des lésions au niveau de l'épithélium stomacal ont été rapportées (Comps, 1983). Enfin, il est probable qu'un grand nombre de

parasites soit libéré peu après la mort de l'huître à la suite de la dégradation des tissus par la lyse cellulaire. Malgré ces études, le cycle complet de *B. ostreae* reste aujourd'hui inconnu avec toutefois une constante : aucune spore n'a jamais été décrite. En outre, la possibilité pour le parasite de se transmettre à des huîtres saines par simple contact (cohabitation) avec des huîtres infectées a été démontrée expérimentalement, prouvant la non nécessité d'un hôte intermédiaire.

L'obtention de parasite purifiés (Mialhe *et al.*, 1988) a permis d'entreprendre la reproduction et la modélisation de la Bonamiose au laboratoire. Aujourd'hui cette reproduction expérimentale par injection de parasites purifiés est maîtrisée en laboratoire (Hervio, 1992, Cochenec, 1997). Il a été possible de définir une dose infectieuse (DI 50%) selon la méthode de Reed et Meunch (1938) : celle-ci est de 94560 parasites purifiés en injection péricardique d'huîtres âgées de 3 ans maintenues 6 mois au laboratoire (Hervio *et al.*, 1995). L'auteur remarque que cette dose est relativement élevée et que la question se pose de savoir si dans le milieu naturel des huîtres sont susceptibles d'être atteintes par de telles concentrations parasitaires, où si en dépit d'une viabilité parfaite après purification, les parasites perdent leur infectiosité. Par ailleurs, Hervio (1992) suggère que l'ensemble des manipulations associées à la reproduction expérimentale de la Bonamiose (anesthésie, injection) conduit à mettre les huîtres en état de «stimulation immunitaire» et par conséquent conduit à une plus grande capacité d'élimination des parasites injectés.

IV - 5. Détermination de la période d'infection

Des expériences réalisées pour déterminer la période d'infection (Tigé et Grizel, 1984, Grizel 1985) ont montré que, quelles que soient les dates d'immersion, entre mars 1982 et septembre 1983, les premiers stades connus de *B. ostreae* ont été détectés de 3 à 5 mois après celles-ci. Ces auteurs ont suggéré que les contaminations pouvaient être obtenues toute l'année indépendamment des variations thermiques. La température et la saison ne semblent pas prépondérantes pour la bonamiose. Toutefois la prévalence et les taux d'infection sont plus importants lorsque la maladie débute en été.

En 1991, Montes *et al.* ont étudié l'évolution de la maladie en Espagne sur 9 sites, à partir d'un lot commun d'huîtres saines. Dès le 3^{ème} mois suivant l'immersion, ils ont décrit l'apparition de *B. ostreae* sur 3 sites. Au 6^{ème} mois, tous les sites étaient infectés. En Hollande,

le même type d'expérience a été réalisé pour étudier la cinétique de l'infection dans une zone infectée (Yersekbank) à partir d'huîtres saines (Van Banning, 1990). Trois mois après immersion les huîtres ont été diagnostiquées positives à *B. ostreae* avec une prévalence comprise entre 8 et 71%. Cette différence de prévalence a été expliquée par le fait que les huîtres avaient subi des traitements de stockage différents avant immersion, et étaient plus ou moins «stressées». Ainsi la maladie semble se développer de manière similaire dans les différents pays concernés. De plus, la phase «d'éclipse» de 3 à 5 mois doit être prise en compte pour le diagnostic de la maladie. D'autre part, il semble que différents facteurs, biotiques et /ou abiotiques soient plus ou moins impliqués dans la vitesse de développement de la maladie.

IV - 6. Influence de facteurs biotiques sur le développement de la maladie

IV - 6.1. L'âge des huîtres

Les nombreux suivis épidémiologiques ont montré que la bonamiose peut être décelée chez des huîtres de tout âge, mais que le naissain (<12 mois) est toujours peu parasité (< 3%). Les études réalisées pour étudier la sensibilité des huîtres en fonction de leur âge sont assez discordantes. Certains auteurs émettent l'hypothèse que la deuxième année (13 mois-2 ans) est critique et correspond au début de l'infection (Lama et Montes, 1893, Culloty et Mulcahy, 1996). D'autre, au contraire, suggèrent que le développement de la maladie est corrélée à la taille et non à l'âge des huîtres : le parasite se développant plus rapidement chez des huîtres «poussantes» (Cacerez-Martinez *et al.*, 1995).

IV - 6.2. La période de maturation

Le suivi du développement des gonades sur un cycle complet de maturation (Avril-Septembre) n'a pas permis de mettre en évidence de corrélation entre le développement des gonades et le degré d'infection (Cochennec et Mazurié, 1992, Culloty et Mulcahy, 1996) comme pouvait le laisser suspecter l'hypothèse d'une phase de maturation dans les ovules (Van Banning, 1990). Guerra *et al.* (1993) ont observé toutefois un nombre plus important d'individus non matures et une baisse du nombre d'ovules matures au début de l'été chez des huîtres fortement infectées. Il est intéressant de noter que bien que les classes d'âge les plus touchées soient les classes d'âge de 2, 3 et 4 ans, donc des huîtres en âge de se reproduire, le captage naturel (fixation des huîtres juvéniles) est resté important en France entre 1987 et

1990 (Rapport interne de la DRV, 1991). Les huîtres malades peuvent donc, malgré l'infection, mûrir et émettre des gamètes viables.

IV – 6.3. L'état physiologique des huîtres

L'index de condition de Walne-Mann (1975) permet de mesurer le rapport de chair total sur le poids de la coquille. Cet indice a été mesuré pour déterminer les éventuelles relations entre l'état physiologique des huîtres et leur stade d'infection. Au début de la maladie, les huîtres parasitées avaient un index de condition plus faible que les huîtres non parasitées (Rogan *et al.*, 1991). Aujourd'hui, différents auteurs s'accordent pour démontrer qu'il n'y a pas de corrélation entre le stade d'infection et les index de condition chez des huîtres âgées de 2 ans dans le Maine (Zabaleta et Barber, 1996) et en Espagne (Cacerez-Martinez *et al.*, 1995). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les huîtres s'adaptent à la parasitose du fait d'une prévalence plus faible dans les sites infectés.

IV - 7. Influence de facteurs abiotiques sur le développement de la maladie

IV – 7.1. La température

La température seule ne semble pas être le facteur déterminant dans le développement de la Bonamiose. Elston (1988) a rapporté que des huîtres infectées maintenues expérimentalement à 8 et 16°C ont montré des taux de mortalité très différents, respectivement 3 et 90%. Ces résultats suggèrent qu'une température inférieure à 10°C semble permettre de limiter l'infection une fois qu'elle est déclarée.

IV – 7.2. Les pratiques culturales et zootechniques

Suite à l'apparition de *Marteilia refringens* en 1968 dans les élevages d'huîtres plates sur terrain découvrant (zones intertidales), la production s'est retrouvée limitée aux zones d'eaux profondes (zones infralittorales). Dès l'apparition de la Bonamiose des expérimentations ont été mises en place pour tenter de limiter l'impact de cette maladie. Une des premières recommandations a été de diminuer fortement les densités d'élevage pour les nouveaux semis (100 huîtres au mètre carré au lieu des 400 à 500 huîtres semées habituellement). Cette mesure a contribué à limiter l'extension de la maladie au sein d'un semis tout en supprimant la nécessité de dédoubler en cours d'élevage et donc de «stresser»

les animaux (Contrats de plan Etat-Région, 1984 et 1990). Par ailleurs, certains professionnels ont signalé de meilleurs résultats sur les élevages d'huîtres plates lorsque celles-ci sont mélangées à des huîtres creuses. Différentes proportions d'huîtres plates en mélange avec des huîtres creuses ont été testées et ont confirmé le rôle de la densité dans la dissémination de la maladie (Bodoy *et al.*, 1991, Le Bec *et al.*, 1991).

La suppression des manipulations faisait l'objet de la seconde recommandation des contrats de plan Etat-Région pour la relance de l'huître plate : les manipulations et les transferts étant susceptibles d'affaiblir les huîtres et de les rendre plus vulnérables au parasite. Le Bec *et al.* (1991) ont testé l'influence du transfert sur le degré d'infection. Deux périodes de transfert ont été retenues, mi-mars et mi-mai. Ces périodes correspondaient aux pratiques utilisées dans les entreprises ostréicoles. Après 7 mois, les analyses ont montré que les lots déplacés en fin d'hiver étaient moins infectés que les lots déplacés 2 mois plus tard (respectivement 5 et 16%). Cette différence s'annulait toutefois après 15 mois d'élevage (respectivement 26 et 20%). Un transfert précoce a donc été recommandé avec un relevage des géniteurs pour la vente dès la période de ponte terminée.

Ces recommandations ont été mises en œuvre dans le cadre de deux conventions signées entre la Région Bretagne et IFREMER (en 1984 et en 1990) pour étudier la Bonamiose dans le but d'accélérer la relance de l'élevage de l'huître plate. Elles ont permis, entre autre, de maintenir une activité ostréicole satisfaisante dans quelques sites d'eaux profondes et notamment à Quiberon, Saint-Brieuc et à Cancale (Grizel, 1985).

Ces résultats montrent qu'en général, les taux de prévalence et d'infection semblent dépendre en premier lieu de la biomasse et des conditions d'élevage, et que les facteurs biotiques (classe d'âge, taille, maturation) interviennent peu. Ils ont été largement confirmés en France et en Hollande où les années de recrutement important sont suivies par un regain de la maladie (Données IFREMER).

IV - 8. Espèces sensibles

D'après les nombreuses données épidémiologiques et expérimentales, les espèces sensibles à la Bonamiose sont les huîtres du genre *Ostrea* et une espèce du genre *Crassostrea*. Des essais d'élevage d'huîtres non indigènes, *Ostrea chilensis*, *Ostrea puelchana*, *Ostrea angasi*, *Ostrea denselamellosa*, ont été entrepris pour tenter de trouver une espèce d'*Ostrea* susceptible de se substituer à *O. edulis*. Ces quatre espèces se sont révélées peu adaptées au

milieu (survie et croissance médiocres) et/ou sensibles à la bonamiose et à la marteiliose (Grizel *et al.*, 1983, Le Borgne et Le Penec, 1983, Bougrier *et al.*, 1986, Pascual *et al.*, 1991).

Bien que *Crassostrea gigas* soit naturellement et expérimentalement réfractaire (Renault *et al.*, 1994, Culloty *et al.*, 1999), une infection à *Bonamia* spp. a été décrite sur une autre espèce de crassostréidé, *C. ariakensis*. Ces huîtres, en provenance de Grande Bretagne, étaient maintenues en salle de quarantaine au laboratoire IFREMER de la Tremblade après leur introduction en France. La contamination des animaux par l'eau introduite et distribuée dans les salles a été l'hypothèse retenue pour expliquer ce développement parasitaire (Cochennec *et al.*, 1999).

Des infections expérimentales réalisées, par injection de suspensions de parasites purifiés, sur un ensemble de coquillages d'intérêt économique ont montré que *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* ne développaient pas la maladie et n'agissaient ni comme vecteurs ni comme hôtes intermédiaires (Culloty *et al.*, 1999).

