

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

THÈSE

présentée

par

Dominique JEAN CHAGOT

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes
Études

Caractérisation morphologique et fonctionnelle
des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*
mollusques bivalves.

Étude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire
Bonamia ostreae (Asctospora)

Soutenue le 26 janvier 1989 devant la Commission d'Examen

M. J. BONS	- Président
M. C. VAGO	- Rapporteur
M. G. BOUIX	- Examineur
M. H. GRIZEL	- Examineur

Laboratoire de Pathologie
comparée de l'École Pratique des
Hautes Études (III^{ème} Section)
MONTPELLIER

Directeur M. C. VAGO

Laboratoire de Pathologie et
Génétique des Invertébrés Marins,
IFREMER - LA TREMBLADE

Directeur M. H. GRIZEL

A mes parents,

A mon mari,

A mon fils.

AVANT- PROPOS

Avant d'exposer les résultats du travail effectué au Laboratoire de Pathologie et de Génétique des Invertébrés Marins, il m'est agréable de remercier Monsieur Henri GRIZEL qui en assume la direction. Bien au delà du cadre de ce mémoire, c'est avec plaisir que je considère le fait d'appartenir à son équipe.

Monsieur le Professeur BONS me fait l'honneur de présider le jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je suis particulièrement touchée de la présence dans mon jury de thèse de Monsieur le Professeur VAGO, membre de l'Institut. Sa large expérience et son rôle pionnier dans le domaine de la pathologie comparée en font un juge privilégié de ce travail.

Ma gratitude va également à Monsieur le Professeur BOUIX qui a accepté avec beaucoup de gentillesse de participer au jury.

Je remercie tout particulièrement Eric MIALHE pour l'appui scientifique et humain qu'il m'a manifesté, au moment où mes choix professionnels me conduisaient à me remettre en cause.

Bien des aspects de cette thèse sont intimement liés à la collaboration avec les autres membres de l'équipe du Laboratoire de Pathologie et de Génétique des Invertébrés Marins de La Tremblade. Je les remercie de leur aide précieuse et efficace.

Je ne saurais oublier de mentionner l'aide d'Alain DITER pour l'analyse statistique des données.

Je sais gré à Geneviève BONHOMME du soin qu'elle a pris de la frappe du rapport.

Je remercie mon mari pour la part active qu'il a pris dans l'illustration de ma thèse.

Enfin, je souhaite remercier le Conseil Régional de Bretagne, pour l'assistance financière accordée à ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	3
I - LES EFFECTEURS CELLULAIRES.....	3
1. Les lectines hétérologues.....	4
2. Les anticorps monoclonaux.....	4
3. Les anticorps contre des déterminants hétérologues.....	5
II - IMMUNITE HUMORALE.....	6
1. Le lysozyme.....	6
2. Les bactéricidines.....	7
3. Les activités enzymatiques plasmatiques.....	7
4. Les lectines sériques.....	7
5. Les cytolysines plasmatiques.....	8
6. Les autres facteurs plasmatiques.....	8
III - REACTIONS IMMUNITAIRES.....	9
1. Chimiotactisme.....	10
2. Reconnaissance.....	10
3. Dégradation intracellulaire.....	12
4. Mécanismes de cytocidie.....	12
5. Activation métabolique respiratoire.....	12

IV - L'IMMUNITE ANTI-INFECTIEUSE.....	13
1. L'incompatibilité.....	13
2. La susceptibilité.....	13
3. La résistance.....	14
MATERIELS ET METHODES.....	16
I - ANIMAUX.....	16
II - PARASITES.....	16
1. Purification.....	16
2. Anticorps monoclonaux.....	17
III - HEMOCYTES.....	17
1. Prélèvement.....	17
2. Séparation.....	17
3. Numération des hémocytes.....	19
IV - INFECTIONS EXPERIMENTALES.....	19
1. Culture cellulaire.....	19
2. Infection <u>in vitro</u>	20
V - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES.....	20
1. Microscopie photonique.....	20
1.1. Préparation d'hémocytes.....	20
1.2. Colorations.....	21
1.3. Primocultures d'hémocytes.....	21

2. Microscopie électronique à transmission.....	21
2.1. Caractérisations ultrastructurales.....	21
2.2. Caractérisations enzymatiques.....	22
2.2.1. Phosphatases acides.....	22
2.2.2. Estérases non spécifiques.....	22
2.2.3. Peroxydases.....	23
2.2.4. Catalase.....	24
2.2.5. NADH oxydase.....	24
2.3. Immunomarquage.....	25
2.3.1. Cryo-ultramicrotomie.....	25
2.3.2. Préparation de la protéine A-gold.....	26
2.3.3. Immunomarquage.....	27
2.3.4. Contraste à l'uranyle et enrobage à la méthylcellulose.....	28
VI - CHIMIO-LUMINESCENCE.....	28
1. Préparation des hémocytes.....	28
1.1. Population totale des hémocytes.....	28
1.2. Hémocytes séparés.....	29
2. Préparation du zymosan.....	29
3. <u>Bonamia ostreae</u>	29
4. Essais de chimioluminescence.....	29
4.1. Protocole.....	30
4.2. Essais d'inhibition.....	30
RESULTATS.....	31
I - ANALYSE MORPHOLOGIQUE, BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE DES HEMOCYTES.....	31
1. Morphologie en microscopie photonique.....	31
2. Ultrastructure.....	32
2.1. Sur hémolymphe entière.....	32
2.2. Sur types cellulaires séparés de <u>C. gigas</u>	33
2.2.1. Distribution des hémocytes dans le gradient de Percoll.....	33
2.2.2. Distribution des hémocytes dans les fractions éluées.....	34
3. Détermination des hémogrammes.....	34

3.1. Numérations d'hémocytes au compteur cellulaire.....	34
3.2. Pourcentage des différents types hémocytaires.....	34
4. Caractérisations enzymatiques.....	36
4.1. Phosphatase acide.....	36
4.2. Estérases non spécifiques.....	36
4.3. Peroxydase.....	37
4.4. NADH oxydase.....	38
5. Production de radicaux libres de l'oxygène.....	38
5.1. Effet des inhibiteurs.....	39
5.1.1. Superoxyde dismutase (S.O.D.)..	39
5.1.2. Azide de sodium et cyanure de potassium.....	40
5.1.3. Cytochalasine B..	40
5.2. Hémocytes séparés.....	40
6. Discussion.....	40
II - RELATIONS <u>BONAMIA OSTREAE</u> -HEMOCYTES.....	45
1. Analyse des cellules infectées naturellement.....	45
1.1. Microscopie photonique.....	45
1.2. Microscopie électronique.....	45
2. Etude des interactions <u>in vitro</u>	46
2.1. Mécanismes d'entrée.....	46
2.1.1. Description des cellules infectées.....	46
2.1.2. Traitement des hémocytes par la cytochalasine B.....	47
2.1.3. Traitement de <u>B.ostreae</u> par la cytochalasine B.....	48
2.2. Phénomènes de reconnaissance : étude des récepteurs impliqués.....	49
2.2.1. Rôle opsonisant de l'hémolymphe.....	49
2.2.2. Intervention d'épitopes membranaires de <u>B.ostreae</u>	49
2.2.3. Reconnaissance liée aux interactions sucre-lectine.....	50
3. Phénomènes de survie.....	51
3.1. Activités enzymatiques de détoxification chez <u>B.ostreae</u>	52
3.1.1. Phosphatase acide.....	52

3.1.2. Catalase.....	52
3.2. Interférence de <u>B.ostreae</u> avec le "Respiratory Burst".....	52
4. Discussion.....	53
CONCLUSIONS-PERSPECTIVES.....	59
BIBLIOGRAPHIE.....	61

I N T R O D U C T I O N

L'étiologie des épizooties survenant chez les Mollusques bivalves marins fait apparaître tous les groupes d'agents pathogènes connus en pathologie humaine et vétérinaire : virus, procaryotes, champignons, protozoaires, métazoaires (fig.1).

Parmi ces agents, les protozoaires du Phylum des Asctospora jouent incontestablement un rôle majeur car ils ont été associés à des mortalités massives affectant en particulier l'ostréiculture. Il s'agit des genres Minchinia et Haplosporidium pour les huîtres creuses américaines, Marteilia dont une espèce a décimé les stocks d'huîtres plates du littoral atlantique et Bonamia responsable d'une enzootie des huîtres plates (GRIZEL, 1985).

Pour ces parasites, les données descriptives de base concernant la morphologie et l'ultrastructure sont assez bien établies, bien que des incertitudes demeurent au niveau de la taxonomie et des cycles de développement. En revanche, ni la pathogénie, ni les bases de la susceptibilité ou de la résistance ne sont bien connues, en raison de l'absence de système expérimental fiable parasite-mollusque, aucun des protozoaires incriminés n'étant disponible en souche pure. La mise au point de protocoles de purification (MIALHE et al., 1988) a permis d'acquérir un tel système pour Bonamia ostreae, agent de la bonamiose ou maladie hémocytaire de l'huître plate Ostrea edulis.

Découverte à l'Ile Tudy en 1979, la protozoose à B.ostreae s'est propagée à tous les centres ostréicoles bretons puis européens (GRIZEL, 1985). Son extension mondiale, puisqu'elle touche maintenant les U.S.A (ELSTON et al., 1986) et la Nouvelle Zélande (DINAMANI et al., 1987),

GROUPES		ESPECES-HOTES
VIRUS	Papovaviridae	<u>C.gigas</u> , <u>C.commercialis</u> <u>O.edulis</u> , <u>O.lurida</u>
	Herpetoviridae	<u>O.edulis</u> , <u>C.virginica</u>
	Togaviridae	<u>O.lurida</u>
	Retroviridae	<u>C.virginica</u>
	Iridovirus	<u>C.anquilata</u> , <u>C.gigas</u>
PROCARYOTES	Rickettsies	<u>C.virginica</u> , <u>C.gigas</u> <u>O.edulis</u>
	Chlamydies	<u>C.anquilata</u>
	Mycoplasmes	<u>C.virginica</u>
	Bactéries	<u>C.virginica</u>
PROTOZOAIRE	Perkinsus	<u>C.virginica</u>
	Marteilia	<u>O.edulis</u> , <u>C.commercialis</u>
	Minchinia	<u>C.virginica</u>
	Haplosporidium	<u>C.gigas</u> , <u>O.edulis</u> , <u>O.anqasi</u>
	Bonamia	<u>O.edulis</u> , <u>Tiostrea lutaria</u>
METAZOAIRE	Mytilicola	<u>C.gigas</u>

Figure 1 : Principaux groupes d'agents pathogènes décrits chez les Ostreidae (d'après Kinne, 1983)

justifie le développement d'études approfondies. Des caractères du parasite, décrits par PICHOT et al. (1980) et COMPS (1983), il faut retenir sa localisation intrahémocytaire et la présence dans le cytoplasme de particules denses structurées, morphologiquement identifiables à des haplosporosomes, qui l'apparente aux Ascetospora. La reproduction expérimentale de la maladie in vivo, modélisée par VUILLEMIN (1987) a montré que, pour une même dose inoculée, les huîtres de l'espèce O.edulis développent des infections de degré variable selon l'individu, alors que les huîtres de l'espèce Crassostrea gigas ne développent jamais d'infection, confirmant ainsi la résistance observée dans le milieu naturel. Ceci peut suggérer des capacités immunitaires différentes chez les deux espèces, ou, chez O.edulis, une suppression de ces capacités induite par le parasite. Les caractéristiques fondamentales de B.ostreae, sa nature intracellulaire obligatoire et son développement dans la cellule sanguine ou hémocyte, classiquement impliquée dans les réactions de défense appellent une référence aux protozoaires parasites des Vertébrés, tels que les toxoplasmes ou les leishmanies, qui sont capables de survivre et de se développer dans les cellules immunocompétentes de type macrophage. Comme pour ces protozoaires, l'analyse des interactions Bonamia-hémocyte à l'échelle cellulaire doit permettre d'aborder certains aspects de la pathogenèse et des phénomènes d'induction et de suppression de l'immunité à médiation cellulaire chez les Mollusques bivalves.

Ce travail, rendu possible par l'élaboration d'un modèle d'étude in vitro (MOURTON, 1987) sera exposé dans le cadre de ce rapport après un rappel des connaissances acquises sur le système de défense interne des Mollusques.

D O N N E E S B I B L I O G R A P H I Q U E S

L ' I M M U N I T E C H E Z L E S M O L L U S Q U E S

L'étude de l'immunité chez les Invertébrés a été conduite dans une optique d'analyse évolutive des mécanismes immunitaires des Vertébrés. La description des phénomènes observés s'inscrit dans le schéma classique en immunologie des Vertébrés qui distingue une immunité cellulaire et une immunité humorale.

I - LES EFFECTEURS CELLULAIRES

L'immunité à médiation cellulaire est assurée par les cellules sanguines ou hémocytes. Chez les Mollusques, ces cellules sont de type leucocytaire. Leur morphologie a suscité de nombreux travaux dont il existe des revues (PODER, 1980 ; AUFFRET, 1985) et des synthèses récentes (CHENG, 1981). Bien qu'il n'y ait pas de consensus sur le nombre et la description des types cellulaires, le schéma proposé par CHENG (1981) peut être retenu quant à l'existence de deux grands types morphologiques :

- les granulocytes, cellules à rapport nucléocytoplasmique faible contenant des granules cytoplasmiques,
- les hyalinocytes, cellules à rapport nucléocytoplasmique élevé sans granule cytoplasmique.

Les auteurs ont multiplié les types cellulaires sur la base de techniques variées : affinités tinctoriales (FENG et al., 1971) ; histochimie (MOORE et EBLE, 1977 ; RUDDLELL, 1971a) ; ultrastructure (RUDDLELL, 1971b ; HAWKINS et HOUSES, 1982) ; analyses de fonction (MOORE et LOWE, 1977) qui, appliquées individuellement créent une certaine disparité. D'autre part, ils ont assimilé à des cellules normales des cellules réactionnelles (RUDDLELL, 1971c) ou néoplasiques (COUCH, 1969).

Cependant, l'étude récente des déterminants membranaires des hémocytes, calquée sur celle des cellules de Vertébrés, atteste leur hétérogénéité. Différents marqueurs de membrane ont été utilisés.

1. Les lectines hétérologues

Les lectines sont des protéines extraites de plantes ou d'animaux, d'origine non immune et dépourvues d'activité enzymatique (LIS et SHARON, 1986) qui ont la propriété de lier spécifiquement des oligosaccharides, notamment ceux des glycoconjugués des membranes cellulaires. Elles peuvent ainsi agglutiner sélectivement certaines populations de cellules. Substituées par des fluorochromes ou des marqueurs cytochimiques, elles sont utilisées en microscopie pour visualiser les glycoconjugués (SCHREVEL et al., 1981). Leur application chez les Vertébrés concerne la détermination des groupes sanguins des érythrocytes, mais aussi le diagnostic des changements dans la constitution du plasmalemme lors de néoplasies (NICOLSON, 1976). Utilisées chez les Mollusques, les lectines ont permis de caractériser des sous-populations hémocytaires pour plusieurs espèces : Crassostrea virginica (CHENG et al., 1980), Biomphalaria glabrata (YOSHINO, 1983), Mytilus edulis (RENWRANTZ et al., 1985). La corrélation avec les types morphologiques n'est pas toujours évidente.

2. Les anticorps monoclonaux

La technologie d'hybridation lymphocytaire, largement utilisée en immunologie fondamentale et clinique chez les Vertébrés (KEARNEY, 1984 ; MAC MICHAEL et FABRE, 1982) a permis la production d'anticorps monoclonaux, homogènes et monospécifiques, dirigés contre des déterminants de membrane des hémocytes. Selon des techniques

immunocytochimiques, ces anticorps permettent de reconnaître quatre sous-populations parmi les granulocytes circulants de B.glabrata (YOSHINO et GRANATH, 1983). La nature des épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux n'est pas déterminée, cependant certains peuvent être corrélés à une fonction : le marqueur BGH1 reconnaît une population d'hémocytes faiblement phagocytaire, et plus fortement représentée chez la souche sensible à Schistosoma mansoni que chez la souche résistante (YOSHINO et GRANATH, 1985). Une étude récente définit chez Lymnea stagnalis un épitope LS1 sur une sous-population d'hémocytes plus abondante chez les juvéniles. Il pourrait s'agir d'un marqueur de différenciation (DIKKEBOOM et al., 1988a).

3. Les anticorps contre des déterminants hétérologues

Certaines populations d'hémocytes de B.glabrata montrent une réactivité croisée avec des anticorps anti-fibronectine humaine et anti-Thy 1 de souris (YOSHINO, 1983). La signification de cette réactivité est loin d'être claire et l'interprétation des résultats obtenus avec des anticorps dirigés contre des antigènes hétérologues impose la prudence.

Malgré une hétérogénéité évidente, ni les spécialisations cellulaires, ni l'éventuelle filiation des cellules circulantes n'ont été démontrées. Des schémas hypothétiques d'hématopoïèse ont été proposés. Celui de CHENG (1981), postule l'existence de deux lignées séparées, la lignée granuleuse et la lignée hyaline. Les cellules blastiques à l'origine de chaque lignée ne sont pas connues. Celui de SMINIA et al. (1983), fait état d'une seule lignée évolutive, les hyalinocytes étant considérés comme immatures.

L'existence d'un organe hématopoïétique est évoquée chez B.glabrata (LIE, et al. 1975 ; JEONG et al. 1983) alors qu'il n'a pas été mis en évidence chez L.stagnalis, pas plus que chez les bivalves marins. Si des mitoses sont observées pour tous les types cellulaires chez les gastéropodes (SMINIA et al., 1983), elles sont extrêmement rares chez les bivalves. On ne connaît pas le turn-over des hémocytes.

II - IMMUNITE HUMORALE

Il est généralement admis que les Invertébrés ne produisent pas d'anticorps. Ce point de vue résulte de l'incapacité à mettre en évidence une réponse amnestique et spécifique dans la plupart des groupes. Cependant, une mémoire immunitaire semble exister chez les Annelides sur la base d'expériences de rejet de greffes (COOPER et ROCH, 1986) pour les Echinodermes, un facteur de type anticorps a été démontré chez Asterias rubens (BRILLOUET et al., 1985). Chez les Mollusques, il n'a pas été détecté de complexe protéique de type complément, et les seuls facteurs humoraux qui peuvent jouer un rôle sont :

1. Le lysozyme

Présent dans toutes les espèces de Mollusques, on en trouve dans les sécrétions muqueuses, l'appareil digestif, l'hémolymphe (MAC HENERY, et al. 1979 ; TAKAHASHI et al., 1986), et les hémocytes (CHENG et al., 1975). L'enzyme coupe la liaison entre l'acide acétylmuramique et la N-acétyl-glucosamine. Cette liaison n'est directement accessible que sur les parois de quelques bactéries Gram positives, ce qui restreint le spectre bactéricide du lysozyme s'il agit seul. Il est inductible (CHENG,

et al., 1975, 1977) et relargué par les hémocytes pendant la phagocytose et l'encapsulation (CHENG et al., 1975).

2. Les bactéricidines

L'hémolymphe des Mollusques contient des substances différentes du lysozyme. Elles tuent certaines bactéries (MORI et al., 1984). Leur nature et leur mode d'action restent indéterminés.

3. Les activités enzymatiques plasmatiques

Des enzymes lysosomiales ont été caractérisées dans l'hémolymphe. Leur activité augmente après stimulation immunitaire (CHENG et RODRICK, 1975 ; CHENG, 1976). Elles pourraient contribuer à des processus de destruction extracellulaire (CHENG, 1983), mais ce rôle possible n'a pas été confirmé expérimentalement. Chez les Vertébrés, la présence extracellulaire d'enzymes lysosomiales est plutôt associée aux effets secondaires indésirables de la réaction inflammatoire.

Dans l'hémolymphe, une activité sérine-protéase est capable d'inactiver in vitro des bactériophages (BACHERE, en préparation).

4. Les lectines sériques

Des agglutinines capables de provoquer in vitro l'agglutination d'hématies ou de bactéries ont été démontrées dans l'hémolymphe de la plupart des Mollusques. Lorsqu'elles ont été caractérisées, elles se sont révélées de nature lectine. L'hémolymphe n'est pas leur seule localisation puisqu'on en trouve dans les organes (LIS et SHARON, 1986) et les oeufs (GILBOA-GARBER et al., 1985). Très étudiées, elles font l'objet de revues récentes (RENWRANTZ et STAHMER, 1983 ; MULLAINADAN et RENWRANTZ, 1986 ; RENWRANTZ, 1986 ; OLAFSEN, 1986). Les mêmes lectines

plasmatiques sont également présentes sur la membrane des hémocytes (YOSHINO, 1983 ; RENWRANTZ et STAHER, 1983 ; VASTA et al., 1984) sans que leur nature constitutive ou cytophile soit déterminée VAN DER KNAAP et al. (1981) démontrent qu'elles sont sécrétées par les hémocytes. Chaque espèce étudiée peut en contenir une ou plusieurs. Les lectines rencontrées chez les différentes espèces de Mollusques sont non inductibles, hétérogènes par le poids moléculaire, le nombre des sous-unités glycoprotéiques et par leur spécificité vis-à-vis des oligosaccharides. Un rôle métabolique de transporteur de sucres a été suggéré et une fonction d'opsonine a été envisagée et sera discutée ultérieurement.

5. Les cytolysines plasmatiques

Elles interviendraient dans des phénomènes de cytotoxicité (YOSHINO et TUAN, 1985 ; WITKE et RENWRANTZ, 1984 ; LEIPPE et RENWRANTZ, 1985). Les cellules cibles sont lysées à distance des hémocytes par des médiateurs solubles activement sécrétés par les cellules sanguines (LEIPPE et RENWRANTZ, 1988). L'un de ces médiateurs pourrait être une phospholipase C (YOSHINO, 1988).

6. Les autres facteurs plasmatiques

Parmi ceux-ci, ont été décrits :

- . une substance immobilisante pour les miracidies chez B.glabrata (LIE et al., 1980a).
- . un activateur du complément des Vertébrés chez Helix pomatia et B.glabrata (KOCH et NIELSEN, 1984)
- . un inhibiteur de protéases chez B.glabrata (RENWRANTZ, 1979)

La structure de ces facteurs n'est pas connue, pas plus que leur rôle démontré.

BRIDE et al. (1986), notent la présence de fibronectine dans l'hémolymphe d'Helix aspersa.

GRANATH et YOSHINO (1984a), décrivent un facteur activant les hémocytes chez B.glabrata. En l'absence d'hémolymphe, ni les hémocytes de la souche résistante, ni ceux de la souche sensible ne sont cytotoxiques pour S.mansoni. En présence d'hémolymphe homologue, seuls les hémocytes de la souche résistante sont actifs. Les hémocytes de la souche sensible le deviennent en présence de l'hémolymphe de la souche résistante.

III - REACTIONS IMMUNITAIRES

En dépit du grand nombre de données descriptives relatives aux cellules et aux médiateurs solubles susceptibles d'intervenir dans le système de défense interne, les mécanismes immunitaires eux-mêmes ne sont pas parfaitement compris.

La ligne de défense primordiale chez les Mollusques est la phagocytose (BANG, 1975 ; ANDERSON, 1977). Si la particule est trop grosse pour être phagocytée, elle est encapsulée (CHENG, 1983).

Tous les types cellulaires sont phagocytaires, les granulocytes sont considérablement plus actifs (CHENG, 1981). Étudiée in vivo par RENWRANTZ et al. (1981) chez H.pomatia, l'élimination des particules étrangères comporte deux phases :

- le piégeage des particules par les cellules qui bordent les sinus sanguins,

- la migration des hémocytes circulants vers les particules piégées et phagocytose.

La phagocytose suit les étapes classiques déterminées chez les Vertébrés.

1. Chimiotactisme

Il a été démontré pour les hémocytes de C.virginica par CHENG et HOWLAND, 1979. La molécule chimiotactique est une protéine de 10 000 daltons associée à la paroi d'Escherichia coli et Bacillus megaterium (HOWLAND et CHENG, 1982).

2. Reconnaissance

Les hémocytes des Mollusques reconnaissent des particules abiotiques (STAUBER, 1950 ; TRIPP, 1963 ; SMINIA et al., 1974). Les bases de cette reconnaissance : hydrophobie, charge électrique, sont postulées mais pas démontrées (LACKIE, 1980). D'autre part, l'étude in vivo de l'élimination de différentes particules biotiques montre que les hémocytes reconnaissent des caractères de surface et sont capables de discrimination (RENWRANTZ et al., 1981).

De nombreux travaux indiquent une reconnaissance par des opsonines plasmatiques (RENWRANTZ et MOHR, 1978 ; SMINIA et al., 1979 ; TUAN et YOSHINO, 1987). In vivo, chez H.pomatia, l'injection d'une dose primaire d'érythrocytes réduit la vitesse à laquelle une dose secondaire est éliminée. Elle redevient normale si les érythrocytes de la dose secondaire sont préincubés avec la lectine purifiée de la glande de l'albumine ou HPA (HARM et RENWRANTZ, 1980). Ces résultats impliquent un rôle d'opsonine pour l'HPA, rôle confirmé par l'inhibition de la

clairance des levures par pré-injection de N-acétyl-hexosamines capables de mobiliser l'HPA (RENWRANTZ et al., 1981).

La phagocytose est augmentée par des lectines hétérologues in vitro, (RENWRANTZ, 1986). Des données, également acquises avec des lectines exogènes, suggèrent un rôle des lectines endogènes dans les remaniements membranaires qui précèdent l'endocytose : ainsi, le traitement des hémocytes de B.glabrata (YOSHINO, 1981) ou de Mytilus edulis (DAGEFORDE et al., 1986) par des lectines entraîne le "capping" des récepteurs à ces lectines, et les complexes Concanavalline A-récepteurs sont internalisés par les hémocytes de B.glabrata (YOSHINO, 1982). Cependant, peu d'auteurs à l'exception de RENWRANTZ et STAHER (1983) ont vérifié le pouvoir opsonisant des lectines natives.

D'autre part, les lectines de la membrane plasmique pourraient être des récepteurs conditionnant une reconnaissance indépendante des opsonines : un récepteur de type lectine existe sur les macrophages des Vertébrés (KAPLAN et BUYS, 1985). En accord avec SMINIA et VAN DER KNAAP (1986), trois modes d'action des lectines peuvent être envisagés :

- . la lectine est une protéine intégrale de 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.

La question de l'existence d'autres opsonines reste ouverte, en particulier la reconnaissance des protéines étrangères n'a jamais été abordée.

3. Dégradation intracellulaire

L'équipement enzymatique des hémocytes a été étudié par des méthodes histochimiques (SMINIA et BARENSEN, 1980 ; HUFFMANN et TRIPP, 1982 ; GRANATH et YOSHINO, 1983, 1984b ; MOORE et GELDER, 1983, 1985 ; DIKKEBOOM et al., 1984). Tous les types cellulaires contiennent des hydrolases acides (phosphatases acides et alcalines, estérases non spécifiques, β -glucuronidase). La répartition non uniforme des activités enzymatiques permet de révéler des sous-populations discrètes, non corrélées avec les types morphologiques (GRANATH et YOSHINO, 1983, 1984b). Peu de caractérisations enzymatiques sont effectuées au niveau sub-cellulaire, cependant, les granules des granulocytes sont considérés comme des lysosomes en raison de la présence de phosphatase acide (YOSHINO et CHENG, 1976 ; AUFFRET, 1985) et de leur coloration par l'acridine orange (MOORE et GELDER, 1983). Ils sont rencontrés en association avec le phagosome (CHENG et CALI, 1974 ; YOSHINO et CHENG, 1976 ; GELDER et MOORE, 1986). L'activité enzymatique est augmentée par la phagocytose (GELDER et MOORE, 1986).

4. Mécanismes de cytocidie

CHENG (1981) et ANDERSON (1981) considèrent qu'un système H₂O₂/myéloperoxidase/halogénure n'existe pas chez les Invertébrés. Cependant, une peroxidase est mise en évidence chez les gastéropodes (SMINIA et BARENSEN, 1980 ; SMINIA et al., 1982 ; GRANATH et YOSHINO, 1983, 1984b).

5. Activation métabolique respiratoire

Peu d'études concernent les bases métaboliques de l'activation phagocytaire des hémocytes de Mollusques. Cependant, NAKAMURA et al. (1985) et DIKKEBOOM et al. (1987) démontrent la production de radicaux libres de l'oxygène respectivement chez un bivalve (Patinopecten yessoensis) et chez un escargot (L. stagnalis).

IV - L'IMMUNITE ANTI-INFECTIEUSE

L'implication potentielle des phénomènes décrits précédemment n'a été étudiée dans le cadre de l'immunité anti-infectieuse que chez quelques gastéropodes, hôtes intermédiaires de trématodes et ce, en raison de leur rôle de vecteurs d'une anthroponose qui touche 300 millions d'individus dans le monde. D'excellentes revues couvrent les aspects de l'immunité anti-trématode chez les gastéropodes (BAYNE, 1983 ; LOKER et BAYNE, 1986 ; VAN DER KNAAP et MEULEMAN, 1986). La réponse immunitaire fait apparaître le rôle primordial des hémocytes dans des phénomènes d'encapsulation décrits en histologie et en ultrastructure in vivo (LIE et HEYNEMAN, 1975 ; LIE et al., 1980b ; KLUHSPIES, 1983 ; DONDERO et al., 1977 ; LOKER, 1979) et in vitro (LOKER et BAYNE, 1982).

Plusieurs types de réponses ont été observés suivant les combinaisons entre souches de B.glabrata et de S.mansoni (LOKER et BAYNE, 1986) :

1. L'incompatibilité

Les sporocytes de certaines souches de schistosomes ne se développent pas dans certaines souches de B.glabrata. Aucun signe de réponse immunitaire n'est observé. Une immunosuppression préalable de l'hôte ne modifie pas le devenir du parasite. L'hôte et la souche de parasite sont physiologiquement incompatibles.

2. La susceptibilité

Le degré de réponse immunitaire varie suivant la souche de l'hôte. Il peut être nul, ou se traduire par une augmentation des mitoses dans l'organe producteur d'amœbocytes, ou par une leucocytose sans modification des proportions des types cellulaires, éventuellement par une encapsulation. Dans l'hémolymphe apparaissent des substances

normalement absentes immobilisant les miracidies (M.I.S.). Leur structure est inconnue. Quelles que soient les manifestations de la réponse immunitaire, la souche compatible de schistosome se développe, l'hôte restant capable de détruire d'autres souches. Deux hypothèses sont émises pour expliquer "l'évasion" de la réponse immunitaire par le parasite :

- le schistosome synthétise ou incorpore des antigènes d'hôte, ce qui lui évite d'être identifié comme non-soi (YOSHINO et CHENG, 1978 ; YOSHINO et BAYNE, 1983 ; BAYNE et STEPHENS, 1983). Ce masquage du parasite est observé également chez L.stagnalis (VAN DER KNAAP et al., 1985a et b). L'efficacité d'un tel procédé reste à démontrer.
- le schistosome inhibe activement le système immunitaire par sécrétion de substances qui interfèrent directement avec ce dernier (LIE, 1982). La cible est l'hémocyte dont l'inhibition est sélective, les fonctions étant pour la plupart maintenues (LIE et al., 1981). L'interférence active avec le système de défense interne n'a pas été mise en évidence chez L.stagnalis (VAN DER KNAAP et MEULEMAN, 1986).

3. La résistance

Elle s'accompagne obligatoirement d'une réaction immunitaire qui se traduit par l'encapsulation in vivo et in vitro. Les hémocytes de la capsule phagocytent des portions de tégument des larves. CHENG et GABARRANT (1977) émettent l'hypothèse de la participation d'enzymes lysosomiales à la digestion extracellulaire. L'intervention possible de radicaux libres de l'oxygène est évoquée par VAN DER KNAAP et MEULEMAN (1986). Les bases moléculaires de la résistance ne sont pas connues. Les hémocytes jouent un rôle essentiel. Les sporocytes de S.mansoni ne sont

pas détruits dans le plasma seul, mais celui-ci pourrait intervenir en activant les hémocytes (GRANATH et YOSHINO, 1984a).

Le modèle gastéropode-trématode est le seul à avoir suscité une étude systématique. Il laisse évidemment subsister des questions fondamentales sur l'immunité anti-infectieuse chez les Mollusques, cependant les apports liés à cette démarche sont considérables. L'élaboration d'un modèle bivalve-agent pathogène, jusqu'alors inexistant pourra contribuer à une meilleure compréhension du système de défense interne.

M A T E R I E L S E T M E T H O D E S

I - ANIMAUX

Les huîtres plates Q.edulis utilisées comme source de parasites proviennent des parcs de la baie de Quiberon, où se maintient une infection chronique qui atteint de 0 à 30 % des individus. Les huîtres plates saines sont originaires de l'étang de Thau, site exempt de bonamiose, comme le démontre un suivi épidémiologique de plusieurs années. Les huîtres creuses C.gigas sont pêchées dans le bassin de Marennes-Oléron.

II - PARASITES

1. Purification

Les suspensions purifiées de B.ostreae sont obtenues suivant le protocole présenté dans la figure 2 (MIALHE et al., 1988). L'utilisation de broyats tissulaires permet de récupérer les parasites localisés dans les hémocytes extravasculaires.

La viabilité des parasites est vérifiée par une coloration à l'acridine orange-bromure d'éthidium (0.1 mg pour 100 ml d'eau de mer stérile) (PARKS et al., 1979). L'émission d'une fluorescence verte, due à la prise de l'acridine orange par la quasi totalité des cellules ainsi que l'étude des suspensions en ultrastructure (fig.3 et 4) attestent l'intégrité des parasites purifiés. Les suspensions sont quantifiées par comptage à la cellule de Malassez. La contamination bactérienne des suspensions de B.ostreae purifiées est vérifiée par culture sur milieu nutritif gélosé (TSA Difco). Elle est de l'ordre d'une colonie pour 100 parasites.

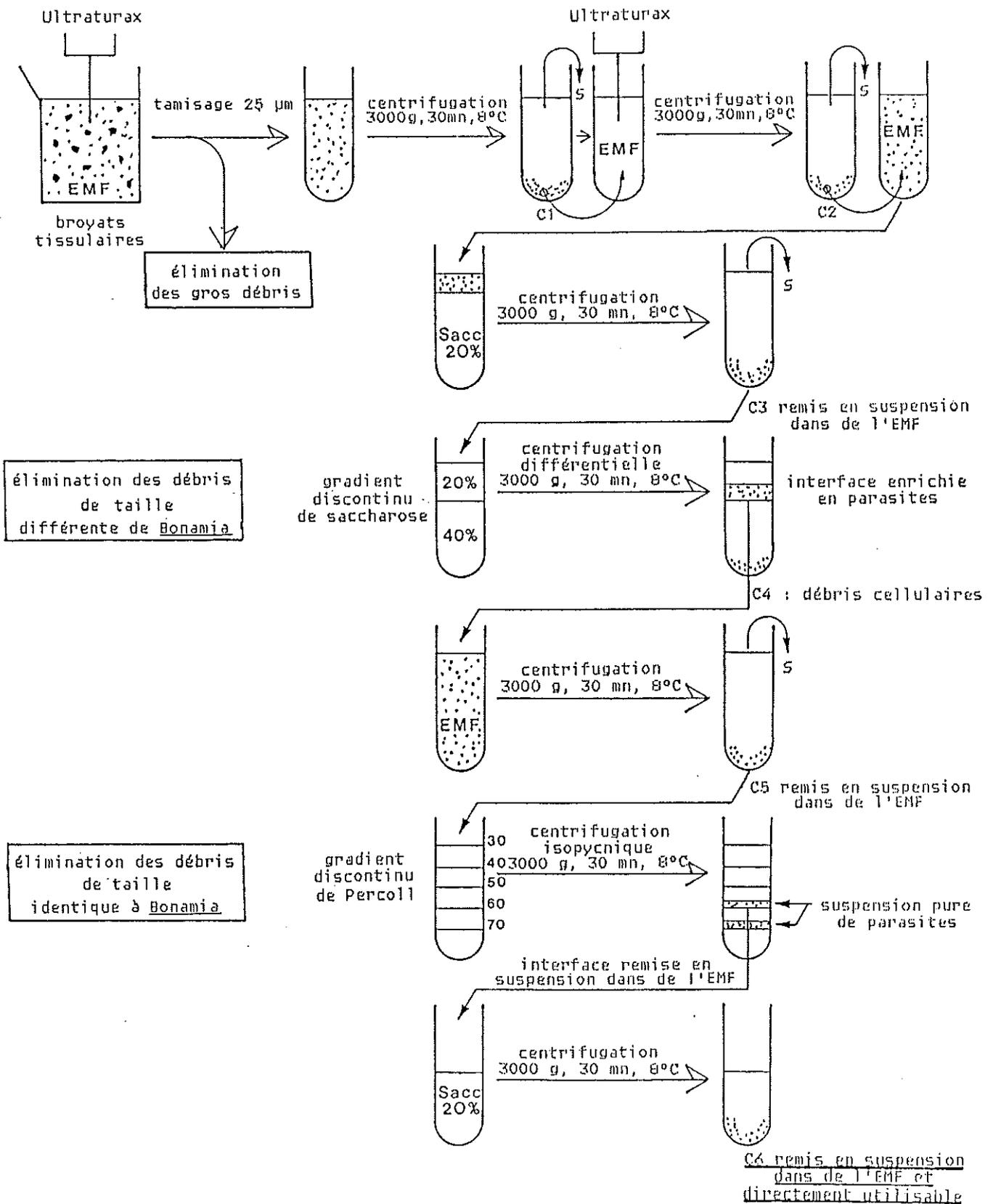


Figure 2 : Protocole de purification de *Bonamia ostreae*

S : surnageant; C1 : culot
 E M F : eau de mer filtrée

PLANCHE I

Suspensions purifiées de Bonamia ostreae

Figure 3 :