IV - 9. Diagnostic

La méthode de diagnostic de référence est l'histologie, la Bonamiose se caractérisant par la présence de petites cellules (2-5 μm) à l'intérieur des hémocytes ou libres dans le tissu conjonctif de la glande digestive ou des filaments branchiaux. La technique des coupes histologiques a été cependant simplifiée peu à peu par la technique d'appositions de tissus cardiaques (Bachère *et al.*, 1982, Zabaleta et Barber, 1996, O'Neill *et al.*, 1998). Ces deux techniques sont aujourd'hui retenues par l'Office International des Epizooties (Diagnostic manual for aquatic animal diseases, OIE, 2000). Des anticorps monoclonaux spécifiques ont été produits (Rogier *et al.*, 1991, Boulo *et al.* 1989) et deux d'entre eux (15C2 et 20B2) couplés à l'isothianate de fluorescéine pouvaient être utilisés pour la détection de *B. ostreae* sur frottis de tissus cardiaques par la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) (Boulo *et al.* 1989). Une étude épidémiologique comparant les deux méthodes, la technique histologique et la technique IFI a été réalisée sur 291 huîtres plates, *Ostrea edulis*, du Maine. Zabaleta et Barber (1996) rapportent que 5% (13/291) des individus ont été trouvés parasités par la technique histologique alors que l'utilisation de l'anticorps monoclonal 20B2 n'a pas permis d'observer de marquage confirmant la présence de *B. ostreae*. L'anticorps monoclonal 15C2 a permis de confirmer 75% des résultats obtenus par la technique histologique. Cette

étude souligne la sensibilité limitée des anticorps 20B2 et 15C2. Un immuno-diagnostic enzymatique de type ELISA disponible sous forme de kit a également été mis au point (Cochennec *et al.*, 1992) en utilisant l'anticorps 20B2 marqué à la phosphatase alcaline. La commercialisation des anticorps monoclonaux et du kit, en raison des problèmes de sensibilité et de spécificité de détection, a été arrêtée. En outre, la mise sur le marché de ce type de produit a été confrontée 1) aux coûts de production élevés du fait qu'il s'agissait de petites séries et 2) à l'absence de structures institutionnelles ou privées suffisamment dynamiques pour promouvoir ce type de diagnostic.

L'analyse moléculaire des parasites *B. ostreae* et *B. exitiosus* a permis de mettre au point différents outils de détection moléculaire (PCR, PCR-RFLP et hybridation *in situ*). La technique de PCR-RFLP basée sur l'étude du polymorphisme de restriction permet d'ailleurs leur distinction (Cochennec *et al.*, 2000, Hine *et al.*, 2001).

IV - 10. Les solutions pour limiter cette maladie

Pour préserver les cheptels et réduire à leur plus bas niveau possible les risques d'introduction et de propagation d'agents pathogènes, les moyens de lutte sont basés sur la prophylaxie zoosantaire, la prophylaxie zootechnique et l'amélioration génétique (Grizel, 1989, Grizel, 1997).

IV – 10.1. La prophylaxie médicale

L'absence de réponse immunitaire « spécifique » rend la vaccination, au sens conventionnel du terme, impossible. Les huîtres ne possèdent pas de lymphocytes T et de lymphocytes B, cellules directement impliquées chez les Vertébrés dans les réponses spécifiques vis-à-vis d'un agent pathogène pouvant être stimulées au moyen de la vaccination.

D'autre part, les traitements médicaux, ne peuvent déboucher sur des applications pratiques, soit en raison de leur inefficacité, soit en raison de leur difficulté d'application (Grizel, 1985). Ce type d'approche ne semble donc pas une voie à privilégier.

IV – 10.2. Le contrôle zoosanitaire

Outre un arsenal législatif et un contrôle institutionnel (Directives 91/67 UE et 98/70 UE), il repose sur la fiabilité des techniques de diagnostic pour limiter les transferts

d'animaux infectés et contrôler ainsi la dissémination de la maladie (Diagnostic Manual for Aquatic animal diseases, Office International des Epizooties).

IV – 10.3. L'amélioration zootechnique

Elle a permis, suite aux plans de relance successifs, d'améliorer les techniques d'élevage afin de limiter l'impact de la Bonamiose (conventions signées entre la Région Bretagne et IFREMER, 1984, 1990).

IV – 10.4. L'amélioration génétique

L'amélioration génétique consiste à sélectionner des animaux plus résistants à la maladie. Des exemples de sélection pour la résistance à de nombreuses maladies ont été rapportés :

- ✓ *Haplosporidium nelsoni* (ou MSX) chez *Crassostrea virginica*
- ✓ *Labyrinthoma marina* chez *C. virginica*
- ✓ *Juvenile Oyster Disease* (ou JOD) chez *C. virginica*
- ✓ *Mikrocytos roughleyi* chez *Saccostrea glomerata* (ou *S. commercialis*)
- ✓ *Bonamia ostreae* chez *Ostrea edulis*

L'exemple le plus ancien est celui concernant la résistance à *H. nelsoni* chez *C. virginica*. Depuis 1964, 29 populations d'huîtres ont été testées vis-à-vis de leur résistance à ce parasite (Haskin et Ford, 1978). Ces huîtres ont été produites en écloserie à partir de géniteurs ayant résisté à la maladie. L'amélioration croissante de la survie a été confirmée sur 7 générations. La première génération sélectionnée montrait une mortalité de 65% contre 90% pour les huîtres témoins. Pour la dernière génération, la mortalité n'était que de 30% pour les huîtres sélectionnées. Ces résultats suggèrent une héritabilité de la résistance. Malgré ces résultats encourageants, des huîtres considérées comme «résistantes» ont été trouvées fortement infectées (Haskin et Ford 1979) soulignant les limites d'une pression de sélection, non contrôlée, réalisée dans un milieu ouvert où la prévalence et les taux d'infection sont variables. Des différences de survie et de résistance à *H. nelsoni* ont été également rapportées chez des huîtres provenant d'origines géographiques multiples (Paynter *et al.*, 1997).

Plus récemment, un programme de sélection aux parasites *Mikrocytos roughleyi* et *Marteilia sydneyi* infectant *Saccostrea glomerata* a été initié en Australie (Nell *et al.*, 2000). Les comparaisons des taux de survie et de la croissance de la première génération ont montré quelques gains en faveur des huîtres sélectionnées. Ces premières expériences seront poursuivies sur plusieurs générations afin de confirmer ces résultats.

Une autre approche a été mise en place pour limiter le développement de la maladie en testant les performances de résistance d'huîtres triploïdes. Après deux ans d'élevage dans une zone endémique au parasite *M. roughleyi*, les huîtres diploïdes présentaient une mortalité de 35% comparativement aux 12% de mortalité des huîtres triploïdes (Hand *et al.*, 1998). La combinaison de pratiques culturales et l'utilisation d'huîtres triploïdes devraient permettre de limiter l'impact de *M. roughleyi* sur la côte ouest de l'Australie (Smith *et al.*, 2000).

La Juvenile Oyster Disease (JOD) est un phénomène relativement récent qui affectent les huîtres juvéniles *C. virginica* dans le Nord Est des Etats Unis (Barber *et al.*, 2000). Un programme de sélection, à partir d'huîtres ayant résisté aux mortalités, a été initié depuis 1994. Après 4 générations de sélection, les populations sélectionnées ont montré une augmentation de la survie supérieure à celle des huîtres non sélectionnées (comprise entre 2.5 et 35 fois) (Farley *et al.*, 1997). Bien qu'il y ait plusieurs hypothèses quant à la description de l'agent pathogène responsable de ces mortalités (Ford et Paillard, 1994, Small, 1995, Boettcher *et al.*, 1999, Boettcher *et al.*, 2000) l'utilisation de programme de sélection, à partir d'animaux survivants, devrait permettre de pouvoir limiter les mortalités (Davis *et al.*, 1997).

Des essais de sélection simultanée à deux agents pathogènes ont été également rapportés chez *C. virginica* : *H. nelsoni* et *Labyrinthoma marina* (Valiulis et Haskin, 1973) et *H. nelsoni* et *Perkinsus marinus* (Farley *et al.*, 1996).

L'IFREMER à partir de 1985 a adopté une démarche de sélection pour la résistance à *Bonamia ostreae*. Contrairement aux programmes menés pour la résistance à *H. nelsoni* ou *M. roughleyi*, l'IFREMER a très vite recouru à des surinfections expérimentales pour augmenter et contrôler les pressions de sélection (Mialhe *et al.*, 1988a, Hervio, 1992, Culloty et Mulcahy, 1992, Cochenec, 1997). Quelques années de sélection massale ont permis d'augmenter significativement la survie des huîtres par rapport à des témoins issus du milieu naturel (Martin *et al.*, 1993, Naciri, 1994, Baud *et al.*, 1997, Naciri-Graven *et al.*, 1999). Depuis 1992, une réorganisation du programme a été opérée afin d'évaluer l'héritabilité et

limiter l'importance de la consanguinité (Naciri-Graven *et al.*, 1998). Des expériences réalisées avec des huîtres issues de la troisième génération de sélection ont montré des taux de survie significativement supérieurs chez les huîtres sélectionnées comparativement aux huîtres naturelles, respectivement 52.3% et 2.5%. Les taux de survie sont, en outre, corrélés aux taux de prévalence par *B. ostreae* (Bédier *et al.*, 2001).

Le programme de sélection, tel qu'il est défini aujourd'hui, vise à sélectionner des animaux résistants à la Bonamiose mais s'attache aussi à améliorer les performances de croissance pour essayer «de prendre de vitesse» le développement de la maladie. En effet, les conséquences économiques de la maladie peuvent être surmontées de deux manières : soit en améliorant la survie au cours des deuxième et troisième années d'élevage, soit en obtenant des huîtres de taille commerciale plus rapidement.

Des essais de sélection ont été également menés chez des populations d'huîtres plates d'Irlande. Les premiers résultats montrent une amélioration de la survie et des taux d'infections de ces huîtres sélectionnées comparativement aux huîtres témoins naturelles (Culloty *et al.*, 2001).

V. La Bonamiose : un modèle expérimental d'étude des interactions hôte/pathogène

La Bonamiose représente un modèle d'étude de parasitisme intracellulaire particulier par le fait du double rôle joué par les hémocytes dans cette maladie. En effet, ils sont à la fois les cellules effectrices des mécanismes de défense non spécifiques et les cellules hôtes du parasite. Un rappel succinct sur ces supports cellulaires est proposé.

V – 1. Les hémocytes, supports de l'immunité cellulaire des mollusques

Le système de défense cellulaire des mollusques est assuré par les hémocytes, cellules véhiculées par l'hémolymphe dans un système circulatoire semi-ouvert. Les hémocytes peuvent ainsi être retrouvés dans le compartiment circulatoire (vaisseaux et grands sinus) et au niveau des tissus conjonctifs (Cheng, 1981, Sminia et Van der Knaap, 1987).

L'étude de ces cellules a suscité de nombreux travaux (Poder, 1980, Auffret, 1985, Chagot, 1989, Hinsh et Hunte, 1990, Mc Cormick-Ray et Howard, 1991, Ford *et al.*, 1994). Différents critères ont été utilisés, séparément ou en association, pour classifier les types hémyocytaires chez les mollusques bivalves : critères morphologiques, critères cytochimiques, critères fonctionnels et critères antigéniques. Cependant, une certaine confusion semble régner dans la littérature essentiellement descriptive. En effet, l'absence de critères d'identification bien établis amène une multiplicité de dénominations et de descriptions des hémyocytes. Ainsi, plusieurs descriptions d'un même type cellulaire ou inversement le regroupement de types différents à l'intérieur d'une même population sont retrouvés dans la littérature. Citons les travaux de Tanaka rapportés par Cheng en 1981 qui ne distinguait pas moins de douze types et sous types en considérant la morphologie et la taille des cellules chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Moore et Lowe (1977), pour identifier et classifier les types hémyocytaires, ont utilisé, entre autres, des critères morphologiques, la présence, la forme, la taille ou les affinités tinctoriales des granulations. D'autres critères d'identification, comme l'équipement enzymatique des hémyocytes, ont été pris en compte pour caractériser des types hémyocytaires chez la moule, *Mytilus edulis* (Pipe, 1990), chez les huîtres, *Ostrea edulis* (Auffret, 1988), *Tiostrea chilensis* (Hine et Wesney, 1994) et chez *Crassostrea gigas* (Chagot, 1989).