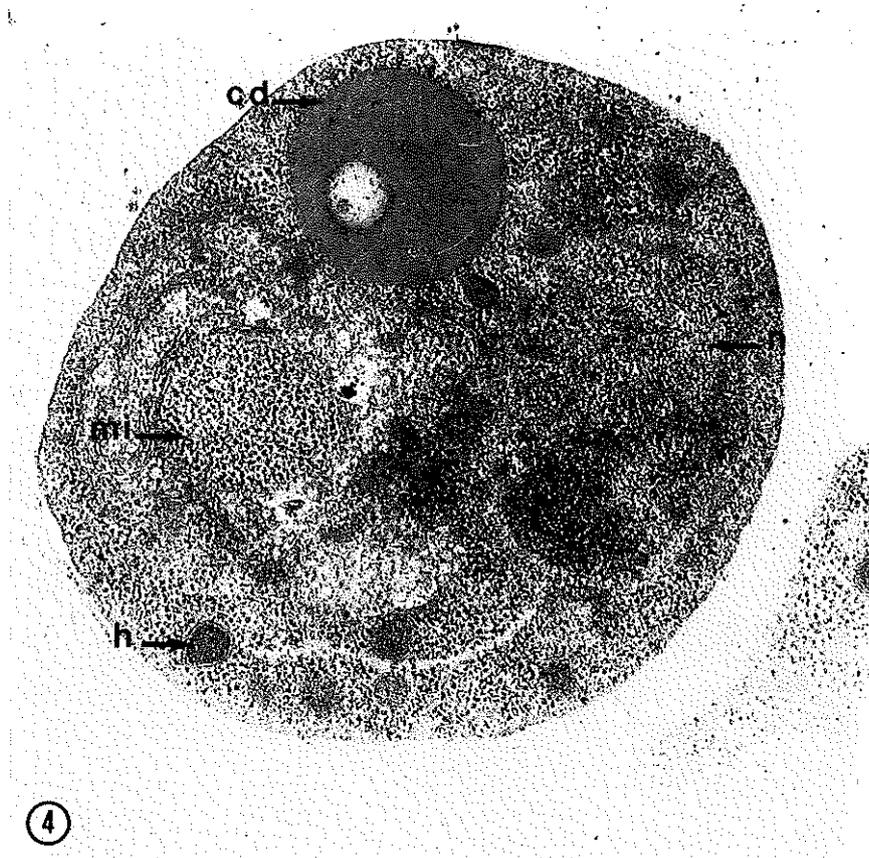
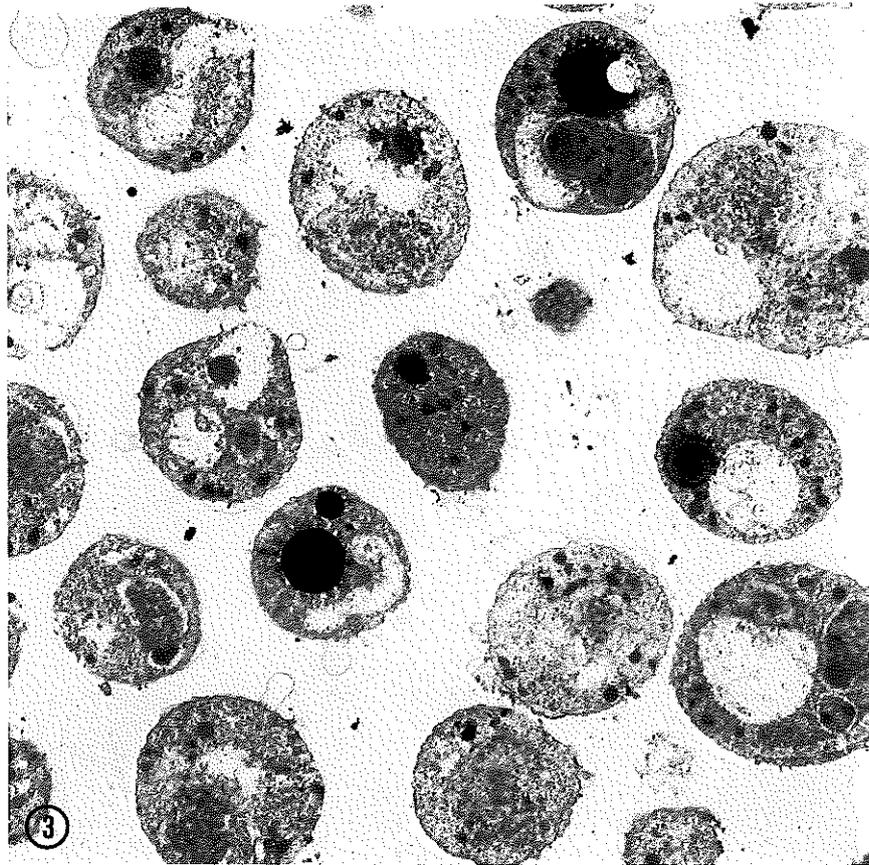
Vue générale d'un culot obtenu par la technique de purification.
Les suspensions de parasites sont riches et homogènes.
Micrographie électronique X 10000

Figure 4 :

Fort grossissement d'un parasite qui paraît avoir conservé son intégrité ultrastructurale.

cd = corps dense
n = noyau
mi = mitochondrie
h = haplosporosome

micrographie électronique X 62500



2. Anticorps monoclonaux

Des anticorps monoclonaux spécifiques de B.ostreae ont été obtenus (ROGIER, en préparation) selon la technique d'hybridation lymphocytaire de KOLHER et MILSTEIN (1975), schématisée dans la figure 5.

III - HEMOCYTES

1. Prélèvement

Les huîtres sont ouvertes par section du ligament et du muscle adducteur. Cette opération doit être effectuée avec soin afin de ne pas perforer la cavité péricardique. Il est ensuite possible de ponctionner à la seringue, directement dans cette cavité, 200 à 500 µl d'hémolymphe chez les huîtres plates et environ 1 ml chez les huîtres creuses.

2. Séparation

Les hémocytes prélevés hors de l'organisme présentent une forte tendance à l'agrégation spontanée, ce qui constitue un problème pour toute technique de séparation. Afin de la minimiser, le prélèvement d'hémolymphe est immédiatement dilué 3 fois dans une solution modifiée d'Alsever (S.M.A.) : glucose : 20.8 g/l ; citrate de sodium : 8 g/l ; EDTA : 3.36 g/l ; Tween 80 : 100 µl/l. L'osmolarité est ajustée à 1000 mosm à l'aide de chlorure de sodium et le pH est ajusté à 7.5.

La technique de séparation (BACHERE et al., 1988) comporte deux étapes. Les cellules sont d'abord soumises à une centrifugation isopycnique sur gradient discontinu de Percoll (10, 20, 30, 40, 50, 60 et 70 % volume à volume) isotonique à la S.M.A. Les fractions sédimentées à chaque interface sont recueillies séparément à la seringue. Les cellules des interfaces

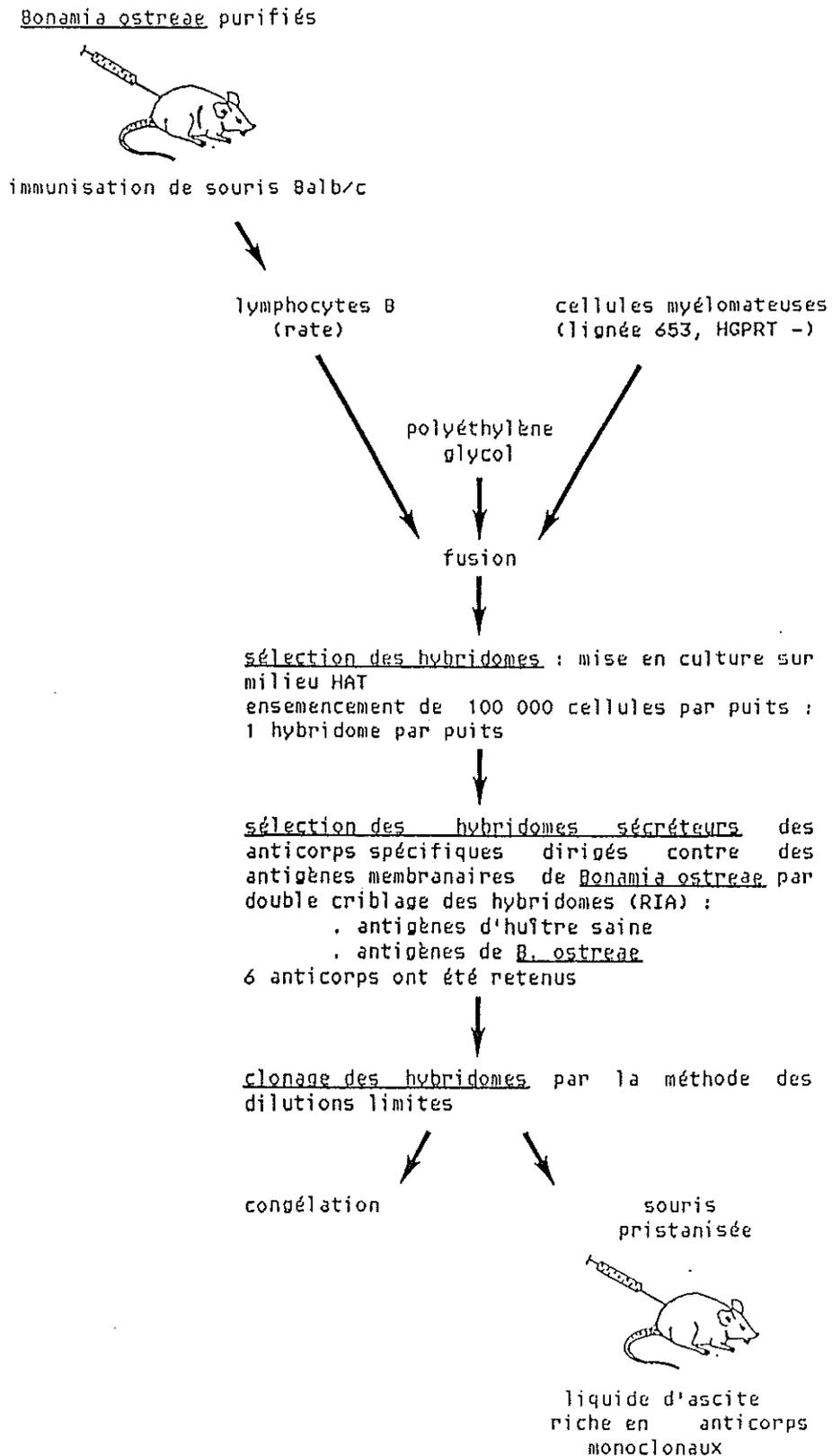


Figure 5 : Protocole d'obtention des anticorps monoclonaux spécifiques de Bonamia ostreae.

50-60, 60-70 % et le culot sont regroupés dans la S.M.A., puis déposés sur un coussin de saccharose pour éliminer le Percoll résiduel. Après centrifugation pendant 15 mn, le culot est dilué dans la S.M.A., puis préparé pour la microscopie électronique.

Les cellules sédimentées aux interfaces 20-30, 30-40, 40-50 % sont diluées dans la S.M.A. et concentrées par centrifugation. Ce dernier culot est alors soumis à un fractionnement par élutriation en accord avec le nomogramme présenté dans la figure 6.

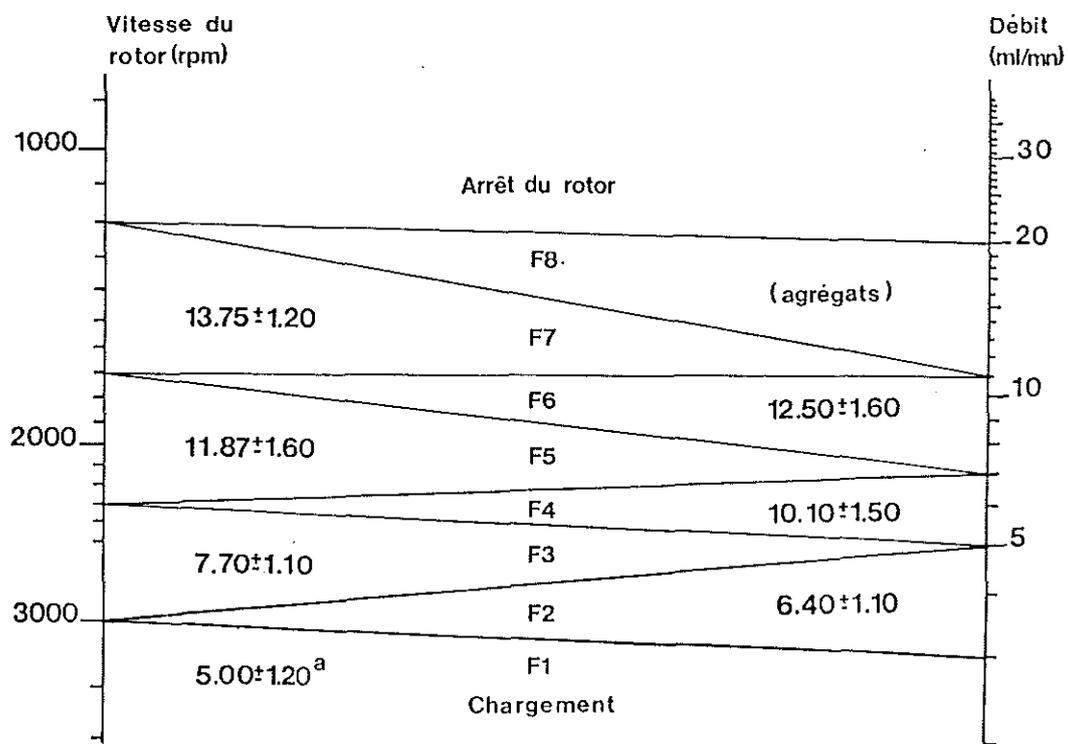


Figure 6 : Nomogramme de l'élutriation des hémocytes de C. gigas
 F1 à F8 : différentes fractions élutriées
 a : diamètre moyen des hémocytes dans chaque fraction

Les cellules des différentes fractions élutriées sont observées en microscopie photonique. Leur viabilité est étudiée par le test d'exclusion du bleu Trypan et le test à l'acridine orange -bromure d'éthidium. Elles sont ensuite traitées pour la microscopie électronique.

3. Numération des hémocytes

Cent cinquante μ l d'hémolymphe sont prélevés dans une seringue contenant 600 μ l de S.M.A.. Cette dilution est ensuite fixée à raison de 1 volume de fixateur pour 4 volumes de dilution dans du fixateur de Carson (formaldéhyde à 40 % filtré : 100 ml, Na H₂ P₀₄ : 18.5 g, Na OH : 5 g, eau distillée : 900 ml). Le volume final est ajusté à 40 ml avec la S.M.A.

Le nombre de cellules contenues dans 1 ml de la dilution finale est estimé par comptage au compteur Coulter (Coultronics) avec une sonde dont l'orifice a un diamètre de 50 μ m. L'échelle de taille des cellules prises en compte est fixée de 4 à 20 μ m, sur la base des tailles estimées des hémocytes. Les chiffres obtenus, multipliés par l'inverse du taux de dilution (soit 1/266) représentent le nombre d'hémocytes par ml d'hémolymphe.

IV - INFECTIONS EXPERIMENTALES

1. Culture cellulaire

Pour la mise en culture d'hémocytes, la ponction d'hémolymphe doit être précédée d'une désinfection des tissus, car ceux-ci, en contact direct avec l'environnement, sont contaminés par des bactéries, des levures, des protozoaires susceptibles de se développer ultérieurement. Pour éliminer les contaminants, les tissus de l'huître sont lavés plusieurs fois à l'eau de mer stérile additionnée de 1 % de Tween 80.

Après la ponction, les hémocytes sont déposés sur des lamelles histologiques stériles placées en boîte de culture Nunc (35 mm) à raison de 50 000 par lamelle, ou dans des tubes Eppendorf. La durée minimum nécessaire à leur fixation est de 30 mn.

2. Infection in vitro

Les hémocytes sont infectés avec des suspensions purifiées et quantifiées de B.ostreae selon le protocole mis au point par MOURTON (1987) : la multiplicité d'infection est de 5 parasites par hémocyte, le délai de contact nécessaire à la pénétration de B.ostreae, déterminé expérimentalement est de 30 mn. Au terme de ce délai, les cultures sont lavées avec de l'eau de mer filtrée (EMF) afin d'éliminer les parasites extracellulaires résiduels. Elles sont ensuite traitées pour être examinées en microscopie photonique et électronique. Le plan des séries expérimentales réalisées est présenté dans la figure 7.

V - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

1. Microscopie photonique

1.1. Préparation d'hémocytes

Deux techniques de confection des préparations pour la détermination des types hémocytaires sont testées :

- la technique des frottis humides (PODER, 1980 ; AUFFRET, 1985) qui consiste à laisser s'étaler spontanément les cellules d'une goutte d'hémolymphe sur une lame de verre pendant 15 mn, à laver à l'eau de mer filtrée, puis à fixer au méthanol,

Série Exp. N°	Animaux	Traitement des hémocytes	Traitement des parasites	
1	10 Oe + 10 Cg	0	0	Incubation 2 h, puis lavage et M.P.
	10 Oe + 10 Cg	0	Préincubation avec 20B2 + 15C2 (100µg/ml) puis lavage	
2	10 Oe + 10 Cg	0	0	Incubation 2 h, puis lavage et M.P.
	10 Oe + 10 Cg	Lavage à l'ENF	0	
3	10 Oe + 10 Cg	Lavage à l'ENF	0	Incubation 2 h, puis lavage et M.P.
	10 Oe + 10 Cg	DMSO 1%, 1h, lavage ENF	0	
	10 Oe + 10 Cg	Cytoch.B (10µg/ml) dans DMSO 1%, 1h, lavage ENF	0	
	10 Oe + 10 Cg	Lavage ENF	Cytoch.B (10µg/ml) dans DMSO 1%, 1h, lavage ENF	
4	10 Oe + 10 Cg	Lavage ENF	0	M.P.
	10 Oe + 10 Cg	Lavage ENF, incubation dans mélange glucose, mannose, fucose, N-acétyl glucosamine, N-acétyl galactosamine, 0, 1M, 1h, puis lavage	0	
	10 Oe + 10 Cg	Lavage ENF	Incubation 1h dans mélange de sucres puis lavage	
	10 Oe + 10 Cg	Lavage ENF Incubation 1h dans mélange de sucres puis lavage	Incubation 1h dans mélange de sucres puis lavage	

Figure 7 : Plan des séries expérimentales d'infection in vitro

- la technique des empreintes de coeur : des appositions de ventricule (partie musculaire de couleur blanche) sont effectuées sur la lame de verre. Elles contiennent essentiellement des hémocytes qui sont également fixés au méthanol.

1.2. Colorations

La coloration cytologique rapide à l'aide du kit Hémacolor Merck est testée par rapport à la technique de référence ou May Grünwald Giemsa. Les résultats obtenus étant équivalents, c'est la variante rapide à l'Hémacolor qui est utilisée en raison de sa grande simplicité d'emploi.

1.3. Primocultures d'hémocytes

Les cellules cultivées sur lamelles histologiques sont lavées, fixées au méthanol, colorées à l'Hémacolor. La lamelle est alors retournée sur une lame histologique portant une goutte de milieu de montage. Ces préparations permettent la détermination des types cellulaires et la quantification des parasites intracellulaires qui apparaissent auréolés d'un halo clair.

2. Microscopie électronique à transmission

2.1. Caractérisations ultrastructurales

Les cellules en suspension sont fixées pendant 4 heures à 4°C. Le fixateur est une solution de glutaraldéhyde à 2 % dans du tampon cacodylate de sodium-acide chlorhydrique 0.1 M. L'osmolarité est ajustée à 1000 mOsm avec du saccharose. Après lavage en tampon saccharose et centrifugation, intervient une post-fixation par l'acide osmique à 1 % en tampon chlorure de sodium pendant 30 mn. Les cellules lavées sont ensuite immobilisées dans une solution d'agarose à 1 % (agarose Low Gel Temperature Bio Rad). Après centrifugation et solidification de l'agarose,

le culot de cellules peut être traité comme un tissu. La déshydratation et l'imprégnation dans l'Epon 812 se pratiquent à l'aide d'un automate à inclusion (Ultraprocesseur LKB).

Après polymérisation des blocs, des coupes ultra-fines d'une épaisseur de 60 à 90 nm sont réalisées au couteau diamant et contrastées par l'acétate d'uranyle aqueux (30 mn à 40°C) et le citrate de plomb (1 mn 30 à 20°C) au moyen d'un automate de type Carlsberg (Ultrostainer LKB).

2.2. Caractérisations enzymatiques

2.2.1. Phosphatases acides

La fixation primaire est pratiquée à l'aide du fixateur utilisé pour la morphologie. Après lavage en tampon, les cellules sont incubées dans le milieu de Novikoff (1963) :

. cytidine 5'-monophosphate (CMP)...	: 25 mg
. eau distillée.....	: 12 ml
. tampon acétate 0.05 M pH 5.0.....	: 10 ml
. nitrate de plomb à 1 %.....	: 3 ml

L'osmolarité du milieu est ajustée à 1000 mOsm avec du saccharose. L'incubation dure 1h 30 à 37°C. Elle est suivie d'un rinçage au tampon acétate-saccharose, puis cacodylate-NaCl. Les cellules sont alors post-fixées à l'acide osmique, les inclusions en agarose et en Epon 812 étant pratiquées comme précédemment. Les coupes ultra-fines sont observées sans contraste.

2.2.2. Estérases non spécifiques

La fixation primaire est effectuée comme pour la morphologie. Les cellules sont ensuite lavées au tampon cacodylate 0.1 M contenant 20 % de

diméthylsulfoxyde (DMSO), puis incubées 30 mn dans le milieu de Hanker (1972), à 4°C, préparé comme indiqué ci-dessous.

Dissoudre 2.5 mg de 2-thiolacétoxybenzanilide (TAAB) dans 0.1 ml d'acétone et agiter au Vortex, puis ajouter dans l'ordre avec agitation magnétique :

. acétate de sodium 0.8 %.....	7.9 ml
. acide acétique.....	0.25 ml
. citrate de sodium 2.9 %.....	0.60 ml
. sulfate de cuivre 0.75 %.....	1.25 ml
(goutte à goutte)	
. ferricyanure de potassium 0.17 %.....	1.25 ml
(goutte à goutte)	

Le pH est ajusté à 5.5-5.6. Puis le milieu est refroidi à 4°C et filtré sur papier rapide. Les cellules sont ensuite lavées à l'eau distillée refroidie puis incubées 20 mn à 4°C dans une solution contenant 20 mg de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) pour 10 ml de tampon acétate 0.05 M pH 5.6.

Après lavage à l'eau distillée à 4°C, les cellules sont osmiées incluses en agarose et Epon. Les coupes ne sont pas contrastées.

2.2.3. Peroxydases

La fixation primaire est identique à celle préconisée pour la morphologie. Le milieu original à la DAB de Graham et Karnovsky (1966) est modifié par adjonction de saccharose (20 %) :

. 3,3'-diaminobenzidine, tétra HCl.....	5 mg
. tampon Tris-HCl 0.05 M pH 7.6.....	10 ml
. H ₂ O ₂	0.1 ml

L'incubation dure 30 mn à température ambiante, puis les cellules sont lavées, post-fixées et incluses. Les coupes sont observées contrastées ou non.

Les témoins suivants sont réalisés : milieu complet sans DAB, milieu sans H₂ O₂, milieu complet plus KCN 0.01 M, milieu complet plus 3-amino-1,2,4 triazole 0.01 M.

2.2.4. Catalase

Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour la peroxydase. Les cellules sont incubées dans le milieu de Novikoff et Goldfisher (1969), additionné de 20 % de saccharose :

. 3,3'-diaminobenzidine tétra HCl.....	20 mg
. tampon 2-amino-2 méthyl-1.3, propanediol 0.05 M pH 10.0.....	9.8 ml
. H ₂ O ₂	0.2 ml

Le pH est ajusté à 9.0 et la réaction pratiquée à température ambiante pendant 1 h.

Un témoin est effectué avec un milieu complet contenant du 3-amino-1, 2,4-triazole 0.01 M.

2.2.5. NADH oxydase (BRIGGS et al., 1986)

Les cellules ne sont pas fixées avant incubation. Elles sont lavées à 4°C dans un tampon Tris-maléate 0.1 M, pH 7.5, contenant 20 % de saccharose, puis préincubées 10 mn à 37°C dans le même tampon contenant en outre du 3-amino-1,2,4-triazole (1 mM). Après centrifugation, ce tampon est remplacé par le milieu d'incubation (20 mn à 37°C) :

. tampon Tris-maléate 0.1 M pH 7.5.....	9.89 ml
. 3-amino-1,2,4-triazole 1M.....	100 µl
. Ce Cl3 1M.....	10 µl
. αNADH (Sigma).....	5.05 mg

Le pH du milieu d'incubation doit être contrôlé et ajusté à 7.5 si nécessaire. D'autre part, ce milieu nécessite une filtration sur membrane Millipore 0.45 µm afin d'éliminer la petite quantité de cérium qui précipite à pH 7.5.

Après lavage, les cellules sont fixées au glutaraldéhyde, post-fixées à l'osmium, puis incluses et coupées suivant les procédures habituelles. Les coupes ne sont pas contrastées.

2.3. Immunomarquage

2.3.1. Cryo-ultramicrotomie

Le fixateur est un mélange glutaraldéhyde 0.5 % paraformaldéhyde 2 % dans un tampon phosphate de Sørensen 0.1 M-saccharose. Les parasites sont fixés 1h à température ambiante, puis lavés. Après centrifugation, ils sont resuspendus dans de la gélatine à 10 % à 37°C puis, centrifugés à nouveau. Après refroidissement de la gélatine, il peut être fait avec le culot de très petits blocs (0.5 x 0.5 x 0.5 mm) que l'on immerge dans le fixateur pendant 30 mn. Ces blocs sont ensuite infusés dans du saccharose 2.3 M en tampon de Sørensen pendant au moins 30 mn. Ils sont montés sur les porte-blocs du cryotome et congelés par immersion dans l'azote liquide, puis rapidement transférés dans la chambre du microtome refroidie à -110°C. Les coupes ultra-fines (100 nm) se font à sec, sur des couteaux de verre confectionnés suivant la méthode de cassure symétrique développée par TOKUYASU et UKAMARA (1959) et plus récemment par GRIFFITHS et al. (1983). Elles sont récupérées avec une anse contenant du saccharose 2.3 M en tampon

phosphate, déposées sur des grilles collodionnées et carbonées. Les grilles sont placées avec la face qui porte la coupe vers le bas sur un film de gélatine à 2 % en tampon phosphate, maintenu solide sur de la glace fondante. Elles peuvent y rester quelques heures ou éventuellement toute la nuit, jusqu'au démarrage de la réaction d'immunomarquage. Juste avant immunomarquage, la gélatine est liquifiée à température ambiante ; les grilles portant les coupes ultra-fines sont laissées 10 mn sur la gélatine liquide afin de permettre la diffusion du saccharose, et d'éviter l'adsorption non spécifique des anticorps.

2.3.2. Préparation de la protéine A-gold

La solution d'or colloïdal est préparée par réduction de l'ion Au 3+ au moyen d'un mélange citrate-acide tannique (MUHLPFORDT, 1982 ; SLOT et GEUZE, 1985). La taille des particules d'or colloïdal est inversement proportionnelle à la quantité d'acide tannique à 1 % utilisée.

Pour 100 ml de solution d'or colloïdal et pour des particules de 10 nm de diamètre, deux solutions sont préparées :

Solution A : (chlorure d'or)

. H Au Cl ₄ à 1 %.....	1 ml
. eau distillée.....	79 ml

Solution B : (mélange réducteur)

. citrate de tri-sodium à 1 %.....	4 ml
. acide tannique à 1 %.....	1 ml
. eau distillée	15 ml

Les solutions A et B sont chauffées à 60°C, puis B est ajoutée à A sous agitation magnétique. Le mélange est ensuite porté à ébullition pendant 1 mn. Après refroidissement, le pH est ajusté à 6.0. Après détermination de la plus faible concentration de protéine A nécessaire pour

stabiliser la solution d'or colloïdal (HORISBERGER et ROSSET, 1977), le couplage est effectué en ajoutant la protéine A à la solution d'or colloïdal à la concentration de stabilisation et sous agitation magnétique. Après 15 mn, le pH est ajusté entre 7 et 7.5, et la solution est additionnée de 1 % de sérum albumine bovine (BSA). Le complexe protéine A-or colloïdal est ensuite purifié par centrifugation (45 mn à 50 000 g, à l'aide d'un rotor SW4 (Ti)). Le culot est remis en suspension dans 4 ml de tampon phosphate de Sørensen 0.1 M.

2.3.3. Immunomarquage

Les grilles sont transférées, face portant les coupes vers le bas, sur des gouttes de réactifs déposées sur un ruban de Parafilm selon le protocole suivant :

. 3 x 10 mn sur un tampon phosphate (PBS) :

Na ₂ H PO ₄ , 2 H ₂ O.....	1.44/l
Na H ₂ PO ₄ , H ₂ O.....	0.23g/l
NaCl.....	8g/l
KCl.....	0.2g/l

contenant de la glycine 0.02 M afin de bloquer les groupements aldéhydes libres provenant de la fixation.

. 30 mn dans une solution d'anticorps monoclonal 20B2 à 25 µg/ml, dans du PBS contenant 1 % de BSA,

. 4 x 1 mn dans du PBS-BSA 1 %,

. 30 mn dans la solution de protéine A-gold diluée dans du PBS-BSA 1 % de façon à ce que sa densité optique à 520 nm soit 0.15,

. 4 x 5 mn dans du PBS-BSA 1 %.

2.3.4. Contraste à l'uranyle et enrobage à la méthylcellulose

Cette méthode, introduite par TOKUYASU (1980) et modifiée par GRIFFITHS et al. (1984), permet une bonne mise en évidence des membranes, ainsi que la conservation des coupes. Les grilles sont déposées sur des gouttes des solutions suivantes :

- . 4 x 1 mn sur eau distillée,
- . 5 mn sur un mélange volume à volume d'acide oxalique 3 M et d'acétate d'uranyle aqueux à 4 % pH 7.5,
- . 3 x quelques secondes sur eau distillée,
- . 10 mn sur une solution à 2 % de méthylcellulose de viscosité égale à 25 centipoises, contenant 0.1 % d'acétate d'uranyle aqueux sur de la glace pilée.

La grille est ensuite pêchée sur cette solution à l'aide d'une anse. L'excès de liquide est enlevé avec un papier filtre. L'ensemble grille-anse est séché, puis la grille est détachée. Elle est prête à être observée.

VI - CHIMILUMINESCENCE

1. Préparation des hémocytes

1.1. Population totale des hémocytes

Des échantillons d'hémolymphe sont prélevés individuellement chez les deux espèces d'huîtres, comme précédemment décrit, volume à volume dans de la solution modifiée d'Alsever. Les hémocytes sont immédiatement comptés à la cellule de Malassez, puis remis en suspension dans de l'eau de mer filtrée.

1.2. Hémocytes séparés

Les hémocytes, dilués au $\frac{1}{2}$ dans de la S.M.A. sont séparés selon la première étape du protocole décrit au paragraphe 2, chapitre III.

Les deux populations, hyalinocytes et granulocytes sont dénombrées et immédiatement remises en suspension dans de l'eau de mer filtrée.

Afin de contrôler un effet possible du Percoll sur l'activité phagocytaire des hémocytes, un échantillon d'hémolymphe totale est dilué, volume à volume, d'une part dans du Percoll à la concentration de 70 %, d'autre part dans de la S.M.A.. Ces échantillons sont conservés 1h 30 dans ces milieux avant d'être utilisés pour des essais de chimioluminescence.

2. Préparation du zymosan

Quarante mg de parois de levures (zymosan A, Sigma U.S.A.) sont mis en suspension dans 10 ml d'E.M.F. et chauffés à 100°C pendant 30 mn. Les particules de zymosan sont lavées deux fois, centrifugées (2000 g, 15 mn) puis remises en suspension dans de l'E.M.F.. Les aliquots, conservés à -20°C sont décongelés et dénombrés juste avant utilisation.

3. Bonamia ostreae

Les parasites purifiés sont utilisés vivants ou tués par chauffage à 60°C pendant 30 mn.

4. Essais de chimioluminescence

L'émission de lumière par les hémocytes des deux espèces est mesurée au compteur à scintillation liquide (Packard, TRI-CARB 2000 CA). Des comptages de 0.5 mn sont effectués sur chaque échantillon à 9 mn d'intervalle et pendant 4 à 5 heures. L'activité des hémocytes est exprimée en coups par minute.

4.1. Protocole

Tous les essais sont effectués selon le protocole suivant :

- 2×10^5 hémocytes sont dilués dans de l'E.M.F. de façon à ce que le volume final soit de 2 ml par flacon,
- du Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione), amplificateur de l'émission de lumière, est ajouté à chaque échantillon à la concentration finale de 10^{-4} M, à partir d'une solution stock 1 M dans du DMSO, que l'on dilue dans l'E.M.F. extemporanément.
- l'activité de base est alors mesurée, puis les stimulants de l'activité phagocytaire (zymosan ou B.ostreae vivant ou tué) sont ajoutés aux suspensions hémocytaires, et la chimioluminescence est enregistrée.

4.2. Essais d'inhibition

L'effet inhibiteur de la cytochalasine B (1.5. $\mu\text{g/ml}$) et de la superoxyde dismutase (80 $\mu\text{g/ml}$) est étudié en ajoutant ces réactifs avant stimulation par le zymosan. L'effet de l'azide de sodium et du cyanure de potassium est déterminé en les ajoutant au moment où le pic d'activité est atteint.

RESULTS

I - ANALYSE MORPHOLOGIQUE, BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE DES HEMOCYTES

1. Morphologie en microscopie photonique

Pour cette étude, sans qu'il soit possible d'avancer une explication rationnelle, la cytologie est bien meilleure avec les hémocytes préparés par empreinte de coeur (fig.8 et 9, Pl.II) qu'avec les préparations de frottis humides.

Trois types d'hémocytes peuvent être identifiés dans les deux espèces :

- les cellules de type I, de taille homogène (environ 10 μm) ont un rapport nucléocytoplasmique faible. Leur cytoplasme, chromophile, contient de nombreuses granulations brunâtres dont une affinité acidophile, basophile ou neutrophile apparaît difficile à préciser en raison de leur autopigmentation (fig.10, Pl.II).
- les cellules de type II de taille homogène (environ 15 μm), à rapport nucléocytoplasmique faible ont un noyau souvent excentré. Leur cytoplasme se colore en gris rosé ou rose pâle et ne contient pas de granulation (fig.11, Pl.II).
- les cellules de type III sont beaucoup plus hétérogènes en taille (5 à 10 μm). Le rapport nucléocytoplasmique est élevé, mais variable. Le cytoplasme, sans granulation se colore en bleu plus ou moins soutenu (fig.12, Pl.II).

PLANCHE II

Morphologie des hémocytes d'Ostrea edulis et de Crassostrea gigas
en microscopie photonique : appositions de coeur.

Figure 8 :

Hémocytes d'Ostrea edulis

t.I : Cellules de type I, à rapport nucléocytoplasmique faible.
Leur cytoplasme contient des granulations autopigmentées.

t.II : Cellules de type II, à rapport nucléocytoplasmique faible.
Leur cytoplasme ne contient pas de granulation.

t.III : Cellules de type III : petites cellules à rapport
nucléocytoplasmique élevé et cytoplasme azurophile
sans granulation.