D'autre part, des lectines hétérologues ont également permis de mettre en évidence des sous populations hémyocytaires pour plusieurs espèces de bivalves : l'huître creuse américaine, *Crassostrea virginica* (Cheng *et al.*, 1985), la moule, *Mytilus edulis* (Renwranz *et al.*, 1985) et de gastéropode : *Biomphalaria glabrata* (Yoshino, 1983). Les lectines sont des protéines dépourvues d'activité enzymatique (Lis et Sharon, 1986) qui ont la propriété de se lier spécifiquement à des oligosaccharides et cela sans les modifier, notamment ceux des glycoconjugués des membranes cellulaires. Elles peuvent ainsi agglutiner sélectivement certaines populations de cellules. Leur application chez les Vertébrés concerne l'identification des cellules (groupes sanguins ou populations de lymphocytes). Elles sont également utilisées comme moyen d'étude fonctionnelle de la membrane cellulaire.

Cependant, bien qu'il n'y ait pas d'accord sur le nombre et la description des hémyocytes, les auteurs s'accordent pour distinguer deux grandes catégories cellulaires chez les mollusques bivalves marins (Cheng, 1981, Fisher, 1986) :

- les cellules granuleuses, caractérisées par un petit noyau et des granules cytoplasmiques,
- les cellules agranuleuses, qui se distinguent par un rapport nucléocytoplasmique élevé, et l'absence de granules cytoplasmiques.

Les types multiples observés pourraient représenter des stades de maturation ou des stades fonctionnels de ces deux classes (Sminia *et al.*, 1983).

V – 1.1. L'origine des hémocytes

Le lignage des hémocytes chez les mollusques reste inconnu, de même que les sites hématopoïétiques, dont l'existence est évoquée chez les gastéropodes *Biomphalaria glabatra* (Lie *et al.*, 1975, Jeong *et al.*, 1983) et *Lymnaea trunculata* (Rondelaut et Barthe, 1981). L'absence de multiplication des hémocytes circulants conduit à l'hypothèse de l'existence d'un ou plusieurs sites d'hématopoïèse. Cependant, il(ils) n'a(ont) pas encore été localisé(s). Mais Smolovitz *et al.*, (1989) proposent que des cellules du tissu conjonctif pourraient être à l'origine des hémocytes chez le clam, *Mya arenaria*.

V – 1.2. Le nombre d'hémocytes

Les hémocytes libres dans le système circulatoire semi-ouvert peuvent migrer aisément du compartiment cellulaire aux tissus conjonctifs et vice versa. La concentration des hémocytes circulants varie entre les différentes espèces de mollusques bivalves et entre les individus à l'intérieur d'une même espèce. Ce nombre peut augmenter avec l'âge des animaux (Dikkeboom *et al.*, 1985). D'autre part, le rythme cardiaque, la température, la salinité, le stress chimique sont autant de paramètres qui peuvent influencer le nombre de ces cellules (Abdul Salam et Michelson, 1980, Cheng, 1988, Suresh et Mohandas, 1990, Oliver et Fisher, 1995). Cependant, l'importance de chacun de ces facteurs, et en particulier le rôle de la salinité, n'ont pas été clairement définis (Neufels et Wright, 1996).

Feng (1965) a considéré que les cellules circulantes représentaient une estimation exacte de la population hémocytaire totale. De même, Oubella *et al.*, (1993) considèrent que cette densité peut représenter un paramètre quantifiable de la réponse immunitaire des mollusques bivalves vis-à-vis de stress dus à des facteurs environnementaux ou à des agents pathogènes. Ce type de paramètres a d'ailleurs été retenu pour étudier la réponse cellulaire de l'huître américaine, *Crassostrea virginica* vis-à-vis de deux parasites *Haplosporidium nelsoni*

(Ford *et al.*, 1993) et *Perkinsus marinus* (La Peyre *et al.*, 1995). Paillard *et al.* (1996) ont mis en évidence une diminution du nombre des hémocytes totaux et une modification du comptage différentiel des hémocytes chez des huîtres *C. virginica* infectées par le J.O.D. (Juvenile Oyster Disease).

V – 1.3. Les fonctions des hémocytes

Outre leur rôle dans la défense immunitaire, qui sera abordé plus loin, les hémocytes ont plusieurs fonctions. Ils interviennent dans différents processus dont la nutrition, la détoxification et la réparation des blessures (Sminia, 1981, Fisher, 1986). Leur capacité à reconnaître, localiser, ingérer, transporter et digérer les particules étrangères souligne leur double rôle de nutrition et de défense. Fisher (1986) a d'ailleurs supposé que la phagocytose était originellement un processus d'acquisition de nutriments et n'était devenu associée à la défense que plus tard au cours de l'évolution.

V - 2. Les mécanismes de défense cellulaire

V – 2.1. La phagocytose

Les phénomènes cellulaires, et notamment la phagocytose, sont considérés comme les mécanismes majeurs de défense chez les mollusques (Anderson, 1977). Néanmoins, si la particule est trop grosse pour être phagocytée, elle est encapsulée (Cheng, 1983).

La phagocytose peut être divisée en plusieurs étapes parmi lesquelles nous pouvons noter (Renwranz, 1990, Lorteau *et al.*, 1995) :

- *le chimiotactisme* des hémocytes circulants vers le site lésé (infection ou blessure) a été démontré bien que la (les) substance(s) chimioattractante(s) ne soit(ent) pas identifiée(s),
- *la reconnaissance* semble être facilitée par des lectines qui ont un effet opsonisant. Elles stimulent la phagocytose lorsqu'elles se lient simultanément à la cellule cible et à la cellule effectrice,
- *l'internalisation* consiste en la formation de pseudopodes qui vont progressivement entourer et finalement ingérer la particule,
- *la destruction*, après internalisation, est assurée par deux types de processus : un mécanisme oxydatif ou « respiratory burst » et un mécanisme faisant intervenir les enzymes lysosomiales.

V – 2.2. Les types cellulaires impliqués

Cheng (1981) considère que tous les types hémocytaires sont phagocytaires. Cependant, les auteurs ne sont pas unanimes quant aux types hémocytaires impliqués dans le phénomène de phagocytose de substances particulières étrangères. Pour Reade et Reade (1976), les hémocytes agranuleux du bénitier, *Tridacna maxima*, et pour Rudell (1969) ceux de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* sont capables de phagocytose, tandis que pour Moore et Lowe (1977) chez la moule, *Mytilus edulis*, cette activité appartient aux macrophages basophiles plus ou moins granuleux. Auffret (1989) met en évidence le rôle essentiel joué par les granulations cytoplasmiques des hémocytes granuleux d'*Ostrea edulis* dans le processus de phagocytose.

En ce qui concerne l'huître plate, *Ostrea edulis*, Brereton et Alderman (1979) considèrent que des cellules agranuleuses, à activité phagocytaire, observées sont peut-être des granulocytes ayant perdu leurs granules du fait de leur activité métabolique. Déjà en 1961, Bang n'excluait pas la possibilité de variantes physiologiques d'un même type cellulaire granuleux dans le phénomène de phagocytose. Poder (1980) a mis l'accent sur les sources d'erreurs que peuvent représenter les types cellulaires immatures dans l'analyse des réactions cellulaires.

Néanmoins, en réponse à diverses agressions du milieu naturel, la réaction hémocytaire, souvent inconstante, d'intensité et d'évolution variables, fait toujours intervenir les hémocytes granuleux. Ces cellules sont, en effet, capables de phagocytose, de réactions d'englobement ou d'encapsulation, et prennent toujours part au processus de cicatrisation (Cheng, 1981).

La phagocytose, au travers de l'étude de facteurs environnementaux (salinité, température...) a suscité de nombreux travaux. Ainsi, Foley et Cheng (1975) ont initialement décrit une diminution des capacités phagocytaires de l'huître américaine, *C. virginica* associée à de faibles températures. Fisher et Newell (1986) ont par ailleurs mis en évidence des diminutions importantes de ce processus en association avec des salinités élevées et des concentrations en ions métalliques importantes.

V – 2.3. Les facteurs de reconnaissance et d'opsonisation

La majorité des mécanismes de défense dits immédiats, tels que la phagocytose peuvent être facilités ou activés par des facteurs de reconnaissance ou d'opsonisation.

Le chimiotactisme a été démontré pour les hémocytes de l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, par Howland et Cheng en 1982. Il s'agit d'une activité associée à une protéine de 10 000 Daltons retrouvée sur la paroi de *Bacillus megaterium* et d'*Escherichia coli*. Plus récemment, différentes activités induisant un chimiotactisme ont été notées, *in vivo*, pour les hémocytes de *Mytilus edulis* (Schneeweiss et Renwranz, 1993) et, *in vitro*, pour les hémocytes de *Mercenaria mercenaria* (Fawcett et Tripp, 1994) et *Crassostrea virginica* (Alvarez *et al.* 1995).

Des réactions d'immunité humorale de type agglutinine (Renwranz et Stahmer, 1983, Olafsen, 1988, Tuan et Yoshino, 1987) semblent exister chez certains mollusques (la moule, *M. edulis* ; l'huître japonaise, *C. gigas* ; le clam, *Corbicula fluminea*). Il a été décrit un phénomène d'agglutination de microorganismes et ensuite de facilitation de la fixation entre les hémocytes et les microorganismes (Renwranz et Stahmer, 1983). *In vitro*, Olafsen *et al.* (1992) ont décrit un accroissement des agglutinines dans le sérum de *Crassostrea virginica* en réponse à une inoculation de *Vibrio anguillarum*. Des modifications considérables de la quantité des molécules d'agglutinine présentes dans l'hémolymphe d'huître *Crassostrea virginica* infectée par le parasite *Haplosporidium nelsoni* ont été également notées (Kanaley et Ford, 1990, Ling, 1990, Chintala *et al.*, 1994). Lorsqu'elles ont été caractérisées, ces molécules se sont révélées être des lectines. L'hémolymphe n'est pas leur seule localisation puisqu'elles sont retrouvées dans les organes (Lis et Sharon, 1986). Des lectines sont également présentes sur la membrane des hémocytes (Van der Knaap *et al.*, 1981, Yoshino, 1983, Vasta *et al.*, 1984). Cependant, leur nature constitutive ou cytophile n'a pas été déterminée. Chez la moule, *Mytilus edulis*, une lectine a été mise en évidence à la surface des hémocytes et dans l'hémolymphe laissant supposer un rôle opsonisant (Renwranz et Stahmer, 1983). Chen et Bayne (1994) ont montré le rôle de carbohydrates dans les communications hémocytes-cible et inter-hémocytes chez la moule, *M. californianus*. Un récepteur de type lectine existe également sur les macrophages des Vertébrés (Kaplan et Buys, 1985).

Sminia et Van der Knaap (1987) ont envisagé trois modes d'action pour ces facteurs chez les bivalves :

- la lectine est une molécule qui fait partie intégrante de la membrane et est elle-même un récepteur,
- la lectine est cytophile, son récepteur sur la membrane plasmique est inconnu,
- la lectine est cytophile et lie un sucre membranaire.

En particulier, certains travaux indiquent que les lectines cytoplasmiques pourraient être des récepteurs permettant une reconnaissance sans l'intervention de facteurs solubles présents dans l'hémolymphe.

Ces molécules peuvent permettre la caractérisation de différentes populations cellulaires. En particulier, la recherche de huit lectines a permis de mettre en évidence des différences quantitatives et qualitatives entre trois populations géographiquement différentes d'huître américaine, *C. virginica* (Cheng *et al.*, 1995). La présence d'une lectine, la "lathyrose", a été associée à l'absence du parasite *Haplosporidium nelsoni* chez certaines populations de *C. virginica* (Cheng *et al.*, 1995) et pourrait être utilisée comme marqueur de résistance à cette maladie.

V-2.4. L'internalisation

Chez les Vertébrés, la phase d'internalisation se déroule en plusieurs étapes : après la phase d'adhésion, les cellules phagocytaires englobent le micro-organisme en émettant autour de lui des pseudopodes. Ceux-ci fusionnent et le micro-organisme se trouve internalisé dans une vacuole appelée phagosome. Puis les lysosomes fusionnent à leur tour avec le phagosome, pour détruire le micro-organisme ainsi piégé. Cette partie du processus phagocytaire est bien documentée pour les vertébrés, alors que chez les mollusques bivalves marins peu de travaux ont été effectués. Après un contact ponctuel avec la membrane phagocytaire, Chagot *et al.* (1992) décrit un englobement progressif du parasite *B. ostreae* par des pseudopodes des hémocytes de l'huître plate. L'internalisation se complète au sein d'une vacuole parasitophore. Ce type de mécanisme semble correspondre à ce qui est retracé chez les Vertébrés.

V – 2.5. Les phénomènes post-phagocytaires

Les mécanismes mis en oeuvre par les hémocytes pour détruire les particules internalisées font appel aux mêmes processus de défense que les cellules phagocytaires des Vertébrés. Un premier mécanisme fait intervenir les enzymes des lysosomes qui fusionnent avec le phagosome (McKerrow *et al.*, 1985), et le second mécanisme (« respiratory burst ») englobe une série de réactions oxydatives caractérisées par la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène (Badwey et Karnosky, 1988).

L'équipement enzymatique des hémocytes a été étudié par des méthodes histochimiques. Des phosphatases acides et alcalines, des estérases non spécifiques, peroxydase, aminopeptidase, phospholipase C, -glucuronidase, ATPase et -naphthylacétate estérase ont été détectées dans tous les types cellulaires (Adema *et al.*, 1991a, Moore et Gelder, 1985). La répartition non uniforme des activités enzymatiques permet de révéler des sous-populations discrètes, non corrélées avec les types morphologiques (Granath et Yoshino, 1983). Les granules des granulocytes sont considérés comme des lysosomes en raison de la présence de phosphatase acide (Yoshino et Cheng, 1976, Auffret, 1985, Cheng et Downs, 1988). D'ailleurs, différentes études ont permis de préciser le rôle des hémocytes dans la réponse post-phagocytaire vis-à-vis de parasites (Hine et Wesney, 1994, Anderson *et al.*, 1995) ou de cellules tumorales (Noël, 1992). Le deuxième mécanisme, oxydatif, a été démontré chez le pétoncle *Patinopecten yessoensis* (Nakamura *et al.*, 1985), la coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1991), l'huître creuse *C. gigas* (Bachère *et al.*, 1991), l'huître plate *O. edulis* (Bachère *et al.*, 1991) et le gastéropode *Lymnaea stagnalis* (Dikkeboom *et al.*, 1987, Adema *et al.*, 1991b). Chez cette dernière espèce, les intermédiaires réactionnels de l'oxygène pourraient être à l'origine de la cytotoxicité des hémocytes face à des sporocystes de *Schistosoma mansoni* (Dikkeboom *et al.*, 1988).

L'étude des phénomènes de cytocidie ou « killing intra-cellulaire » peut être basée sur la technique de chimioluminescence qui mesure les radicaux libres de l'oxygène générés par le « respiratory burst ». Cette technique a notamment été utilisée pour l'analyse des interactions des hémocytes avec des parasites (Dikkeboom *et al.*, 1988, Hervio *et al.*, 1989 ; Le Gall *et al.*, 1991, Anderson *et al.*, 1992a, Volety et Chu, 1995) ou des cellules tumorales (Noël *et al.*, 1993). Elle a également été utilisée comme marqueur de toxicité. Ainsi Anderson *et al.* (1992b) ont démontré une suppression de la chimioluminescence suite à une exposition des hémocytes à des concentrations élevées de cadmium.

V – 3. Le système de défense humorale

Aucun anticorps n'ayant été identifié, il est considéré que le système de défense des invertébrés est essentiellement non spécifique. L'immunité humorale existe, puisqu'un certain nombre de facteurs humoraux ont été mis en évidence, la majorité étant produite par les hémocytes. Plusieurs facteurs ont été identifiés : lysosyme (Takahashi *et al.*, 1986), bactéricidines (Mori *et al.*, 1984), enzymes lysosomiales plasmatiques (Cheng, 1983), activité sérine-protéase (Bachère *et al.*, 1990), lectines (Renwranz, 1986), cytolysines plasmatiques (Leippe et Renwranz, 1988). Hubert *et al.*, (1995) ont également mis en évidence une activité cytotoxique dans le plasma de la moule *M. edulis*. La purification par chromatographie échangeur d'anions a révélé une protéine cytotoxique multimérique de 320 kDa, qui semble agir par polymérisation après fixation sur la membrane des cellules cibles. Par ailleurs, la présence de molécules de type cytokine dans l'hémolymphe de *M. edulis* a été suspectée suite à la mise en évidence d'une immunoréactivité avec des anticorps polyclonaux spécifiques du TNF- et de l'IL1 recombinants humains par test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Hughes *et al.*, 1990, 1991a, 1991b).

V – 4. Reproduction expérimentale de la Bonamiose

La reproduction expérimentale de la maladie en laboratoire a permis de tester le niveau de résistance de plusieurs espèces de mollusques d'intérêt commercial. L'injection de suspensions de parasites purifiés a été réalisée dans la cavité péricardique d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, qui sont naturellement réfractaires, comme l'atteste l'ensemble des données épidémiologiques. Des parasites n'ont été retrouvés que chez les huîtres plates (Vuillemin, 1987, Renault *et al.*, 1994). L'injection dans la cavité péricardique met les parasites directement en contact avec l'hémolymphe et ainsi avec les hémocytes. Les taux d'infection étant variables en fonction des doses inoculées et des espèces, Vuillemin (1987) a supposé que la barrière de spécificité se situe au niveau de l'hémolymphe et en particulier des hémocytes.

V – 5. Interactions hémocytes/*Bonamia ostreae*

L'acquisition de techniques telles que la purification du parasite et la primoculture d'hémocytes (Mourton *et al.*, 1992) a permis de passer à une phase d'étude *ex-vivo* de ce

modèle et donc d'analyser les premières étapes de reconnaissance et d'internalisation du parasite ainsi que les phénomènes post-phagocytaires impliqués dans la destruction des parasites. Des expériences de mise en contact, *in vitro*, d'hémocytes des deux espèces *O. edulis* et *C. gigas* avec des quantités connues de parasite ont abouti à l'internalisation du parasite dans les hémocytes des deux espèces (Chagot *et al.*, 1992). L'auteur a montré que les mécanismes d'entrée du parasite dans les hémocytes étaient similaires au processus de phagocytose. Cet auteur rapporte que l'internalisation du parasite est diminuée en présence de cytochalasine B (inhibiteur de phagocytose) suggérant dans les deux espèces une phagocytose dirigée par les hémocytes et un possible mécanisme de pénétration active des parasites chez l'espèce *O. edulis*. En cytométrie en flux, l'analyse de la phagocytose de *B. ostreae* purifié vivant et fixé confirme l'existence d'un tel mécanisme. L'internalisation du parasite *B. ostreae* par les hémocytes utilise donc deux voies, l'une non spécifique, la phagocytose, l'autre plus spécifique dirigée par le parasite lui-même (Cochennec, 2001).

Des études concernant d'éventuelles interactions lectines-sucres montrent que le traitement des hémocytes par un mélange de sucres simples (mannose, glucose, fucose, N-acétyl glucosamine et galactosamine) n'a aucun effet sur le pourcentage de phagocytose du parasite par les hémocytes des deux espèces *O. edulis* et *C. gigas*. Des récepteurs de type lectine à la surface des hémocytes des deux espèces ne semblent donc pas jouer de rôle dans l'internalisation de *B. ostreae*. L'incubation des parasites *B. ostreae* avec des sucres, avant leur contact avec les hémocytes, induit par contre une diminution significative du taux d'infection des grands et petits hyalinocytes de *C. gigas* et des granulocytes et des petits hyalinocytes d'*O. edulis*. De tels récepteurs (lectines) semblent opérants sur le parasite (Chagot, 1989). L'utilisation de quatre lectines hétérologues a permis de discriminer les populations cellulaires granuleuses et agranuleuses en cytométrie en flux. Les granulocytes présentent au niveau de leur membrane cytoplasmique des résidus mannose, glucose, galactose, fucose, N-acétyl glucosamine, tandis que les cellules agranuleuses ne présentent que les résidus mannose. La présence de ces mêmes lectines à la surface des parasites suggère un rôle important des lectines dans les phénomènes de reconnaissance et d'internalisation. L'hypothèse d'un mimétisme entre le parasite et les granulocytes pour éviter sa phagocytose par ce type cellulaire n'est pas exclue (Cochennec, 2001).

L'entrée de *B. ostreae* dans les hémocytes des deux espèces suggère que la barrière de spécificité ne se situe pas seulement au niveau de la membrane hémocytaire et que les hémocytes de *C. gigas* doivent pouvoir éliminer efficacement le parasite. Ainsi, les

hémocytes, en tant que cellules «immunitaires» peuvent être directement impliquées dans l'élimination des parasites chez *C. gigas* mais aussi dans la variabilité des infections initiées chez *O. edulis*. Ceci souligne l'intérêt d'étudier les phénomènes post-phagocytaires des hémocytes. Chagot (1989) rapporte que l'étude comparée des hémocytes des deux espèces ne fait pas apparaître de différence évidente dans les activités métaboliques respiratoires en chimioluminescence (Respiratory burst). Ces résultats ne peuvent expliquer à eux seuls l'état réfractaire naturel de l'huître creuse au parasite.

Des investigations supplémentaires ont été réalisées pour comparer les activités lysosomiales post-phagocytaires. La caractérisation enzymatique cellulaire à l'aide de galeries API ZYM a montré des différences significatives chez les hémocytes des deux espèces (Xue, 1998). Les activités enzymatiques sont plus élevées dans l'hémolymphe de l'huître creuse que dans l'hémolymphe de l'huître plate. De plus, la distribution des activités entre l'hémolymphe totale, la fraction acellulaire et les hémocytes est différente entre les deux espèces. Les activités sont plus importantes dans l'hémolymphe totale et la fraction acellulaire de l'huître plate, tandis que pour l'huître creuse, ce sont les activités de l'hémolymphe totale et des hémocytes qui sont les plus élevées. Un travail complémentaire au niveau des différents types cellulaires a été effectué en cytométrie en flux. Six activités enzymatiques post-phagocytaires (estérase, aminopeptidase, galactosidase, cathepsines, myéloperoxydase et la production d' H_2O_2) ont été évaluées pour les trois types hémocytaires décrits chez les huîtres plates, les granulocytes, les grandes cellules agranuleuses et les petits agranuleux. Elles sont toutes supérieures chez les granulocytes confirmant leur rôle important dans la dégradation après internalisation (Cochennec, 2001).

Le fait de disposer d'animaux résistants a ouvert de nouvelles perspectives dans l'étude des mécanismes cellulaires de défense impliqués dans les phénomènes de sensibilité et de résistance. En effet, les travaux réalisés jusqu'alors reposaient sur la comparaison interspécifique de ces mécanismes chez l'espèce *O. edulis* et chez l'espèce réfractaire *C. gigas*. Des analyses des trois types hémocytaires présents chez *O. edulis* ont montré que les grandes cellules agranuleuses étaient significativement moins abondantes et que les granulocytes étaient significativement plus abondants chez les animaux sélectionnés que chez les animaux sensibles. Bien qu'il ne soit pas encore clairement établi que la diminution des grands hyalinocytes soit la conséquence ou la cause de la présence du parasite, ces résultats montrent l'importance de la proportion des types hémocytaires et donc de leurs propriétés

fonctionnelles respectives dans la sensibilité des huîtres au parasite (Cochennec, 1997, Cochennec, 2001). La recherche d'éventuelles différences fonctionnelles entre les types hémocytaires par cyto-enzymologie et cytométrie en flux a montré que les grandes cellules agranuleuses possédaient un équipement enzymatique plus réduit que les cellules granuleuses (Cochennec, 1997, Cochennec, 2001). Afin de rechercher d'éventuelles relations entre ces paramètres et la résistance à la Bonamiose, différentes populations d'huîtres sensibles et résistantes ont été comparées. L'étude a permis de mettre en évidence une corrélation entre les activités des estérases des grandes cellules agranuleuses et la résistance à la Bonamiose.