Micrographies photoniques X 400

Figure 9 :

Hémocytes de Crassostrea gigas

Figure 10 :

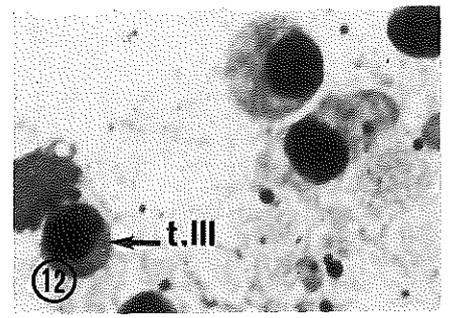
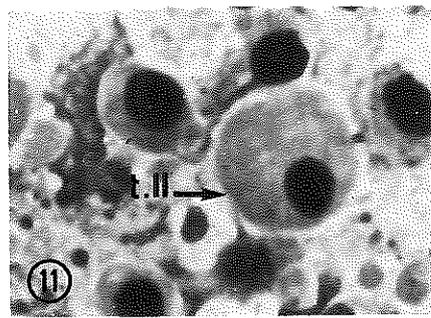
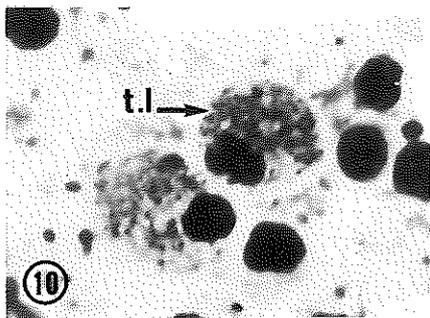
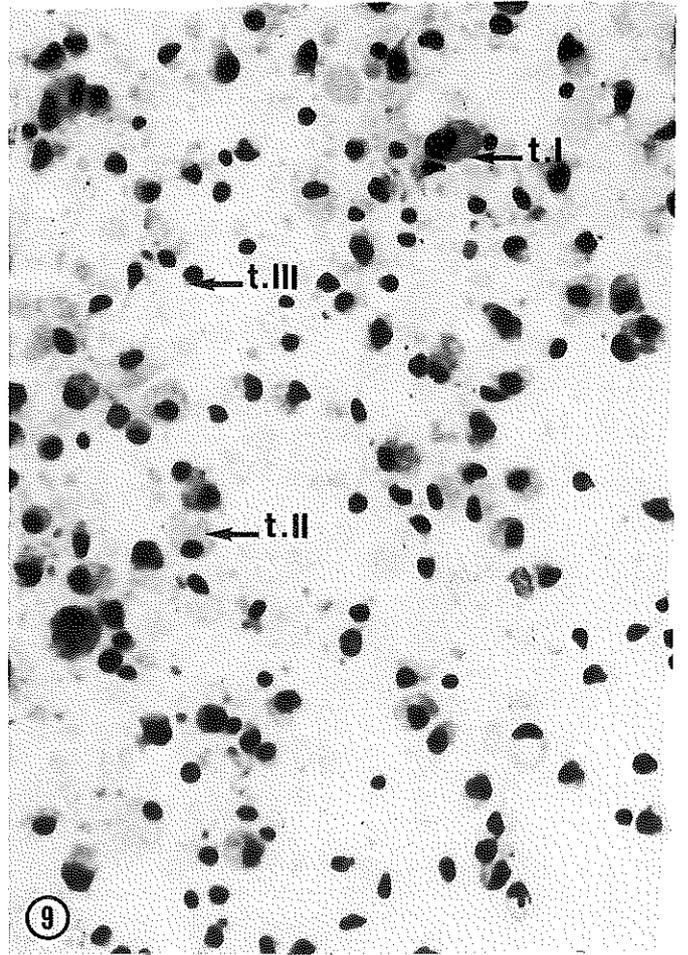
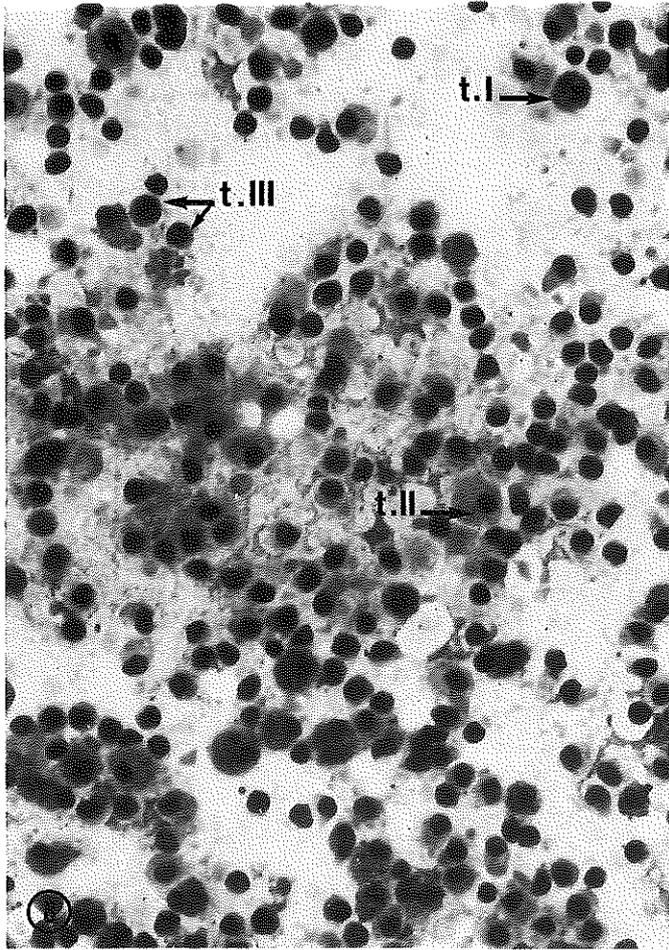
Fort grossissement d'un hémocyte granuleux de type I (O.edulis)
Micrographie photonique X 1250

Figure 11 :

Fort grossissement d'un hémocyte de type II (O.edulis)
Micrographie photonique X 1250

Figure 12 :

Fort grossissement d'un hémocyte de type III (O.edulis)
Micrographie photonique X 1250



2. Ultrastructure

2.1. Sur hémolymphe entière

Chez *O.edulis*, les hémocytes de type I apparaissent effectivement comme un type unique (fig.13, Pl.III) à contours irréguliers. Ils présentent des projections cytoplasmiques. Dans le noyau arrondi, on observe rarement un nucléole. Le cytoplasme contient quelques mitochondries, des ribosomes libres, de rares profils de réticulum endoplasmique rugueux, des vacuoles contenant un matériel granulaire assimilable à du glycogène. L'appareil de Golgi n'est pas rencontré. La caractéristique essentielle des hémocytes de type I est la présence dans le cytoplasme de granules de structure hétérogène. Certains sont uniformément denses aux électrons (fig.13, Pl.III), d'autres ont un centre clair et un cortex dense (fig.14, Pl.III), les derniers ont un centre dense et un cortex clair (fig.15, Pl.III).

Chez *C.gigas*, les hémocytes de type I ont des caractéristiques générales identiques à celles des hémocytes de type I chez *O.edulis* à l'exception des granules cytoplasmiques.

- Le type Ia (fig.16, Pl.IV) contenant des granules nombreux, sphériques, uniformément denses aux électrons et de structure amorphe, peut ainsi être identifié.
- Le type Ib (fig.17, Pl.IV) se caractérise par des granules plus ou moins sphériques uniformément clairs aux électrons.
- Un type Ic (fig.18, Pl.IV), observé assez rarement, contient à la fois des granules de type Ia et Ib.

PLANCHE III

Ultrastructure des hémocytes de type I d'Ostrea edulis sur hémolymphe entière

Figure 13 :

Hémocyte de type I contenant trois types de granules :

- . granules à cortex dense et centre clair aux électrons (gr 1)
- . granules uniformément denses aux électrons (gr2)
- . granules à centre dense et cortex clair aux électrons (gr3)

Micrographie électronique X 16000

Figure 14 :

Détail d'un granule à cortex dense et centre clair (gr1)
Micrographie électronique X 24000

Figure 15 :

Détail des granules à centre dense et cortex clair (gr3)
Micrographie électronique X 24000

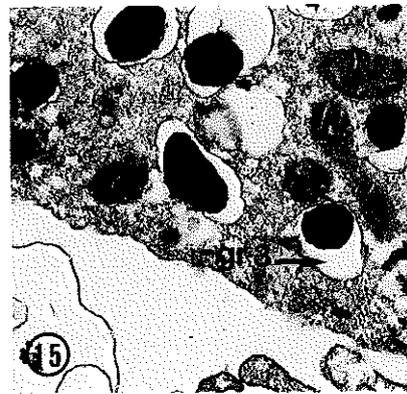
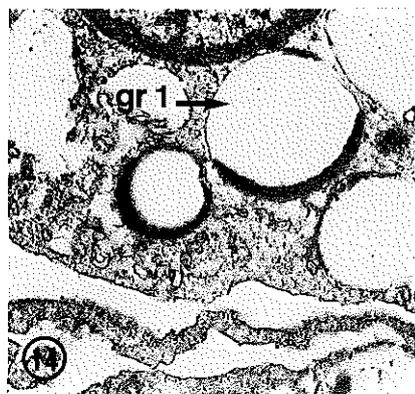
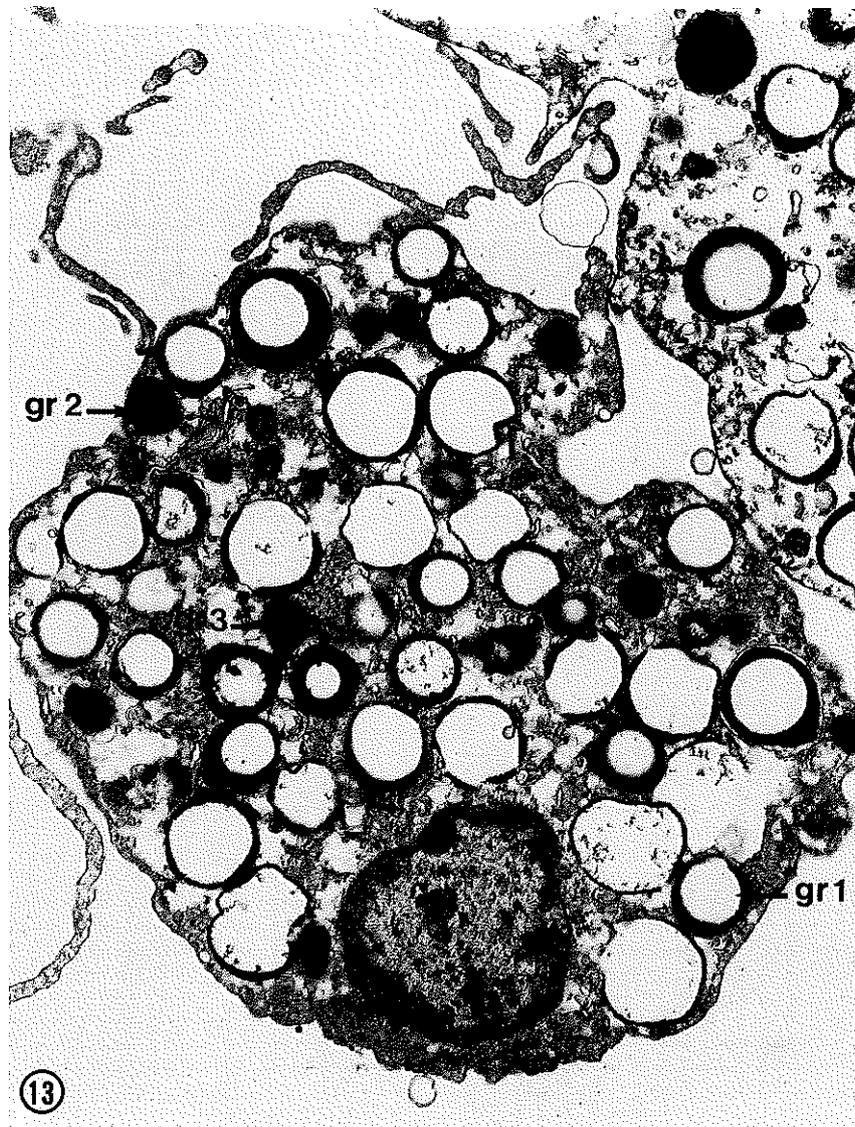


PLANCHE IV

Ultrastructure des hémocytes de type I
chez Crassostrea gigas sur hémolymphe entière

Figure 16 :

Hémocyte de type Ia contenant
de nombreux granules sphériques
uniformément denses aux électrons
(gd)
M.électronique X 20400

Figure 17 :

Hémocyte de type Ib à granules
clairs aux électrons (gc) et
quelques vacuoles contenant un
matériel assimilable à du
glycogène (gly)
M.électronique X 12500

Figure 19 :

Détail des granules denses
aux électrons entourés d'une
membrane (m)
M.électronique X 80000

Figure 18 :

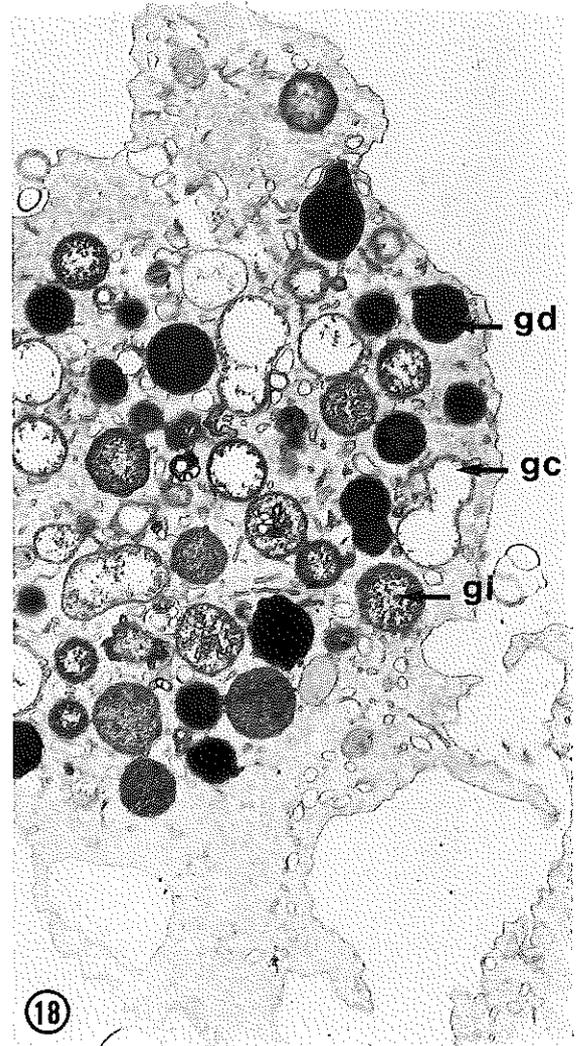
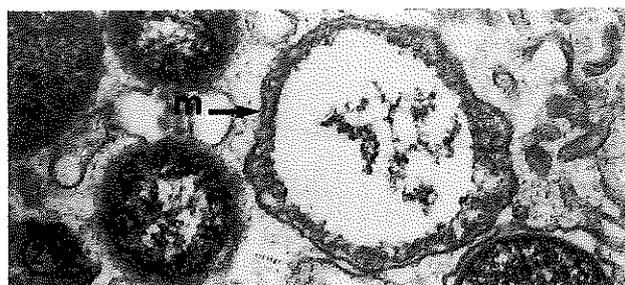
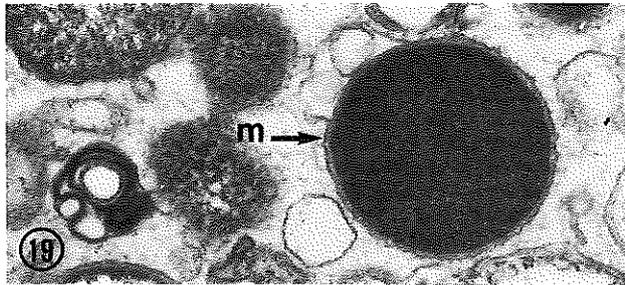
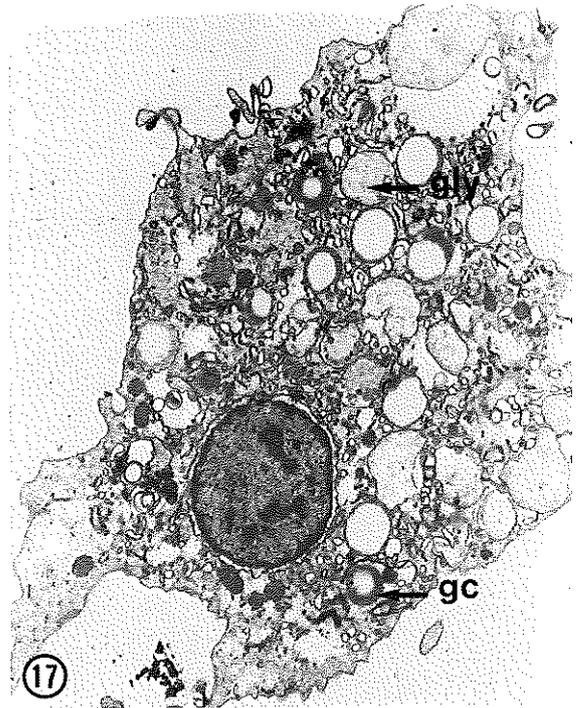
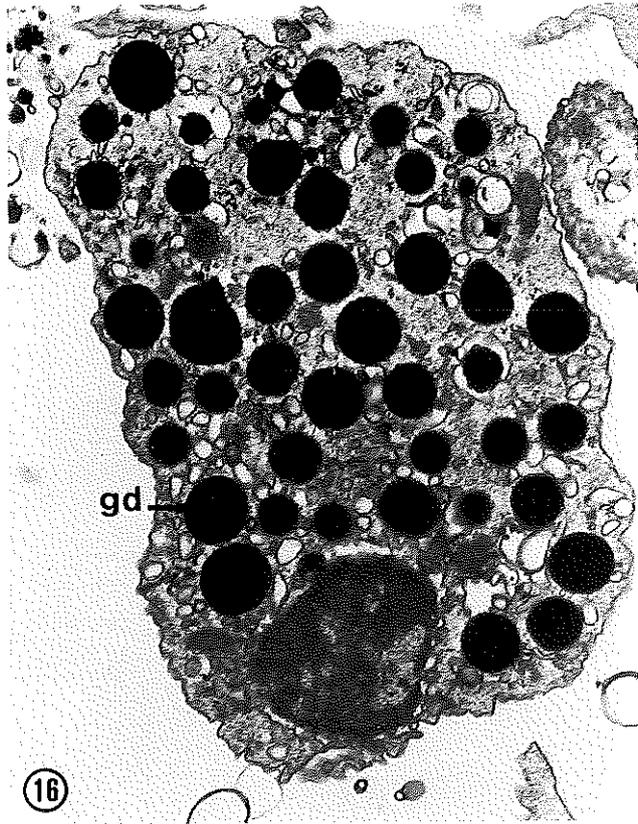
Figure 20 :

Détail des granules intermédiaires
M.électronique X 80000

Hémocyte de type Ic contenant
à la fois des granules denses
et clairs aux électrons.
Certains granules apparaissent
intermédiaires (gi)
M.électronique X 25000

Figure 21 :

Détail des granules clairs
aux électrons
M.électronique X 80000



Les hémocytes de type II se révèlent identiques dans les deux espèces (fig.22 et 23, Pl.V). Leur forme est ovoïde. Le noyau présente les mêmes caractéristiques que celui des hémocytes de type I. Le cytoplasme contient des mitochondries plus nombreuses, parfois regroupées. Un appareil de Golgi typique, ainsi que du réticulum endoplasmique rugueux sont plus fréquemment observés. Ce type cellulaire est particulièrement riche en réticulum endoplasmique lisse et comporte d'innombrables petites vésicules claires aux électrons. Quelques granules modérément denses aux électrons sont parfois présents.

La population des hémocytes de type III regroupe chez O.edulis et chez C.qiqas des cellules polymorphes, arrondies ou amoéboïdes (fig.24 et 25, Pl.VI). Le noyau présente fréquemment un nucléole. Dans le cytoplasme, on rencontre un appareil de Golgi, des mitochondries le plus souvent regroupées, du réticulum endoplasmique rugueux parfois disposé en périphérie du noyau, de nombreux ribosomes libres et pas de granulation.

2.2. Sur types cellulaires séparés de C.qiqas

2.2.1. Distribution des hémocytes dans le gradient de Percoll

L'interface 10-20 % contient quelques cellules agranuleuses et des débris cellulaires. Les deuxième et troisième bandes contiennent des cellules agranuleuses de taille variable. La quatrième bande contient un mélange de cellules granuleuses et agranuleuses. Les interfaces 50-60 % et 60-70 % contiennent une population composée à 90 % de cellules granuleuses de type Ia et Ib (fig.27 et 28, Pl.VII) impossibles à séparer. La viabilité est estimée à 90 %.

PLANCHE V

Ultrastructure des hémocytes de type II
sur hémolymphe entière

Figure 22 :

Ostrea edulis - Ce type cellulaire contient de très nombreuses vésicules (ve) claires aux électrons. Son noyau (n) présente une morphologie très similaire à celle des hémocytes de type I

Micrographie électronique X 11500

Figure 23 :

Crassostrea gigas - Sur ce cliché sont présents les typiques petites vésicules claires (ve), du réticulum endoplasmique lisse (rel), l'appareil de Golgi (Go), quelques granules cytoplasmiques (gr) modérément denses aux électrons, ainsi que des vacuoles (va) dont certaines contiennent du glycogène (gly)

Micrographie électronique X 15000

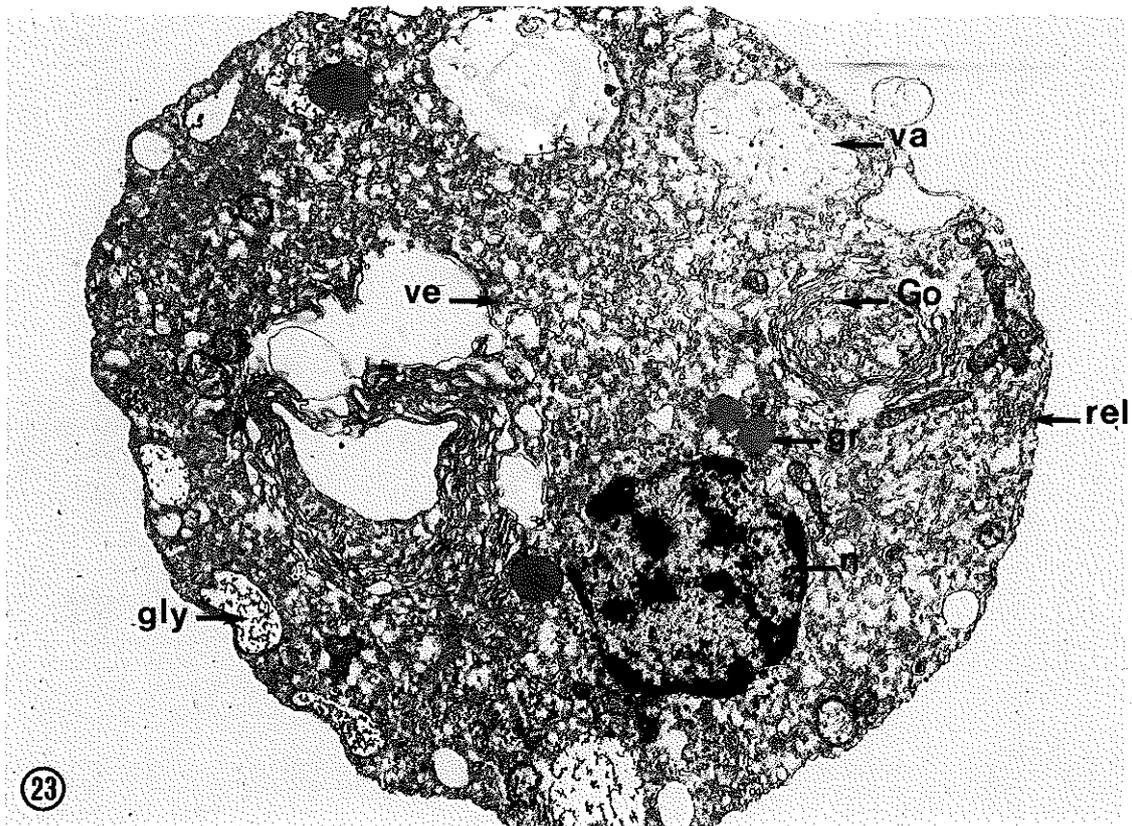
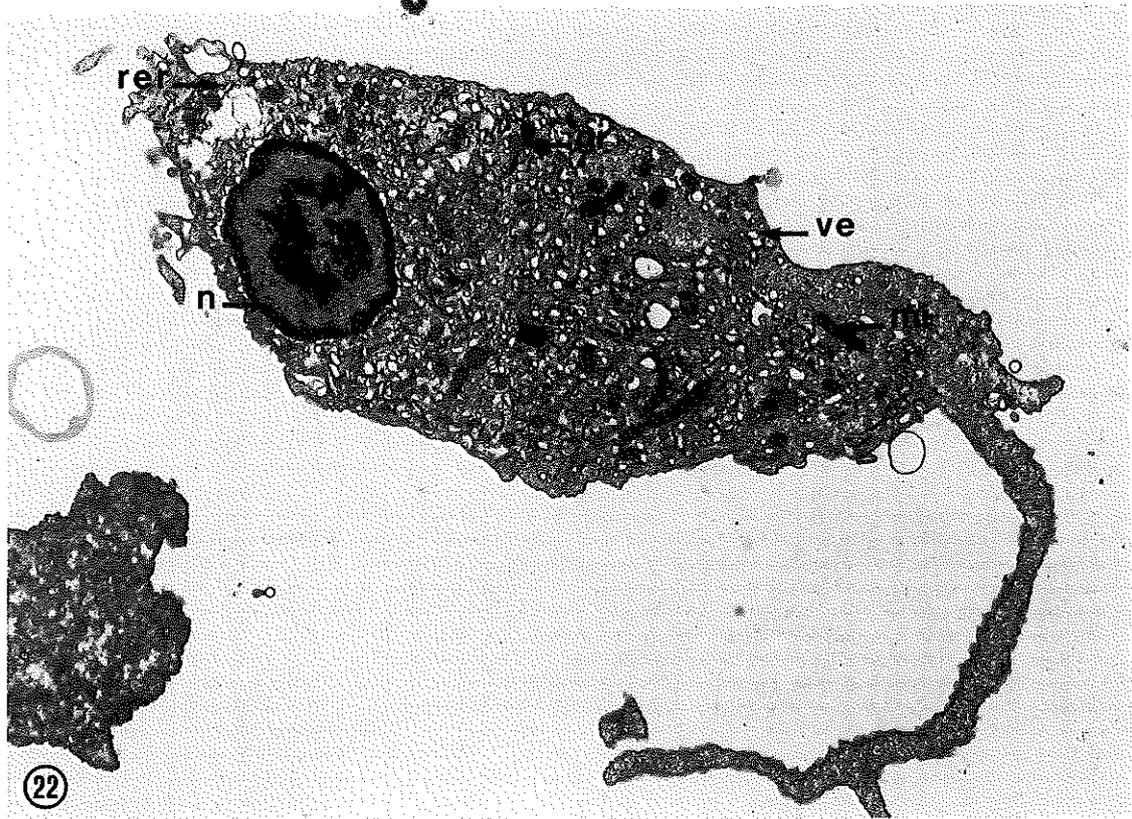


PLANCHE VI

Ultrastructure des hémocytes de type III
sur hémolymphe entière

Figure 24 :

Ostrea edulis - Il faut noter le noyau (n) relativement volumineux, des mitochondries souvent regroupées (mi), du réticulum endoplasmique rugueux (rer)

Micrographie électronique X 20000

Figure 25 :

Crassostrea gigas - (n) noyau volumineux, (mi) mitochondries. Sur cette figure sont présents un appareil de Golgi typique (Go), du réticulum endoplasmique rugueux (rer) et de nombreux ribosomes libres (ri)

Micrographie électronique X 16200

Figure 26 :

Détail des saccules de l'appareil de Golgi

Micrographie électronique X 32500

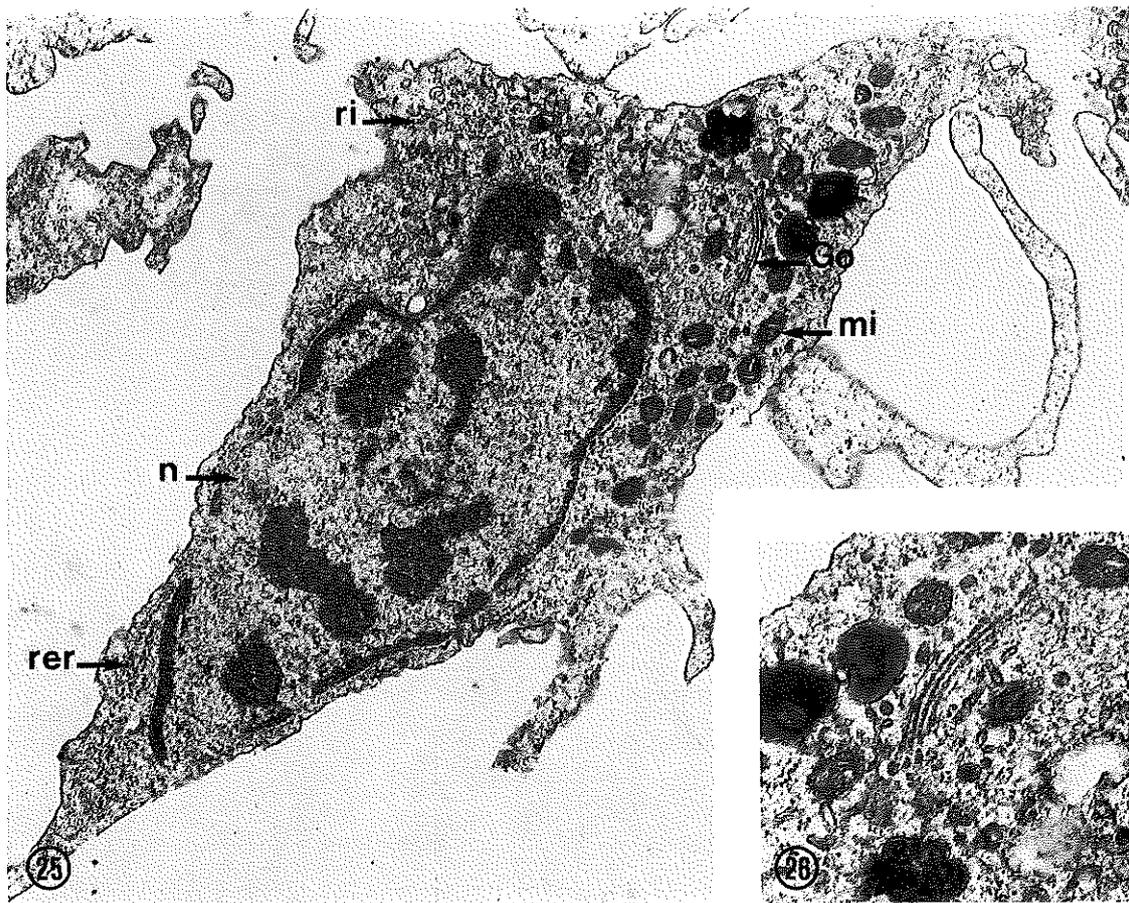


PLANCHE VII

Morphologie des types cellulaires séparés de Crassostrea gigas

Figure 27 :

Fraction regroupant
les interfaces 50-60 % et
60-70 % du gradient
de Percoll. Les hémocytes
à granulation claires
aux électrons (Ib)
y sont majoritaires
M.électronique X 5700

Figure 28 :

Autre champ de la même
fraction qui contient
un hémocyte de type Ia
(grains denses)
M.électronique X 10800

Figure 30 :

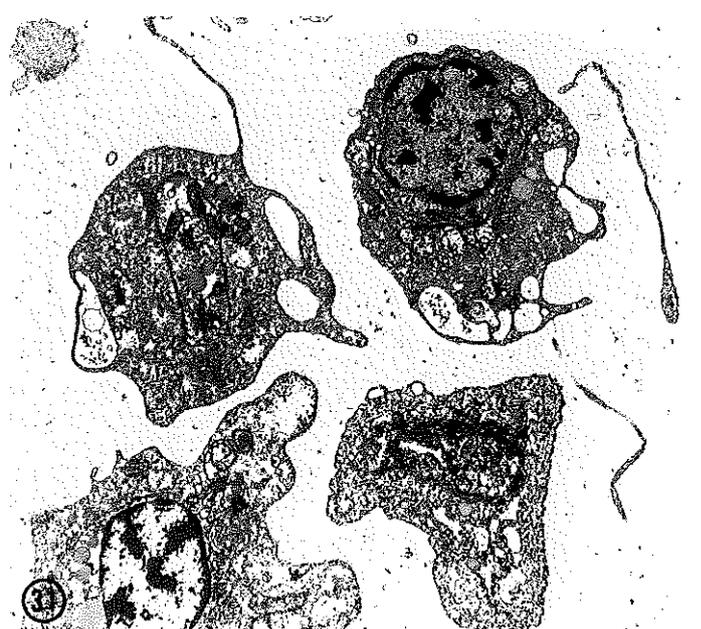
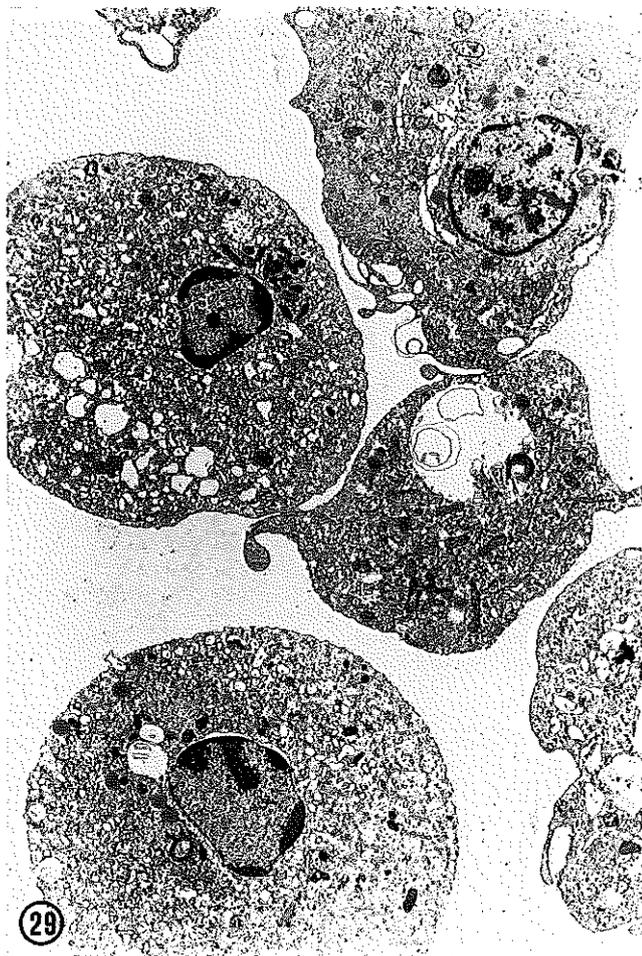
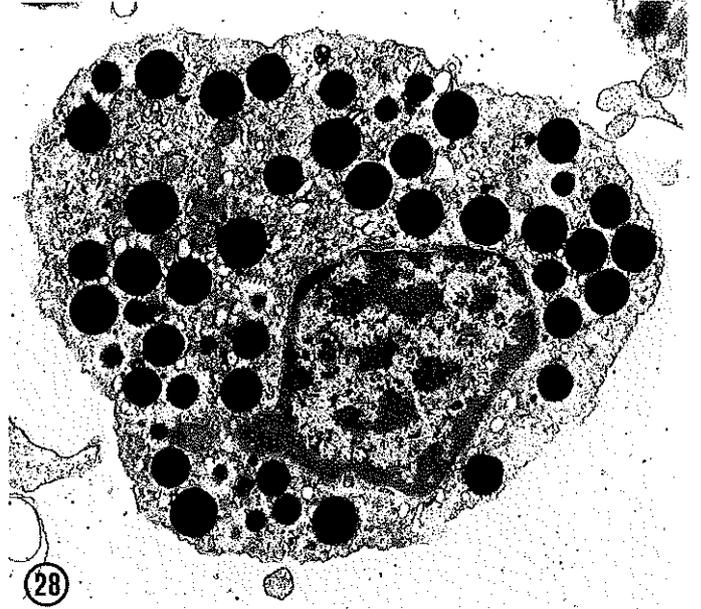
Hémocyte de la fraction
F4 élutriée
M.électronique X 10500

Figure 29 :

Hémocytes de la fraction F6
caractéristiques des fractions
élutriées F5, F6, F7.
Ils correspondent aux hémocytes
de type II
M.électronique X 3700

Figure 31 :

Hémocytes de la fraction
F1 présentant l'aspect
typique des hémocytes
de type III
M.électronique X 4500



2.2.2. Distribution des hémocytes dans les fractions éluutriées

Les hémocytes des deuxième et troisième bandes obtenues par centrifugation isopycnique sont de diamètre hétérogène. Ils sont éluutriés en huit fractions correspondant à un volume cellulaire croissant. Les hémocytes des fractions F1 et F2 ont un rapport nucléocytoplasmique élevé et des ribosomes libres (fig.31, Pl.VII). Dans les fractions F3 et F4, le cytoplasme est plus étendu et présente quelques vésicules claires aux électrons (fig.30, Pl.VII). Les cellules contenues dans les fractions F5, F6 et F7 ont un rapport nucléocytoplasmique faible, des vésicules claires aux électrons et un réticulum endoplasmique lisse étendu (fig.29, Pl.VII).