Une hypothèse quant au développement de la maladie et aux mécanismes impliqués dans la sélection a été proposée (Cochennec, 2001) :

Le parasite est internalisé par les trois types cellulaires. Le processus de phagocytose dirigé par les hémocytes semble être le processus le plus important, toutefois *B. ostreae* participe activement à son internalisation. La similitude des lectines membranaires peut laisser suspecter une part active de *B. ostreae* dans le choix des cellules cibles et notamment le choix des cellules agranuleuses qui présentent des motifs différents. En outre, *B. ostreae* semble influencer la répartition hémocytaire et notamment la diminution des granulocytes présents dans l'hémolymphe. Une fois internalisé, à l'abri dans les grandes cellules agranuleuses, pour la plupart dépourvues d'activités enzymatiques, il survit. D'autre part, *B. ostreae* a développé une ou des stratégies qui lui permettent d'échapper à la dégradation post-phagocytaire notamment par l'inhibition des radicaux oxygénés toxiques.

Dans les populations sélectionnées, sa survie semble compromise par le fait que les grandes cellules agranuleuses sont beaucoup plus actives et qu'elles présentent des expressions, notamment des estérases, supérieures à celle des granulocytes. L'activité des estérases ne semble pas pour autant spécifiquement liées au parasite *Bonamia ostreae*. Les huîtres sélectionnées sont donc des huîtres qui présentent des capacités de défense accrues. On ne peut donc parler d'une réelle résistance mais plutôt d'une tolérance liée à une meilleure adaptation des huîtres au développement de la maladie. Les paramètres cytologiques identifiés, quantifiables, pourront être utilisés comme critère de sélection dans les programmes d'amélioration génétique visant à accroître la résistance à la Bonamiose.

VI. Conclusion

De nombreux travaux ont été consacrés à la Bonamiose. Des avancées importantes ont été réalisées dans l'étude de cette maladie d'invertébrés marins. Les connaissances de l'agent

pathogène lui-même mais également de son hôte font de cette maladie un modèle d'étude expérimentale très intéressant notamment des interactions entre l'hôte *O. edulis* et le pathogène. Toutefois, il ne faut pas oublier que ces analyses sont limitées par le fait que nous ne disposons pas de lignées cellulaires permettant, soit le maintien *in vitro*, des hémocytes, soit la culture des parasites.

VII. Bibliographie

- ABDUL-SALAM, J.M. and MICKELSON, E.H., 1980.** *Biomphalaria glabrata* amoebocytes : effect of *Schistosoma mansoni* infection on *in vitro* phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.*, 35-41.
- ADEMA, C.M., VAN DER KNAAP, W.P.W. and SMINIA, T., 1991a.** Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity : the role of reactive oxygen intermediates. *R. Aquat. Sc*; 4(2) : 201-223.
- ADEMA, C.M., VAN DEUTEKOM-MULDER, E.C., VAN DER KNAAP, W.P.W., MEULEMAN, E.A. and SIMIA, T., 1991b.** Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.*, 15 : 17-26.
- ALVAREZ, M.R., FRIEDL, F.E., and ROMAN, F.R. 1995.** *In vivo* chemoactivation of oyster hemocytes induced by bacterial secretion products. *J. Invertebr. Pathol* 66:287-292.
- ANDERSON, R.S., 1977.** Biochemistry and physiology of Invertebrate macrophages *in vitro* in L.A. Bulla and T.C. Cheng (eds), « Comparative Pathology », Plenum New York/London, 3 : 1-20.
- ANDERSON, R.S., BURRESON, E.M. and PAYNTER, K.T. 1995.** Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *J. Invertebr. Pathol.* 66 : 82-89.
- ANDERSON, R.S., OLIVER, L., and JACOBS, D., 1992a.** Immunotoxicity of cadmium for the eastern oyster (*Crassostrea virginica* [GMELIN,1791]) : effects on hemocyte chemiluminescence. *J. Shellfish Res.* 11:31-35.
- ANDERSON, R.S., PAYNTER, K.T., and BURRESON, E.M., 1992b.** Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected by *Perkinsus marinus*. *Biol. Bull.* 476-481.
- AUFFRET, M., 1989.** Comparative study of the hemocytes of two oysters species : the European flat oyster, *Ostrea edulis, linnaeus*, 1750, and the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Thunberg, 1793. *J. Shellfish Res.*, 8 :367-373
- AUFFRET, M., 1988.** Bivalve hemocyte morphology. *Am. Fish Soc. Sp. Pub.*, 18 : 169-177.
- AUFFRET, M., 1985.** Morphologie comparative des types hémocytaires chez quelques Mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse Doctorat de spécialité en Océanographie, Univ. Bret. Occ. Brest, 153 pp.
- BACHERE, E., DURAND, J. et TIGE, G., 1982.** *Bonamia ostreae* (PICHOT et coll.,1980) parasite de l'huître plate : comparaison de deux méthodes de diagnostic. *Cons. int. Explor. Mer*,28 :1-10.
- BACHERE, E., HERVIO, D. and MIALHE, E., 1991.** Luminol dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, 11 : 173-180.

- BACHERE, E., HERVIO, D., MIALHE, E. and GRIZEL, H., 1990.** Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. Dev. comp. Immunol. 14 : 261-268.
- BADWEY, J.A. and KARNOSKY, M.L., 1988.** Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. Ann. Rev. Bioch. 49 : 695-726.
- BALOUET, G., 1983.** Haemocytic parasitosis : morphology and pathology of lesion in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L. Aquaculture 34 :1-14.
- BANNISTER, C. and KEY, D. 1982.** *Bonamia*, a new threat to the native oyster fishery. Fish. Not., MAFF direct. Fish. Res. Lowestoft, 9pp.
- BARBER, B.J. and DAVIS, C., 1994.** Prevalence of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* populations in Maine. J. Shellfish Res. 13 : 298.
- BARBER, B.J., DAVIS, C.V. CARNEGIE, R.B. et BOETTCHER, K.J. 2000.** Management of juvenile oyster disease (JOD) in Maine. J. Shellfish Res.,19(1) : 641-645.
- BAUD, J.P., GERARD, A. and NACIRI-GRAVEN, Y., 1997.** Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae*-resistant and wild oysters *Ostrea edulis* in an intensive system. Mar. Biol. 130 :71-79.
- BEDIER E., COCHENNEC-LAUREAU N., LANGLADE, A. KOPP, J., GOYARD, E. et GERARD, A. 2001.** Recovery of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.) : new development. EAS, August 4-7, 2001, Trondheim, Norway.
- BODOY, F., BOUGRIER, S., GEAIRON, P., GARNIER, M., BOULO, V. and HEURTEBISE, S., 1991.** Does the prevalence of *Bonamia* and *Marteilia* diseases be reduced on flat oyster (*Ostrea edulis*) of Atlantic and Mediterranean origin, when they are reared together with the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) in tidal ponds ? Note ICES C. M./K :28 : 9pp.
- BOETTCHER, K.J., BARBER, B.J., et SINGER, J.T., 2000.** Additional evidence that juvenile oyster disease is caused by a member of the Roseobacter group and colonization of nonaffected animals by *Stappia stellulata*-like strains. Applied and Environmental Microbiology, 66(9) : 3924-3930.
- BOETTCHER, K.J., SINGER, J.T. et BARBER, B.J., 1999.** A novel species of alpha-proteobacterium is associated with signs of Juvenile Oyster Disease (JOD) in *Crassostrea Virginica*. J. Shellfish Res.,18(1) : 295-296.
- BOUGRIER, S., TIGE, G., BACHERE, E. and GRIZEL, H., 1986.** *Ostrea angasi* acclimatization to french coasts. Aquaculture, 58 : 151-154.
- BOULO, V., MIALHE, E., ROGIER, H., PAOLUCCI, F. and GRIZEL, H., 1989.** Immunodiagnosis of *Bonamia ostreae* (Acetospora) infection of *Ostrea edulis* L. and subcellular identification of epitopes by monoclonal antibodies. J. Fish dis. 12 : 257-262.

- BREHELIN, M. BONAMI, J.R., COUSSERANS, F. and VIVARES, C., 1982.** Existence de formes plasmodiales vraies chez *Bonamia ostreae* parasite de l'huître plate *Ostrea edulis*. L.C.R. Acad. Sc., Paris, Série III, 295 :45-48.
- BREISCH, L.L. and KENNEDY, J.S., 1980.** A selected bibliography of worldwide oyster literature. Maryland Sea. GRANT publication, Maryland :p.309.
- BRERETON, J.D. and ALDERMAN, D.J., 1979.** Wound healing in the european oyster, *Ostrea edulis* L. Aquaculture, 16 : 147-151.
- CACERES-MARTINEZ, J., ROBLEDO, J.A.F., and FIGUERAS, A. 1995.** Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth rates and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ria de Vigo, Galicia (NW Spain). Aquaculture 15-23.
- CAMPALAN, M., ROJAS, P. and GONZALES, M., 2000.** Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis* ; Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 20(1) : 31-33.
- CARNEGIE, R. , BARBER, B.J., CULLOTY, S.C., FIGUERAS, A.J. and DISTEL, D.L., 2000.** Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the *Haplosporidia*. Dis Aquat Organ. 2000 Sep 28;42(3):199-206.
- CHAGOT, D., 1989.** Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Ascetospora). Thèse EPHE Sciences de la Vie et de la Terre. Univ. Montpellier.
- CHAGOT, D., BOULO, V., HERVIO, D., MIALHE, E., MOURTON, C. and GRIZEL, H. 1992.** Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa : Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca : Bivalvia) : entry mechanisms. J. Invertebr. Pathol. 51 : 207-214.
- CHANLEY, P. and DINAMINI, P. 1980.** Comparative descriptions of some oyster larvae from New Zealand and Chili and a description of a new genus of oyster, *Tiostrea*. New Zealand Journal of Marine and Freshwater research 14(2) :103-120.
- CHEN, J. and BAYNE, C. 1994.** The roles of carbohydrates in aggregation and adhesion of hemocytes from the California mussel (*Mytilus californianus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 109A:117-125.
- CHENG, T.C. 1988.** *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica* : total and differential cells counts. J. Invertebr. Pathol. 51 : 207-214.
- CHENG, T.C., 1983.** The rôle of lysosomes in molluscan inflammation. *Am. Zool.*, 129-144.