3. Détermination des hémogrammes

3.1. Numérations d'hémocytes au compteur cellulaire

Les estimations du nombre d'hémocytes par ml d'hémolymphe, effectuées sur 50 individus de chacune des deux espèces sont présentées dans les figures 32 et 33. Elles mettent en évidence une très grande variabilité individuelle quelle que soit l'espèce considérée.

L'histogramme de la figure 34 fait apparaître des différences minimes de répartition entre les deux espèces, 68 % des individus se situant entre 1 et 5×10^6 hémocytes chez O.edulis contre 64 % chez C.gigas. Il y a moins d'individus à numération basse (inférieure à 1×10^6 hémocytes/ml) chez O.edulis.

3.2. Pourcentage des différents types hémocytaires

Sur la base des données morphologiques cohérentes en microscopie photonique et électronique, les cellules sont classifiées selon trois types :

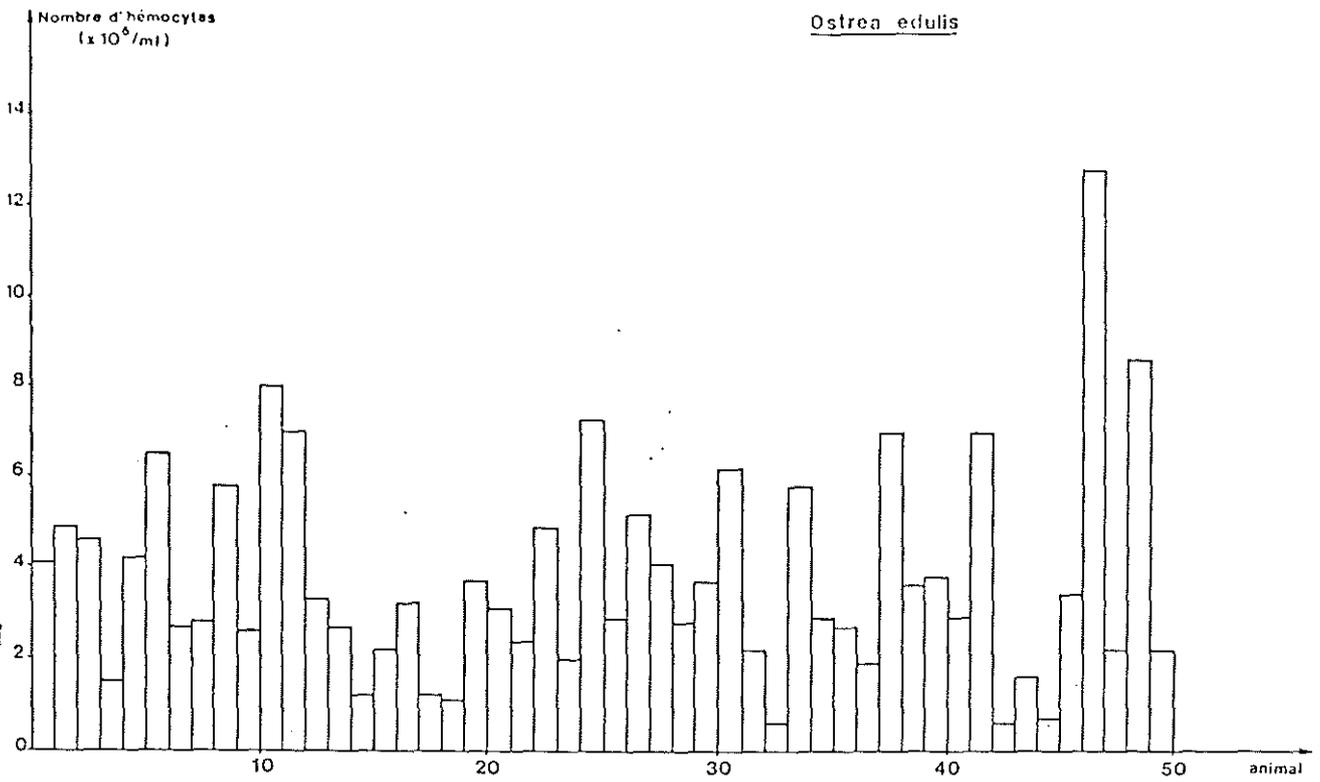


Figure 32 : Estimation du nombre d'hémocytes par ml d'hémolymphe pour 50 huîtres O. edulis

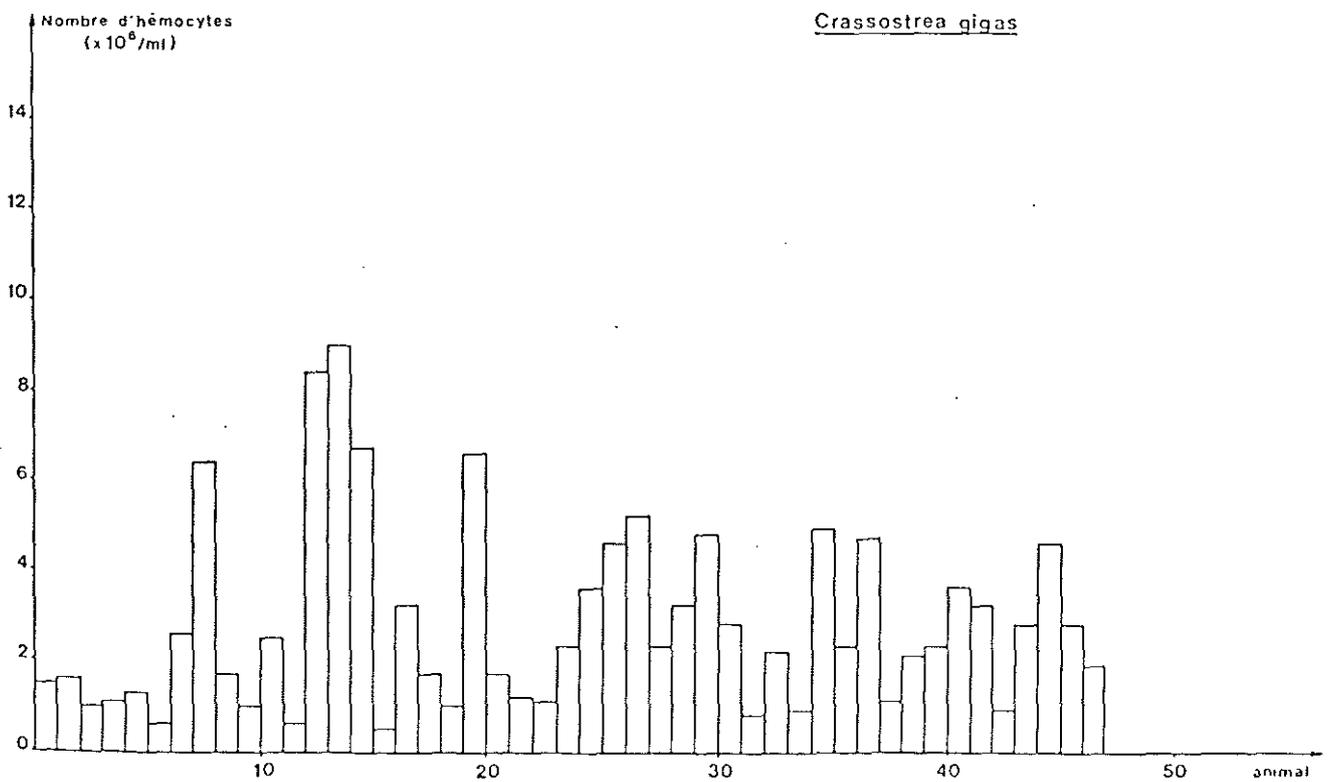


Figure 33 : Estimation du nombre d'hémocytes par ml d'hémolymphe pour 50 huîtres C. gigas

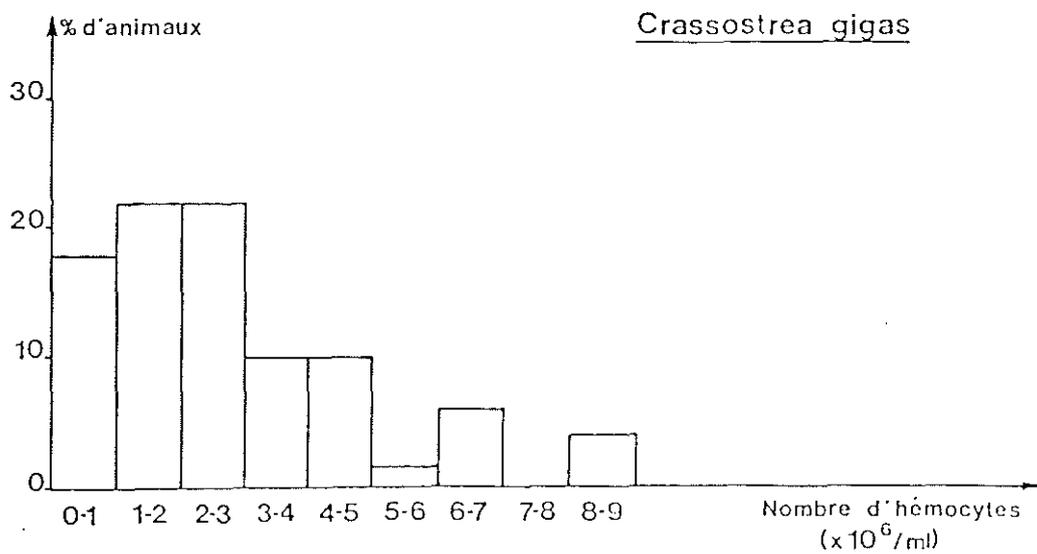
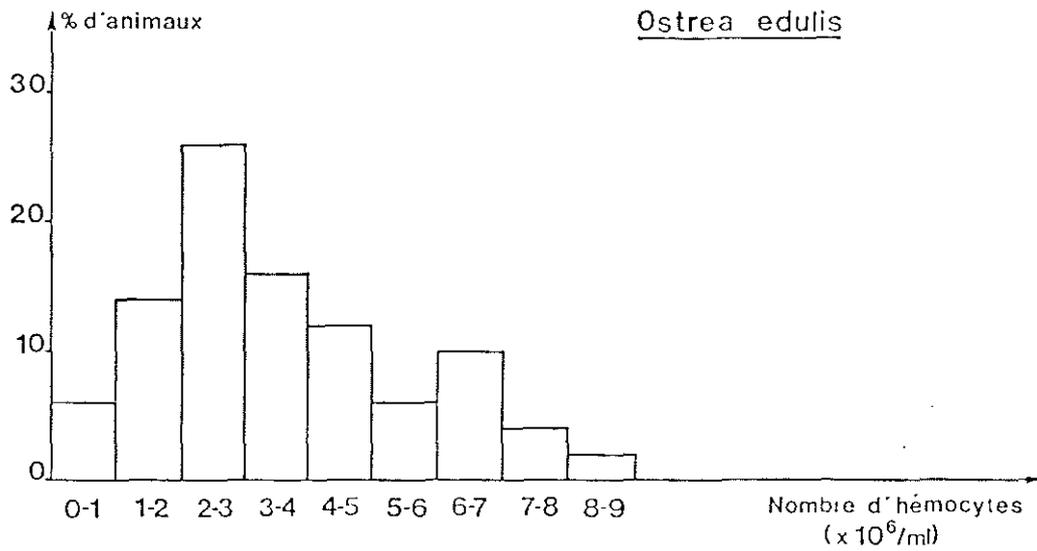


Figure 34 : Répartition en pourcentage des animaux en fonction de leur nombre d'hémocytes par ml

- granulocytes : type I unique pour O.edulis, types Ia, Ib, Ic confondus pour C.gigas.
- grands hyalinocytes : type II pour les deux espèces
- petits hyalinocytes : type III pour les deux espèces

Une comparaison entre les deux modes de préparations hémocytaires : frottis humide ou empreinte de coeur, afin d'évaluer leur représentativité relative conduit à des pourcentages identiques. La technique des appositions de coeur est alors préférée en raison des meilleurs résultats morphologiques observés.

L'évaluation des pourcentages des trois types hémocytaires définis précédemment pour 50 individus exempts de bonamiose de l'espèce O.edulis provenant de Quiberon, 50 individus de même espèce provenant de Méditerranée, 30 individus parasités provenant de Quiberon et 50 individus de l'espèce C.gigas est présentée respectivement dans les figures 35, 36, 37 et 38.

Là encore, les "formules sanguines" montrent une grande variabilité individuelle. Cependant, les résultats obtenus permettent de mettre en évidence que contrairement aux données de la littérature (CHENG, 1981) les granulocytes ne sont pas majoritaires quelle que soit l'espèce considérée. Chez C.gigas, la moyenne se situe à 16.1 % (± 1.9). Chez O.edulis, elle est de 22.4 % (± 1.7) pour les huîtres provenant de l'étang de Thau, et de 15.2 % (± 1.8) pour celles originaires de la baie de Quiberon. La population des grands hyalinocytes représente 58.8 % (± 2.3) des cellules sanguines chez C.gigas, contre 32.1 % (± 1.2) chez O.edulis de Méditerranée, et 25.0 % (± 2.0) chez O.edulis de Quiberon. Enfin, le pourcentage moyen de petits hyalinocytes est de 25.1 % (± 2.1) pour C.gigas, alors qu'il est respectivement de 45.4 (± 1.5) et 59.8 (± 2.7) pour les huîtres plates de Méditerranée et de Quiberon.

Crassostrea gigas			Ostrea edulis Méditerranée			Ostrea edulis Quiberon			Ostrea edulis Quiberon P		
G	GH	PH	G	GH	PH	G	GH	PH	G	GH	PH
5	78	17	19	41	40	10	16	74	8	31	61
8	81	11	25	24	51	7	21	72	2	17	81
23	68	9	11	32	57	43	31	26	27	47	26
16	63	21	16	42	42	51	37	12	0	14	83
12	66	22	45	25	30	15	41	44	1	14	85
12	80	8	35	15	50	11	49	40	4	12	84
43	42	15	22	38	40	11	7	82	2	14	84
22	50	28	34	30	36	9	17	74	2	4	94
35	37	28	16	40	34	9	12	79	2	4	94
10	78	12	31	27	42	1	30	69	4	8	88
43	43	14	27	23	50	15	24	61	6	31	63
6	67	27	21	41	38	17	14	69	8	53	39
7	75	18	39	31	30	7	13	70	4	52	44
9	70	21	14	43	33	33	14	53	3	13	84
7	66	27	21	39	40	11	69	20	2	15	83
8	80	12	19	41	50	7	54	39	6	13	81
21	58	21	13	43	44	4	14	82	41	16	43
16	39	23	7	27	66	27	25	48	10	21	69
18	56	26	25	33	42	7	15	78	2	10	88
16	76	8	23	43	34	41	30	29	5	40	55
5	77	18	18	24	58	9	11	80	16	21	63
31	42	27	11	39	50	7	51	42	6	8	86
5	68	27	15	37	48	20	36	34	5	17	78
7	73	21	41	30	29	11	7	82	1	17	82
45	47	8	58	15	27	9	13	78	5	40	53
9	80	11	21	27	52	12	27	61	31	13	56
12	65	23	10	33	57	3	26	71	5	8	87
4	71	25	18	40	42	9	40	51	10	13	77
10	70	20	11	31	58	7	17	76	2	37	61
37	52	11	27	27	46	9	15	76	5	17	78
41	37	22	41	33	23	20	31	49	2	8	80
5	60	35	16	37	47	36	28	36			
10	51	39	21	33	46	7	17	76			
7	63	30	21	41	38	10	21	69			
27	49	24	27	30	43	13	47	40			
11	50	39	15	39	46	15	33	52			
7	54	39	19	37	44	7	12	71			
50	37	13	13	31	56	31	9	60			
3	76	21	25	29	44	40	17	43			
9	61	30	7	41	52	3	40	57			
8	77	15	18	18	64	7	21	72			
10	34	56	43	35	22	13	33	54			
20	52	28	50	12	38	19	27	54			
25	58	17	10	40	50	27	21	52			
51	41	18	8	23	69	3	41	56			
2	80	18	21	24	55	5	18	77			
9	39	52	27	17	56	7	7	86			
4	27	69	10	38	52	17	4	79			
3	23	74	15	27	58	3	12	85			
4	45	51									

Figure 35

Figure 36

Figure 37

Figure 38

Evaluation des pourcentages de granulocytes (G), grands hyalinocytes (GH) et petits hyalinocytes (PH)

L'analyse de variance à un facteur (ANOVA) effectuée à l'aide d'un logiciel STATGRAPHICS montre que les pourcentages moyens en types cellulaires sont significativement différents pour C.gigas, et O.edulis. Les pourcentages moyens de granulocytes, grands hyalinocytes et petits hyalinocytes chez O.edulis originaire de Quiberon et faiblement parasitée sont respectivement de 7.4 % (\pm 1.7), 20.3 % (\pm 2.5), 72.2 % (\pm 3.2). L'analyse de variance effectuée pour comparer ces résultats à ceux obtenus sur des huîtres saines de même espèce et de même provenance montre que les granulocytes sont significativement moins nombreux et les petits hyalinocytes significativement plus nombreux chez les animaux atteints de bonamiose.