- CHENG, T.C., 1981.** Bivalves. In N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley (eds), « Invertebrate blood cells », Academic Press, London, pp 233-300.
- CHENG, T.C. and DOWNS, J.C.V., 1988.** Intracellular acid phosphatase and lysosyme levels in subpopulation of oyster, *Crassostrea virginica* hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 52 : 163-167.
- CHENG, T.C., MANZI, J.J., and BURRELL, V.G. 1995.** Differences in lectin-binding by hemocytes of oysters (*Crassostrea virginica*) from three regions and further evidence for the correlation between the presence of lathyrose and the absence of *Haplosporidium nelsoni*. *J. Shellfish Res.* 14:477-481.
- CHINTALA, M.M., FORD, S.E., FISHER, W.S. and ASHTON-ALCOX, K.A., 1994.** Oyster serum agglutinins and resistance to protozoan parasites. *J. Shellfish. Res.* 13(1) : 115-121.
- CIGARRIA, J. and ELSTON, R., 1997.** Independent introduction of *Bonamia ostreae*, a parasite of *Ostrea edulis*, to Spain. *Dis. Aquat. Org.* 29 : 157-158.
- COCHENNEC, N., 2001.** *Bonamia ostreae*, parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis*, sa position taxonomique parmi les parasites du groupe « Microcell », analyses des interactions hôte/parasite chez plusieurs populations d'huîtres plates. Thèse de Doctorat. Biologie cellulaire. Université de la Rochelle. 204p.
- COCHENNEC, N., LE ROUX, F., BERTHE, F. and GERARD, A., 2000.** Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *J Invertebr Pathol.* 2000 Jul;76(1):26-32.
- COCHENNEC, N., 1997.** La Bonamiose : caractérisation du parasite *Bonamia ostreae* et étude de ses interactions avec l'hôte, l'huître plate *Ostrea edulis*. Mémoire Ecole Pratique des Hautes Etudes. Sciences de la Vie et de la Terre. Montpellier, 173 pp.
- COCHENNEC N. et MAZURIE J., 1992.** Effets du parasite *Bonamia ostreae* sur la reproduction des huîtres plates *Ostrea edulis* en Bretagne, France. Pamaq V, 2-4 avril 1992, Montpellier.
- COCHENNEC, N., RENAULT, T., BOUDRY, P. CHOLLET, B. and GERARD, A., 1999.** Bonamia-like parasite in the Suminoe oyster, *Crassostrea rivularis* (Gould) reared in France. *Dis. Aquat. Org.* 34 : 103-107.
- COCHENNEC, N., HERVIO, D., PANATIER, B., BOULO, V., MIALHE, E., ROGIER, H., GRIZEL, H. and PAOLUCCI, M., 1992.** A direct monoclonal antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (Asctospora) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca : Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.*, 12 : 129-134.
- COMPS, M., 1983.** Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des Mollusques bivalves marins. Thèse Doctorat d'Etat en Sciences Naturelles, Université de Montpellier, 128 pp.

- COMPS, M 1970a.** La maladie de branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*, caractéristiques et évolution des altérations, processus de cicatrisation. Rev. Trav. Inst. Pêches marit.,34(1) :23-44.
- COMPS, M 1970b.** Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (*Ostrea edulis* L.) dans le bassin de Marennes. Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 34(3) :317-326.
- COMPS, M. et DUTHOIT, J.L. 1976.** Infection virale associée à la "maladie des branchies" de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. C.R. Acad. Sc., D, 283 : 1595-1596.
- COMPS, M., TIGE, G. and GRIZEL, H., 1980.** Etude ultrastructurale d'un protiste de l'huître *Ostrea edulis* L.. C.R. Acad. Sc. Paris, Série D, 290 : 383-384.
- CORLISS, J.O., 1994.** An interim utilitarian hierarchical classification and characterization of the protists. Acta Protozoologica 33 :1-51.
- CULLOTY, S.C., CRONIN, M. and MULCAHY, M., 2001.** An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters *Ostrea edulis*, L. to the parasite *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980). Aquaculture, 199 :229-244.
- CULLOTY, S.C. and MULCAHY M.F., 1996.** Season-, age- and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oyster (*Ostrea edulis*) L. on the south coast of Ireland. Aquaculture 144 : 53-63.
- CULLOTY, S.C. and MULCAHY, M.F., 1992.** An evaluation of anaesthetics for *Ostrea edulis* L.4th internat. Colloq. marine Aquaculture ;17-21Sept.,Vigo(Pontevedra), Spain.
- CULLOTY, S.C., NOVOA, B., PERNAS, M., LONGSHAW, M., MULCAHY, M.F., FEIST, S.W. and FIGUERAS, A., 1999.** Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite.Dis. Aquat. Org. 37(1) : 73-80.
- DAVIS, C.V., CROSBY, M.A.,BARBER, B.J. et HAWES, R.O., 1997.** Genetic selection in oysters for growth and resistance to juvenileoyster disease (JOD). J. Shellfish Res.,16(1) : 328-331.
- DIKKEBOOM, R., BAYNE, C.J., VAN DER KNAAP, W.P.W. and TIJNAGEL, J.M.G., 1988.** Possible role of reactive forms of oxygen in in vitro killing of *schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. Parasitol. Rev., 75 : 148-154.
- DIKKEBOOM, R., TIJNAGEL, J.M.G.H., MULDER, E.C. and VAN DER KNAAP, W.P.W., 1987.** Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. J. Invertebr. Pathol., 49 : 321-331.

- DIKKEBOOM, R., VAN DER KNAAP W.P.W., MEULEMAN, E.A. and SMINIA T., 1985.** A comparative study on the internal defence system of juvenil and adult *Lymnea stagnalis*. Immunology 85,547.
- DINAMANI, P., HINE, P.M., and JONES, J.B., 1987.** The occurrence and characteristics of the hemocyte parasite *Bonamia sp.* in New Zealand dredge oyster, *Tiostrea lutaria*. Dis. Aquat. Org., 3 : 37-44.
- DOONAN, I.J., CRANFIELD, H.J., and MICHAEL, K.P. 1994.** Catastrophic reduction of the oyster, *Tiostrea chilensis* (Bivalvia : Ostreidae), in Fuveaux Strait, New Zealand, due to infestation by the protistan *Bonamia sp.*. *New Zealand Journal of Marine Freshwater Research* 28:335-344.
- ELSTON, R.A., 1988.** *Bonamia ostreae* disease of the European flat oyster (*Ostrea edulis*) in North America : Occurrence, environmental effects and host range. J. Shellfisheries Assoc., Seattle, WA (USA), 22 Jun 1986. J. Shellfis Res. : 7(1) : 116-117.
- ELSTON, R., FARLEY, C.A., and KENT, M.L. 1986.** Occurence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Dis. aquat. Org.* 2:49-54.
- FARLEY, C.A., LEWIS, E.J., RELYEA, D., ZAHTILA, J. et RIVARA, G., 1997.** Juvenile oyster disease resistance studies continued :1994-1996. J. Shellfish Res.,16(1) : 286-291.
- FARLEY, C.A., SCOTT, R. and WILLIAMS, L., 1996.** Resistance studies of Chesapeake Bay, Maryland, oysters : Epizootiology of two populations exposed to *Haplosporidium nelsoni* and *Perkinsus marinus*. 16. Ann. Meet. : Milford Aquaculture Seminar, Milford, CT(USA), 26-28 feb 1996. J. Shellfish Res., 15(2) : 454.
- FARLEY, C.A., WOLF, P.H., and ELSTON, R., 1988.** A lont-term study of "microcell" disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g.n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fishery Bulletin* 86:581-593.
- FAWCETT, L.B. and TRIPP, M.R., 1994.** Chemotaxis of *Mercenaria mercenaria* hemocytes to *bacteria in vitro*. J. Invertebr. Pathol. 63(3) : 275-284.
- FENG, S.Y., 1965.** Heart rate and leucocyte circulation in *Crassostrea virginica* (Gmelin). Bio. Bull. 128 : 198-210.
- FIGUERAS, A.J., 1991.** *Bonamia* status and its effects incultured flat oysters in the Ria de Vigo (NW Spain). Aquaculture,93 :225-233.
- FISHER, W. 1986.** Structure and functions of oyster hemocytes. In Anonymous Immunity of Invertebrates, 25-35.
- FISHER, W.S. and NEWELL, R.I.E., 1986.** Salinity effects on the activity of granular hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica*. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole, 170(1) : 122-134.

- FLORES, B.S., SIDDALL, M.E., STOKES, N.A. and BURRESON, E.M., 1996.** Phylogeny of the *Haplosporidia* (Eukaryota :Alveolata) based on small subunit RNA. *J Parasitol.* 82(4) : 616-23.
- FOLEY, Y. and CHENG, T.C., 1975.** A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 25 : 189-197
- FORD, S.E. and PAILLARD, C., 1994.** A comparison of juvenile oyster disease in the USA and brown ring disease of Manila clams in Europe. *J. Shellfish Res.*, vol.13,no.1,p.314.
- FORD, S.E., ASHTON-ALCOX, K., and KANALEY S. 1994.** Comparative cytometric and microscopic analyses of oyster hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 64:114-122.
- FORD, S.E., KANALEY, S., and LITTLEWOOD, D.T.J. 1993.** Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni* : Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *J. Invertebr. Pathol* 61:49-57.
- FRIEDMAN, C.S. and PERKINS, F.O. 1994.** Range extension of *Bonamia ostreae* to Maine, U.S.A. *J. Invertebr. Pathol* 64:179-181.
- GOULLETQUER, P. and HERAL, M., 1997.** Marine molluscan production trends in France : from fisheries to aquaculture. In U.S. Dep. Commer., NOAA Technical Report. NMFS 129, 137-164.
- GRANATH, W.O.J.R. and YOSHINO, T.P., 1983.** Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzyme markers. *J. Exp. Zool.*, 205-210.
- GRIZEL, H., 1997.** Les maladies des mollusques bivalves : Risques et prévention. *Rev. Sci. Tech. Of. Int. Epiz.* 16 : 161-171.
- GRIZEL, H., 1989.** Prophylactic strategies and zootechnic measures recent advances. *Advances in Tropical Aquaculture : Workshop held in Tahiti, French Polynesia, 20feb-4mar 1989. Actes Colloq. IFREMER,* 9: 227-231.
- GRIZEL, H., 1985.** Etude des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse Doctorat d'Etat en Sciences Naturelles, Université de Montpellier, 145 pp.
- GRIZEL, H. and HÉRAL, M., 1991.** Introduction into France of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *J. Cons. Int. Explor. Mer,* 47, 399-403.
- GRIZEL H., COMPS M., RAGUENES D., LE BORGNE Y., TIGE G. and MARTIN A.G., 1983.** Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les côtes de Bretagne. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 46 (3) : 209-225.

- GRIZEL, H., COMPS, M., BONAMI, J.R., COUSSERANS, F., DUTHOIT, J.L., LE PENNEC, M.A., 1974.** Recherche de l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis*, Linné. Bull. Inst. Pêches. Marit, 240, 7-30.
- GUERRA, A., MONTES, J., CERVINO, A., LANDIN, A., DE COO, A. and TORRE, M., 1993.** Gametogenic cycle in an oyster population (*Ostrea edulis* L;), cultivated in two areas of Ria de Ortigueira (NW of Spain) with differences in the amount of parasitism by *Bonamia ostreae*. Actas del IV congreso nacional de acuicultura. Centro de investigaciones marinas, Pontevedra : 287-292.
- HAND, R.E., NELL, J.A., SMITH, I.R. et MAGUIRE, G.B., 1998.** Studies on triploid oysters in Australia . XI.Survival of diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*(Iredale and Roughley)) through outbreaks of winter mortality caused by *Mikrocytos roughleyi* infestation. J. Shellfish Res.,17,(4) 334-336.
- HASKIN, H.H. and FORD, S.E., 1978.** Mortality patterns and disease resistance in Delaware Bay oysters.Proc.Natl.Shellfish. Assoc.,Md,vol.68,p.80.
- HASKIN, H.H. and FORD, S.E., 1979.** Development of resistance to *Minchinia nelsoni* (MSX) mortalities in laboratory-reared and native oyster stocks in Delaware Bay. Mar. Fish. Rew. 54-63.
- HAYES, K.R., 1998.** Ecological risk assessment for ballast water introductions : a suggested approach. ICES J. Mar. Sci. 55 : 201-212.
- HERRBACH, B. 1971.** Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné.Rev.Trav.Inst. Pêches marit.,35(1) : 79-87.
- HERVIO, D., 1992.** Contribution à l'étude de *Bonamia ostreae* (Ascetospora), protozoaire parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* (Bivalvia), et à l'analyse des interactions hôte-parasite. Thèse de 3ème cycle en Biologie fondamentale et appliquée (Spécialité : Protistologie), Université de Clermont Ferrand, 170 pp.
- HERVIO, D., BACHERE, E., MIALHE, E. and GRIZEL, H., 1989.** Chemiluminescent responses of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* hemocytes to *Bonamia ostreae* (Ascetospora). Dev. Comp. Immunol., 13 : 449.
- HERVIO, D., BACHERE, E., BOULO, V., COCHENNEC, N., VUILLEMIN, V., LE COGUIC, Y., CAILLETAUX, G., MAZURIE, J. and MIALHE, E., 1995.** Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *Ostrea edulis* with the intrahaemocytic protozoan parasite *Bonamia ostreae* : application in the selection of parasite-resistant oyster. Aquaculture 132 : 183-194.
- HINE, P.M., 1996.** The ecology of *Bonamia* and decline of bivalve molluscs. NZ J. Ecol. 20 : 109-116

- HINE, P.M 1991.** The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. In New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. *Aquaculture*, 93 :241-251.
- HINE, P.M. and JONES J.B., 1994.** *Bonamia* and other aquatic parasites of importance to New Zealand. *NZ J. Zool.* 21 : 49-56.
- HINE, P.M., and WESNEY B., 1994.** Interaction of phagocytosed *Bonamia* sp. (Haplosporidia) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.* 20(3) : 219-229.
- HINE, P.M., COCHENNEC –LAUREAU, N. and BERTHE, F.C., 2001.** *Bonamia exitiosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters, *Ostrea chilensis*, in New Zealand. *Dis. Aquat. Org* 47(2) :63-72.
- HINSCH, G. and HUNTE, M. 1990.** Ultrastructure of phagocytosis by hemocytes of the american oyster. *Pathology in Marine Science* 479-487.
- HOWLAND, K. H. and CHENG, T.C., 1982.** Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 39 :123-132.
- HUBERT F, VAN DER KNAAP W, NOEL T. and ROCH P., 1995.** Cytotoxic and antibacterial properties of *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (bivalve molluscs) hemolymph. *Aquat. Living Res.* 9 (2) : 115-124.
- HUDSON, E.B. and HILL, B.J., 1989.** Impact and spread of bonamiosis in UK. 2nd. Meet. On Bonamiosis, Ijmuiden (Netherlands). *Spec. Iss. Bonamiosis, Flat oyster culture, Western Europe & New Zealand, Aquaculture*, 93(3) : 279-285.
- HUGUES, T.K., CHIN, R., SMITH, E.M., LEUNG, M.K., and STEFANO, G.B. 1991a.** Similarities of signal systems in vertebrates and invertebrates : detection, action, and interactions of immunoreactive monokines in the mussel, *Mytilus edulis*. *Advance in Neuroimmunology* 59-69.
- HUGUES, T.K., SMITH, E.M., BARNETT, J.A., CHARLES, R., and STEFANO, G.B. 1991b.** LPS stimulated invertebrate hemocytes : a role for immunoreactive TNF and IL-1. *Developmental and Comparative Immunology* 117-122.
- HUGUES, T.K., SMITH, E.M., CHIN, R., CADET, P., SINISTERRA, J., LEUNG, M.K., SHIPP, M.A., SCHARRER, B., and STEFANO, G.B. 1990.** Interaction of immunoactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4426-4429.

- HUVET, A., 2000.** Ressources génétiques et phylogéographie des huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *C. angulata* : variabilité, différenciation et adaptation des populations naturelles et introduites. Thèse de Doctorat. Sciences de la Vie. Université F. Rabelais, Tours. 202 pp.
- JAZIRI, H., 1985.** Biogéographie et polymorphisme enzymatique chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. 1758. Mémoire de DEA, Univ. Sciences et Techniques du Languedoc.
- JAZIRI, H., DURAND, P., PICHOT, P. and BLANC, F. 1987.** Genetic diversity between and within populations of the European oyster, *Ostrea edulis*. In : Selection Hybridization and Genetic engineering in Aquaculture (Tiews, k.(ed.)). Proceeding World Symposium on Selection, Hybridization, and genetic engineering to Aquaculture, Bordeaux, 27-30 May, 1986.
- JEFFS, A.G. and CREESE, R.G. 1996.** Overview and bibliography of research on the Chilean oyster, *Tiostrea chilensis* (Philippi.) 1845) from New Zealand waters. J. Shellfish Res. 15(2) :305-311.
- JEONG, K.H., LIE, K.J. and HEYNEMAN, D., 1983.** The ultrastructure of the amoebocyte Producing organ in *Biomphalaria glabrata*. Dev. Comp. Immunol., 7 : 217-228.
- KANALEY, S.A. and FORD, S.E., 1990.** Lectin binding characteristics of haemocytes and parasites in the oyster *Crassostrea virginica*, infected with *Haplosporidium nelsoni* (MSX). Parasite Immunol., 12 : 633-646.
- KAPLAN, J. and BUYS, S.S., 1985.** Macrophage surface receptors for soluble macromolecules. In R.T. Dean and W. Jessup (eds) "Mononuclear phagocytes : physiology and pathology". Elsevier Amsterdam, New York, Oxford, 79-88.
- KATKANSKY, S.C., 1969.** Observations on survival and growth of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California. Calif. Fish. and Game, 55(1) :69-74.
- KERN, F.G., 1993.** Shellfish health inspections of Chilean and Australian oysters. NSA's 85. Annu. Meet. Oyster Disease Research Program Portland, OR (USA), 31 may-3jun 1993. J. Shellfish Res. 12(2) : 366.
- LA PEYRE, J.F., CHU, F.L., and MEYERS, J.M. 1995.** Haemocytic and humoral activities of Eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish and Shellfish Immunology* 5:179-190.
- LAMA, A. and MONTES, J., 1993.** Influence of depth of culture in the infection of the european flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 13:17-20.
- LE BEC, C., MAZURIE, J., COCHENNEC, N. and LE COGUIC, Y., 1991.** Influence of *Crassostrea gigas* mixed with *Ostrea edulis* on the incidence of *Bonamia* disease. Aquaculture, 93 : 263-271.

- LE BORGNE, Y. et LE PENNEC, M., 1983.** Elevage expérimental de l'huître asiatique *Ostrea denselamellosa* (Lischke). *Vie Marine* (5) : 23-28
- LE GALL, G., BACHERE, E., and MIALHE, E., 1991.** Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific Rickettsiales-like organisms. *Dis. Aquat. Org.*, 11 : 181-186.
- LEIPPE M. and RENWRANTZ L., 1988.** Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. *Dev. comp. Immunol.* 12 : 297.
- LEVINE, N. D., CORLISS, J. O., COX, F.E.G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIBERG, B. M., LEEDALE, G. F., LOEBLICH, A. R., LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E. G., PAGE, F. C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J., WALLACE, F. G., 1980.** A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, 27, 37-58.
- LIE, K.J., HEYNEMAN D. and YAU P., 1975.** The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, 61,574.
- LING, Y.J., 1990.** Cellular and humoral responses of resistant and susceptible oyster, *Crassostrea virginica*, infected with *Haplosporidium nelsoni* (MSX). Master of Science. University of Connecticut, Avery Pt., C.T. 102 pp.
- LIS, H. and SHARON, N., 1986.** Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.*, 55 : 35-67.
- LORTEAU, C., AUFFRET, M. et LE BRIS, H., 1995.** Le système d'immuno-défense des Mollusques bivalves. *Rec. Méd. Vet.*, 171(6/7), 415-422.
- MARTIN, A.G., GERARD, A., COCHENNEC, N. and LANGLADE, A., 1993.** Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostrea* : assessment of the resistance of a first selected generation. *European Aquaculture Society, Special Publication*, Ghent, Belgium, 18 : 545-554.
- MATTHIESSEN, G.C. 2001.** *Oyster Culture*. Fishing News book, Blackwell, Oxford :p.162.
- Mc CORMICK-RAY, M.G. and HOWARD, T. 1991.** Morphology and mobility of oyster hemocytes : evidence for seasonal variations. *J. Invertebr. Pathol* 58:219-230.
- Mc KERROW, J.H., JEONG, K.H. and BECKSTEAD, J.H., 1985.** Enzymo-histochemical comparison of *Biomphalaria glabrata* amebocytes with human granuloma macrophages. *J. Leuk. Biol.*, 37 : 341-347.

- McARDLE, J.F., McKIERNAN, F., FOLEY, H. and JONES D.H., 1989.** The current statut of *Bonamia* disease in Ireland. 2nd. Meet. On Bonamiosis, Ijmuiden (Netherlands). Spec. Iss. Bonamiosis, Flat oyster culture, Western Europe & New Zealand, Aquaculture, 93(3) : 273-278.
- MIALHE, E., BACHERE, E., CHAGOT, D. and GRIZEL, H., 1988a.** Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot and coll., 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. Aquaculture, 71 : 293-299.
- MIALHE, E., BOULO, V., ELSTON, R., HILL, B., HINE, M., MONTES, J., VAN BANNING, P. and GRIZEL, H. 1988b.** Serological analysis of *Bonamia* in *Ostrea edulis* and *Tiostrea lutaria* using polyclonal and monoclonal antibodies. Aquat. Living Resour. 1 : 67-69.
- MINCHIN, D., and SHEEHAN, J., 1998.** The significance of ballast water in the introduction of exotic marine organisms to Cork Harbour, Ireland. ICES, Copenhagen, ICES-CM-1995/0: 1, 15pp.
- MONTES, J., ANADON, R., and AZEVEDO, C. 1994.** A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J. Invertebr. Pathol* 1-6.
- MONTES, J., PERKINS, F.O. and CHENG, T.C. 1988.** Development of *Bonamia ostreae* parasitosis of flat oyster, *Ostrea edulis*, from Galicia, northwest Spain. 3^{ème} Int. Colloq on Pathology in Marine Aquaculture. Gloucester Point, VA (USA), 2-6 Oct. 1988 : 223-227.
- MONTES, J., VILLALBA, A., LOPEZ, M.C., CARBALLAL, M. and MOURELLE, S.G., 1991.** Bonamiosis in native flat oysters, *Ostrea edulis* L., from two intertidal beds of the Ortigueirira estuary (Galicia, N.W. Spain) with different histories of oyster culture. Aquaculture 93(3) : 213-214.
- MOORE, M. and LOWE, D. 1977.** The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *J. Invertebr. Pathol* 29:18-30.
- MOORE, C.A., and GELDER, S.R., 1985.** Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca : Bivalvia). Trans. Amer. Microsc. Soc. 104 : 242-249.
- MORI, K., MURAYAMA, K., KANNO, N., NAKAMURA, M., OHIRA, E., KATO, Y. and NOMURA T., 1984.** Occurrence and characterization of the defense factors in the Japanese oyster *C. gigas*. Tohoku J. Agr. Res. 35 : 55-61.
- MOURTON, C., BOULO, V., CHAGOT, D., HERVIO, D., MIALHE, E. and GRIZEL, H., 1992.** Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa : Asctospora) and haemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca : Bivalvia) : *in vitro* system establishment. *J. Invertebr. Pathol.*, 59 : 235-240.
- NACIRI, Y., 1994.** Sélection des mollusques : Bilan et nouvelles perspectives concernant la croissance, la qualité et les résistances aux maladies. Bordeaux Aquaculture, 54-61.

- NACIRI-GRAVEN Y., HAURE J., GERARD A. and BAUD .P., 1999.** Comparative growth of *Bonamia ostreae* resistant and wild flat oyster *Ostrea edulis* in an intensive system : II second year of the experiment. *Aquaculture* 171 :195-208.
- NACIRI-GRAVEN Y., MARTIN A.G., BAUD J.P., RENAULT T. and GERARD A., 1998.** Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 224 :91-107.
- NAKAMURA, M., MORI, K., INOOKA, S. and NOMURA, T., 1985.** *In vitro* production of hydrogen peroxyde by the amoebocytes of the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Dev. Comp. Immunol.* 9 : 407-417.
- NELL, J.A., SMITH, I.R. and McPHEE, C.C., 2000.** The Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850) breeding programme : progress and goals. *Aquaculture Research*, 31 : 45-49.
- NEUFELD, D.S. and WRIGHT, S.H. 1996.** Response of cell volume in *Mytilus* gill to acute salinity change. *Journal of Experimental Biology* 199:473-484.
- NOEL, D. 1992.** Etude des hémocytes et d'une néoplasie hémocytaire chez les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus trossulus* (Mollusca : Bivalvia). Thèse de l'Université de Bordeaux II. 169 pp.
- NOEL, D., BACHERE, E. and MIALHE, E., 1993.** Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Dev. Comp. Immunol.*, 17 : 483-493.
- O'NEILL, G., CULLOTY, S. and MULCAHY, M., 1998.** The effectiveness of two routine diagnostic techniques for the detection of the protozoan parasite *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 18(4) : 117-120.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000.** Diagnostic manual for aquatic animal diseases. Third edition, 2000. Edt OIE, Rue de Prony, 75017 Paris.
- OLAFSEN, J.A., 1988.** Role of lectins in invertebrate humoral defenses. *Am. Fish. Soc. Sp. Publ.*, 18 : 189-205.
- OLAFSEN, J.A., FLETCHER, T.C. and GRANT, P.T., 1992.** Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following *in vivo* *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev. Comp. Immunol.*, 16 : 123-138.
- OLIVER, L. and FISHER, W. 1995.** Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Chesapeake Bay (Virginia) and Apalachicola Bay (Florida). *Dis. aquat. Org.* 22:217-225.
- OUBELLA, R., MAES, P., PAILLARD, C. and AUFFRET, M. 1993.** Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis. aquat. Org.* 15 : 193-197.

- PAILLARD, C., ASHTON ALCOX, K.A. and FORD, S.E., 1996.** Changes in bacterial densities and hemocyte parameters in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, affected by juvenile oyster disease . Aquat. Living Resour., 1996, 9 : 145-158.
- PASCUAL, M., MARTIN, A.G., ZAMPATTI, E, COATANEA, D., DEFOSSEZ, J. and ROBERT, R., 1991.** Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana*, in several french oyster farming sites. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen (Denemark) Shellfish Comm. 26sept-4oct. 17pp.
- PAYNTER, K.T., GAFFNEY, P.M. and MERITT, D.W., 1997.** Evaluation of American oyster stocks : Disease resistance and genetics. J. Shellfish Res., vol.16 : 329-332.
- PERKINS, F.O., 1996.** Phylum Haplosporidia Caullery and Mesnil, 1899. In Illustrated Guide to the Protozoan 2nd. Ed. Society of Protozoologists.
- PERKINS, F. O., 1990.** Haplosporidia. In *Handbook of Protozoology* (ed Margulis, L. Corliss, J. O., Melkonian, M., Chapman, D. J.) pp. 19-29. Jones and Bartlett Publishers Corp., Boston.
- PERKINS, FO 1979.** Cell structure of shellfish pathogens and hyperparasites in the genera *Minchinia*, *Urosporidium*, *Hasplopordium*, and *Marteilia* – taxonomic implications. Mar. Fish Rev. 41(Jan.-Feb.) : 25-37.
- PERKINS, F.O., 1975a .** Fine structure of *Minchinia* sp. (Haplosporida) sporulation in the mud crab, *Panopeus herbstii*. Mar. Fish Rev., 37 : 46-60.
- PERKINS, FO 1975b.** Fine structure of *Minchinia* sp (Haplosporida)sporulation in the mud crab *Panopeus herbstii*. Marine Fisheries Review 37 :46-60.
- PICHOT, Y., COMPS, M., GRIZEL, H. et RABOUIN M.A., 1980.** Recherches sur *Bonamia ostreae*, gen. n. sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43 : 131-140.
- PIPE, R.K, 1990.** Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocyte of the marine mussel *Mytilus edulis*. Histochem. J., 22 : 595-603.
- PODER, M., 1980.** Les réactions hémocytaires inflammatoires et tumorales chez *Ostrea edulis* (L.). (Essais de classification des hémocytes des Mollusques bivalves). Thèse 3ème cycle. Univ. Bret. Occ. U.E.R. Sci. Tech., 95 pp.
- POLANCO, E., MONTES, J., OUTON, M.J. and MELENDEZ, M.I. 1984.** Situation pathologique du stock d'huîtres plates en Galice (Espagne) en relation avec *Bonamia ostreae*. Haliotis, Paris. 14 : 91-95.
- READE, P. and READE, E., 1976.** Phagocytosis in invertebrates : studies on the hemocytes of the clam *Tridacna maxima*. J. Invertebt. Pathol. 28 : 281-290.

- REED, J.L. and MUENCH, H., 1938.** A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27 : 493-497.
- RENAULT, T., COCHENNEC, N., and GRIZEL, H. 1994.** *Bonamia ostreae*, parasite of the european flat oyster, *Ostrea edulis*, does not experimentally infect the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 15:78-80.
- RENWRANTZ, L.R., 1990.** Internal defense system of *Mytilus edulis*. In : *Neurobiology of Mytilus edulis*, Stefano G.B. (Ed). Manchester University Press, Manchester, U.K., 256-275.
- RENWRANTZ, L.R., 1986.** Lectins in molluscs and arthropods : their occurrence, origin and roles in immunity. *Symp. Zool. Soc. London* 56-81.
- RENWRANTZ, L. and STAHLER, A., 1983.** Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. *J. Comp. Physiol.*, 149 : 535-546.
- RENWRANTZ, L., DANIELS, J. and HANSEN, P.D., 1985.** Lectin binding to hemocytes of *Mytilus edulis*. *Dev. comp. Immunol.*, 9 : 203-210.
- ROGAN, E., CULLOTY, S.C., CROSS, T.F. and MULCAHY, M.F., 1991.** The detection of *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980) in frozen oysters (*Ostrea edulis* L.) and the effect of the parasite on condition. *Aquaculture*, 97(4) : 311-315.
- ROGIER, H., HERVIO, D., BOULO, V., CLAVIES, C., HERVAUD, E., BACHERE, E., MIALHE, E., GRIZEL, H., PAU, B. and PAOLUCCI, F., 1991.** Monoclonal antibodies against *Bonamia ostreae* (Protozoa : Ascomycota), an intrahaemocytic parasite of flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca : Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.* 11 : 135-142.
- RONDELAUT, D. and BARTHE, D., 1981.** The development of the amoebocyte producing organ in *Lymnaea trunculata* Müller infected by *Fasciola hepatica* L., *Z. Parasitenkd.*, 65,331.
- RUDELL, C.L., 1969.** A cytological and histochemical study of wound repair in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Ph. D. Thesis, Univ. Washington, Seattle, 134 pp.
- RUIZ, G.M., RAWLINGS, T.K. and DOBBS, F.C., 2000.** Global spread of microorganisms by ships : ballast water discharged from vessels harbours a cocktail of potential pathogens. *Nature*, 408 : 49-50.
- SER, J., 1987.** Le livre amateur d'huîtres et de coquillages. Ed Daniel Briand/Robert Laffont. 166 pp.
- SCHEEWEISS, H. and RENWRANTZ, L., 1993.** Analysis of the attraction of haemocytes from *Mytilus edulis* by molecules of bacterial origin. *Dev. Comp. Immunol.* 17(5) : 377-387.

- SMALL, E.B. 1995.** Ciliated protists associated with juvenile oyster disease. *J. Shellfish Res.*, 14(1): 247-248.
- SMINIA, T., 1981.** Phagocytic cells in molluscs, in "Aspects of Developmental and Comparative Immunology". In Solomon J.B. (ed) Pergamon Press, Oxford.
- SMINIA, T. and VAN DER KNAAP, W.P.W., 1987.** Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev. Comp. Immunol.*, 11 : 17-28.
- SMINIA, T., VAN DER KNAAP, W.P.W and VAN ASSELT, L.A., 1983.** Blood cell types and blood cell formation in gasteropod molluscs. *Dev. Comp. Immunol.*, 7 : 667-668.
- SMITH, I.R., NELL, J.A. and ADLARD, R., 2000.** The effect of growing level and growing method on winter mortality, *Mikrocytos roughleyi*, in diploid Sydney rocks oysters, *Saccostrea glomerata*. *Aquaculture* (185) :197-205.
- SMOLOWITZ, R.W., MIOSKY, D. and REINISCH, C.L., 1989.** Ontogeny leukemic cells of the soft clam. *J. Invertebr. Pathol.*, 53-41.
- SURESH, K. and MOHANDAS, A. 1990.** Effect of sublethal concentrations of copper on hemocyte number in bivalves. *J. Invertebr. Pathol* 55:325-331.
- TAKAHASHI, K., MORI, K. and NOMURA, T., 1986.** Occurrence and characterization of lysozyme in the marine bivalves. *Bull. Japan; Soc. Sci. Fisheries* 52 : 863-868.
- TIGE, G. et GRIZEL, H., 1984.** Essai de contamination d'*Ostrea edulis* Linné par *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*,1979) en Rivière de Crach (Morbihan).*Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* 46 : 307-317.
- TIGE, G., GRIZEL, H., RABOUIN, M.A., COCHENNEC, N., AUDIC, G. et LANGLADE, A., 1982.** Maladie hémocytaire de l'huître plate causée par *Bonamia ostreae*. Evolution de la situation épidémiologique en Bretagne au cours de l'année 1981. *Rev. Trav. Sci. Pêche*, 328 : 3-13.
- TUAN, T.L. and YOSHINO, T.P., 1987.** Role of divalent cations in plasma opsonin-dependant and independant erythrophagocytosis by hemocytes of the Asian clam, *Corbicula fluminea*. *J. Invertebr. Pathol.*, 50 : 310-319
- VALIULIS, G.A. and HASKIN, H.H., 1973.** Resistance of *Crassostrea virginica* to *Minchinia nelsoni* and *Labyrinthomyxa marina*. *Proc. Natl. Shellfish. Assoc.*,vol.63 ,pp 6.

- VAN BANNING, P. 1990.** The life cycle of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* with a presumptive phase in the ovarian tissue of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 84 :189-192.
- VAN BANNING, P., 1989.** Observation on bonamiosis in the stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent development in Lake Grevelingen. 2nd. Meet. On Bonamiosis, Ijmuiden (Netherlands). Spec. Iss. Bonamiosis, Flat oyster culture, Western Europe & New Zealand, *Aquaculture*, 93(3) : 279-285.
- VAN DER KNAAP, W.P.W, BOERRIGTER-BARENSEN, L.H. VAN DEN HOEVEN, D.S.P. and SMINIA, T., 1981.** Immunocytochemical demonstration of a humoral defence factor in blood cells (amoebocytes) of the pond snail *Lymnea stagnalis*. *Cell tissue Res.*, 291-296.
- VASTA, G.R., CHENG, T.C. and MARCHALONIS, J.J., 1984.** A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cell Immunol.*, 83 : 475-488.
- VOLETY, A. and CHU, F.L. 1995.** Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Developmental and Comparative Immunology* 19:135-142.
- VUILLEMIN, G., 1987.** Mise au point d'un modèle expérimental de reproduction et d'étude de la bonamiose, maladie hémocytaire de l'huître plate *Ostrea edulis*. Rapport DEA, Université d'Aix Marseille II. 28 pp.
- WALNE, P.R. and MANN, R., 1975.** Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. H. Barnes (Ed), Proc. 9th Europ Mar. Bio. Symp. Aberddn Univ. Press, Scotland : 587-607.
- XUE, Q., 1998.** Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes chez l'huître plate, *Ostrea edulis*. Thèse de Doctorat de l'Institut Universitaire Européen de la Mer, Brest. 274 pp.
- YOSHINO, T.P., 1983.** Lectins and antibodies as molecular probes of molluscan hemocyte surface membranes. *Dev. Comp. Immunol.*, 7 : 641-644.
- YOSHINO, T.P. and CHENG, T.C. 1976.** Fine structural localization of acid phosphatase in granulocytes of the pelecypod *Mercenaria mercenaria*. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 95:215-220.
- ZABALETA, A. and BARBER, B.J., 1996.** Prevalence, intensity and detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* L : in the Damaniscotta River area, Maine. *J. Shellfish Res.* 15 : 395-400.