4. Caractérisations enzymatiques

4.1. Phosphatase acide

La phosphatase acide catalyse en milieu acide l'hydrolyse de la cytidine 5'-monophosphate. Les produits libérés réagissent avec le nitrate de plomb pour donner des précipités de phosphate de plomb qui diffusent fortement les électrons. Contrairement aux données existantes (CHENG et DOWNS, 1988 ; AUFFRET, 1985) établissant la présence d'une activité phosphatasique acide, détectée à l'aide d'autres substrats, (β -glycérophosphate de sodium, p-nitrophénylphosphate de sodium) dans tous les types hémocytaires et en particulier dans les granules des granulocytes chez C.gigas, nos résultats ne mettent en évidence aucune activité de ce type quelle que soit l'espèce.

4.2. Estérases non spécifiques

Cette famille d'enzymes hydrolyse le 2-thiolacétoxy-benzanilide. En présence de ferrocyanure de potassium et de sulfate de cuivre, il se

forme aux sites d'activité du ferrocyanure de cuivre qui peut alors provoquer la polymérisation de la diaminobenzidine (DAB). Le polymère est dense aux électrons.

Une telle activité est détectée dans les grands et petits hyalinocytes des deux espèces. Le produit de la réaction apparaît localisé de manière diffuse dans le cytoplasme et, dans les grands hyalinocytes, il est associé aux petites vésicules claires aux électrons (fig.40, Pl.VIII). Aucune activité n'est mise en évidence dans les granulocytes.

4.3. Peroxydase

La peroxydase catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau par un donneur d'électrons, la DAB. La DAB oxydée forme un polymère que l'on peut visualiser en microscopie électronique.

Une activité peroxydasique peut être localisée, dans les hyalinocytes seulement, chez les deux espèces. Dans les grands hyalinocytes, elle se situe dans les vésicules claires aux électrons (fig.42, Pl.VIII) et le réticulum endoplasmique rugueux. Dans les petits hyalinocytes, seul le réticulum endoplasmique rugueux est réactif (fig.41, Pl.VIII). Les mitochondries de tous les types cellulaires sont également positives. Afin de déterminer la spécificité de la réaction, des contrôles sont réalisés. L'incubation dans un milieu sans DAB, puis sans H₂ O₂ ne donne aucun produit de réaction. L'incubation dans un milieu contenant du 3-amino-1,2,4-triazole, inhibiteur de la catalase donne les mêmes résultats que le milieu original. L'addition de cyanure de potassium inhibe toute réaction, y compris dans les mitochondries.

PLANCHE VIII

Caractérisations enzymatiques

Figure 39 :

NAD(P)H oxydase

Petit hyalinocyte (*O.edulis*) - Coupe non contrastée

n = noyau

ps = pseudopode

Le précipité d'ions cerreux qui signale la présence de cette activité enzymatique est localisé le long d'une partie de la membrane plasmique (mp)

Micrographie électronique X 50000

Figure 40 :

Estérases non spécifiques

Grand hyalinocyte (*C.gigas*) - Coupe non contrastée

Le matériel dense granuleux du cytoplasme et de certaines vésicules claires aux électrons (ve) est de la DAB polymérisée aux sites d'activité estérases

Micrographie électronique X 54000

Figure 41 :

Péroxydase

Petit hyalinocyte (*O.edulis*) - Coupe non contrastée

La DAB oxydée aux sites d'activité peroxydasique se localise au réticulum endoplasmique rugueux (rer) et dans l'espace périnucléaire (ep).

Noter la positivité des mitochondries (mi)

Micrographie électronique X 20600

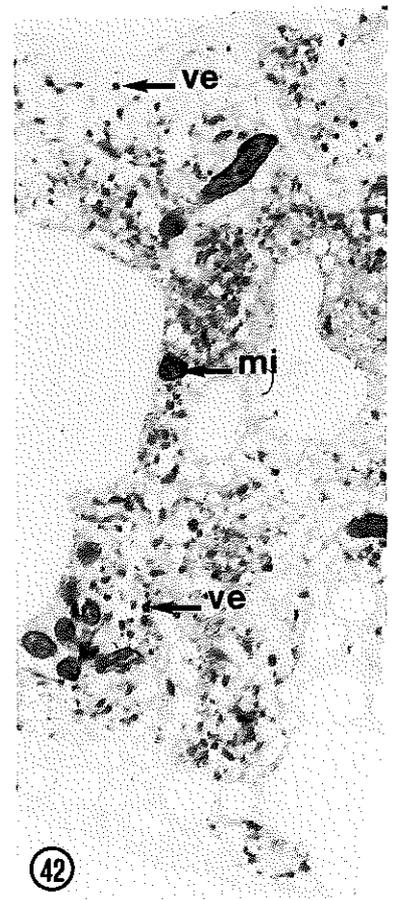
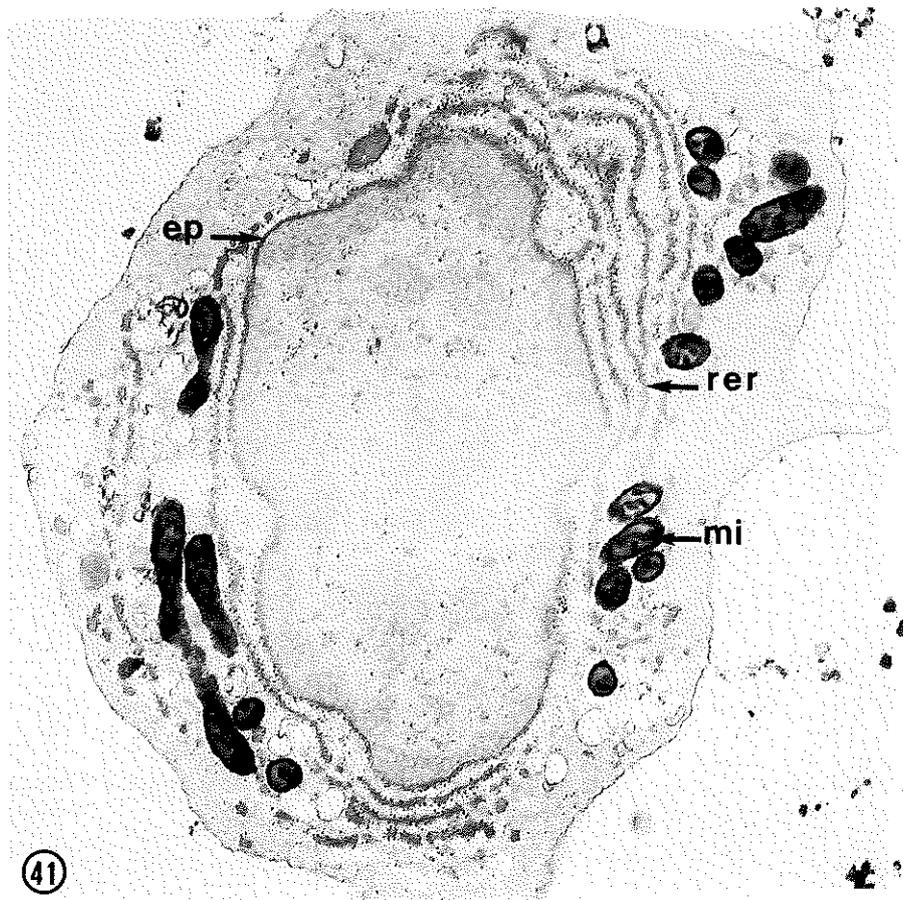
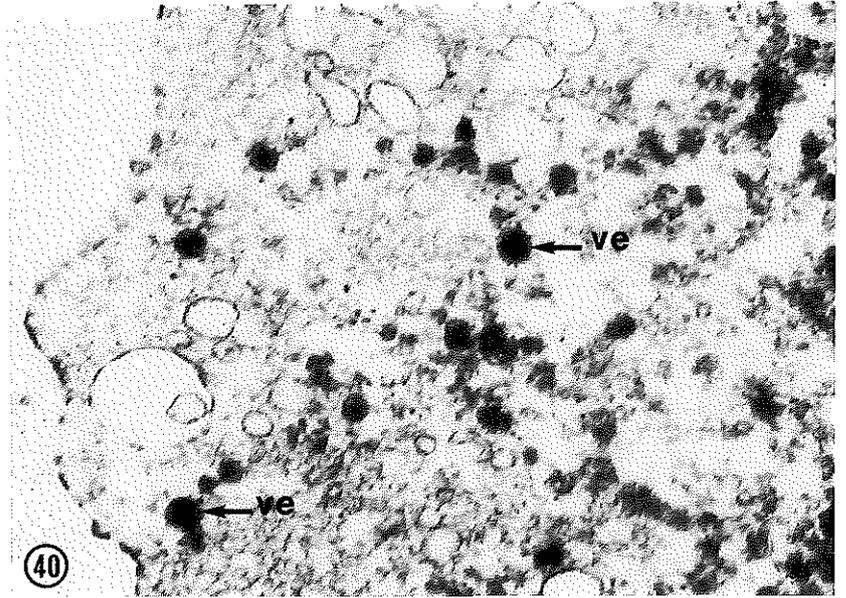
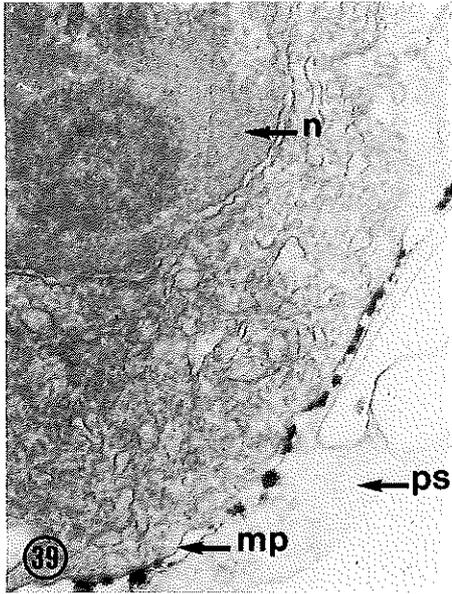
Figure 42 :

Peroxydase

Grand hyalinocyte (*C.gigas*) - Coupe non contrastée

Noter le produit de réaction dans les vésicules (ve) et dans les mitochondries (mi)

Micrographie électronique X 18000



Les réactions observées dans les témoins, ainsi que le pH de travail sont compatibles avec une activité de type peroxydase. Selon ESSNER (1973a), l'activité dans les mitochondries est due, soit à l'activité du cytochrome c, soit à son oxydation.

4.4. NADH oxydase

La NADH oxydase catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en ion superoxyde O_2^- qui produit spontanément de l'eau oxygénée H_2O_2 . En présence de peroxyde, les ions cerreux forment un précipité dense aux électrons.

Les hémocytes incubés dans un milieu contenant du α NADH et du chlorure de cérium montrent une réactivité qui se traduit par la présence de précipités discrets au niveau de la membrane plasmique, quelle que soit l'espèce et dans tous les types hémocytaires (fig.39, Pl.VIII). La réactivité ne disparaît pas lorsque le milieu d'incubation contient du cyanure de potassium.

5. Production de radicaux libres de l'oxygène

Les oxydants qui sont générés lors du processus phagocytaire réagissent avec certaines molécules des particules ingérées qui aboutissent à des intermédiaires riches en énergie, électriquement excités. Le retour à l'état de repos de ces intermédiaires provoque l'émission de lumière qui est à la base du phénomène de chimioluminescence native. Ce phénomène natif donne un signal assez bas, mais peut être amplifié par l'adjonction dans le système expérimental d'une molécule telle que le Luminol. Le nombre de coups par minute enregistré au compteur à scintillation est fonction de la concentration

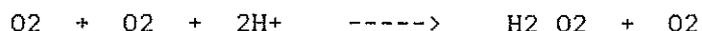
en phagocytes, de la concentration en stimulant, et de la concentration en Luminol.

La figure 43 présente les caractéristiques de la réponse des hémocytes stimulés par le zymosan en chimioluminescence par rapport à un témoin hémocytes non stimulés. Cette réponse est longue et dure plus de 4 heures. La hauteur maximum du pic dépend de la concentration en zymosan. Elle est aussi atteinte plus rapidement, lorsque le nombre de particules de zymosan par hémocyte augmente. Les courbes Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7 correspondent à des rapports zymosan/hémocyte de 10/1, 20/1, 40/1, 60/1, 80/1, 120/1, 160/1. Les figures 44 et 45 montrent les résultats obtenus lorsqu'un nombre d'hémocytes fixé à 2×10^5 est stimulé par une concentration de zymosan de 80 particules par hémocyte chez trois individus d'espèce O.edulis et trois individus d'espèce C.qiqas. La réponse apparait variable selon l'individu et globalement plus élevée chez O.edulis que chez C.qiqas.

5.1. Effet des inhibiteurs

5.1.1. Superoxyde dismutase (S.O.D.)

La S.O.D. catalyse la formation d' $H_2 O_2$ à pH neutre au détriment de l'ion superoxide selon une réaction de dismutation :



Lorsque de la SOD exogène est ajoutée dans le milieu réactionnel, la réponse des hémocytes de C.qiqas stimulés par le zymosan n'est pas modifiée, celle des hémocytes d'O.edulis montre une légère inhibition (fig.46).

5.1.2. Azide de sodium et cyanure de potassium

Ajoutés au moment du pic d'activité, ces inhibiteurs métaboliques, connus comme inhibiteurs de peroxydase font chuter très rapidement la réponse des hémocytes chez les deux espèces (fig.46).

5.1.3. Cytochalasine B

La cytochalasine B empêche la fermeture des vacuoles de phagocytose et provoque le relarguage extracellulaire des enzymes lysosomiales, en particulier celui de la peroxydase. Les phénomènes membranaires ne sont pas inhibés, et du peroxyde d'hydrogène, substrat de la peroxydase est aussi présent extracellulairement, ce qui explique le flash précoce de chimioluminescence suivi d'une chute brutale puisque le zymosan n'est pas internalisé (fig.46).

5.2. Hémocytes séparés

La réponse obtenue par stimulation d'une population homogène de granulocytes avec le zymosan apparaît au niveau du bruit de fond observé sans stimulation. Au contraire, la population des hyalinocytes donne une réponse élevée (fig.47). Le Percoll n'interfère pas avec l'activité des hémocytes (fig.48).

6. DISCUSSION

Trois principaux types cellulaires, granulocytes, grands hyalinocytes, petits hyalinocytes peuvent être définis sur la base des données morphologiques obtenues en microscopie photonique et électronique. L'existence de sous-types de granulocytes chez C. gigas pourrait être interprétée comme des variations fonctionnelles d'un type

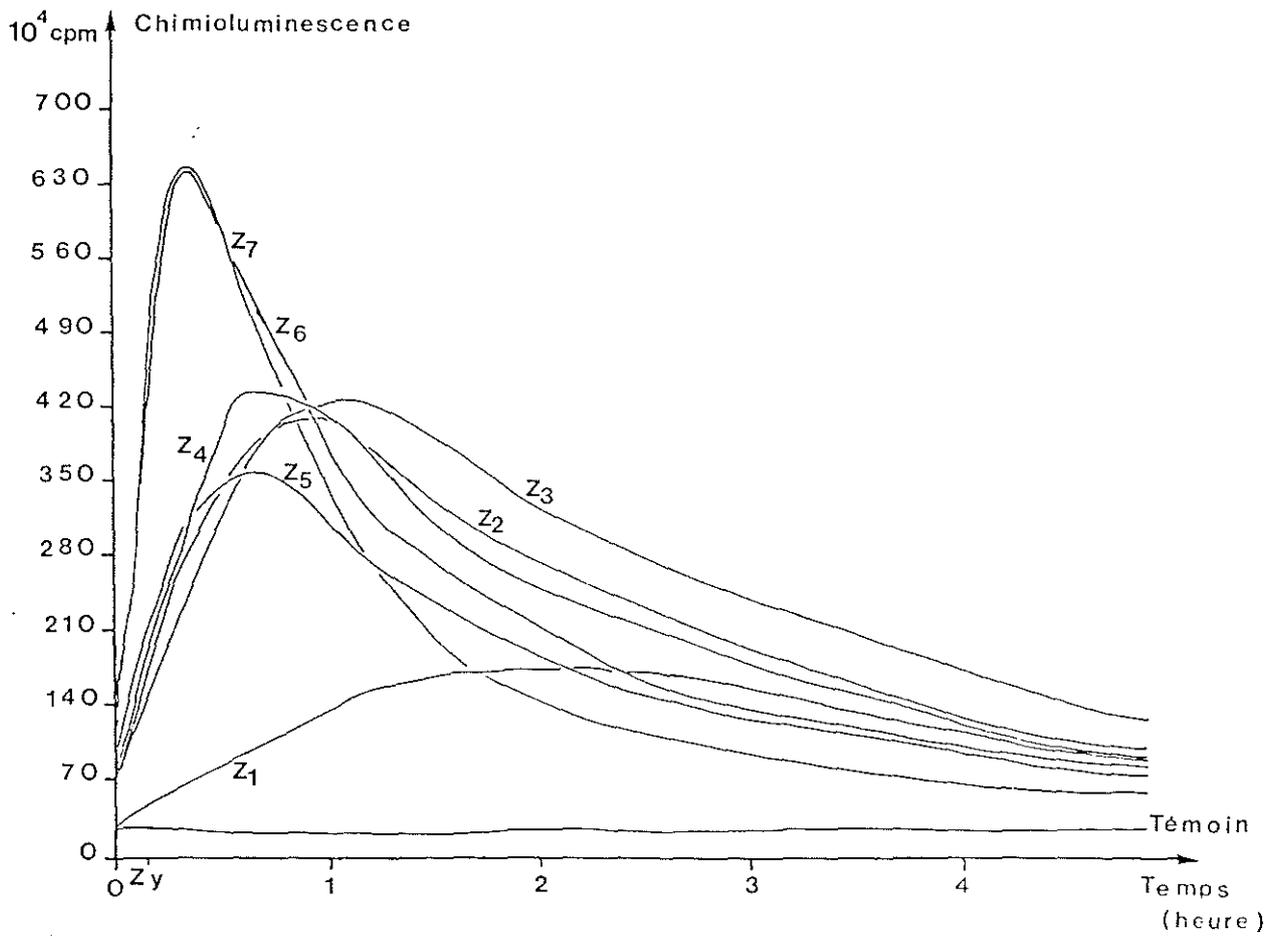


Figure 43 : Effet de différentes concentrations de zymosan sur la chimioluminescence des hémocytes d'*O. edulis* par le luminol
 Z : rapport particules de zymosan / hémocyte

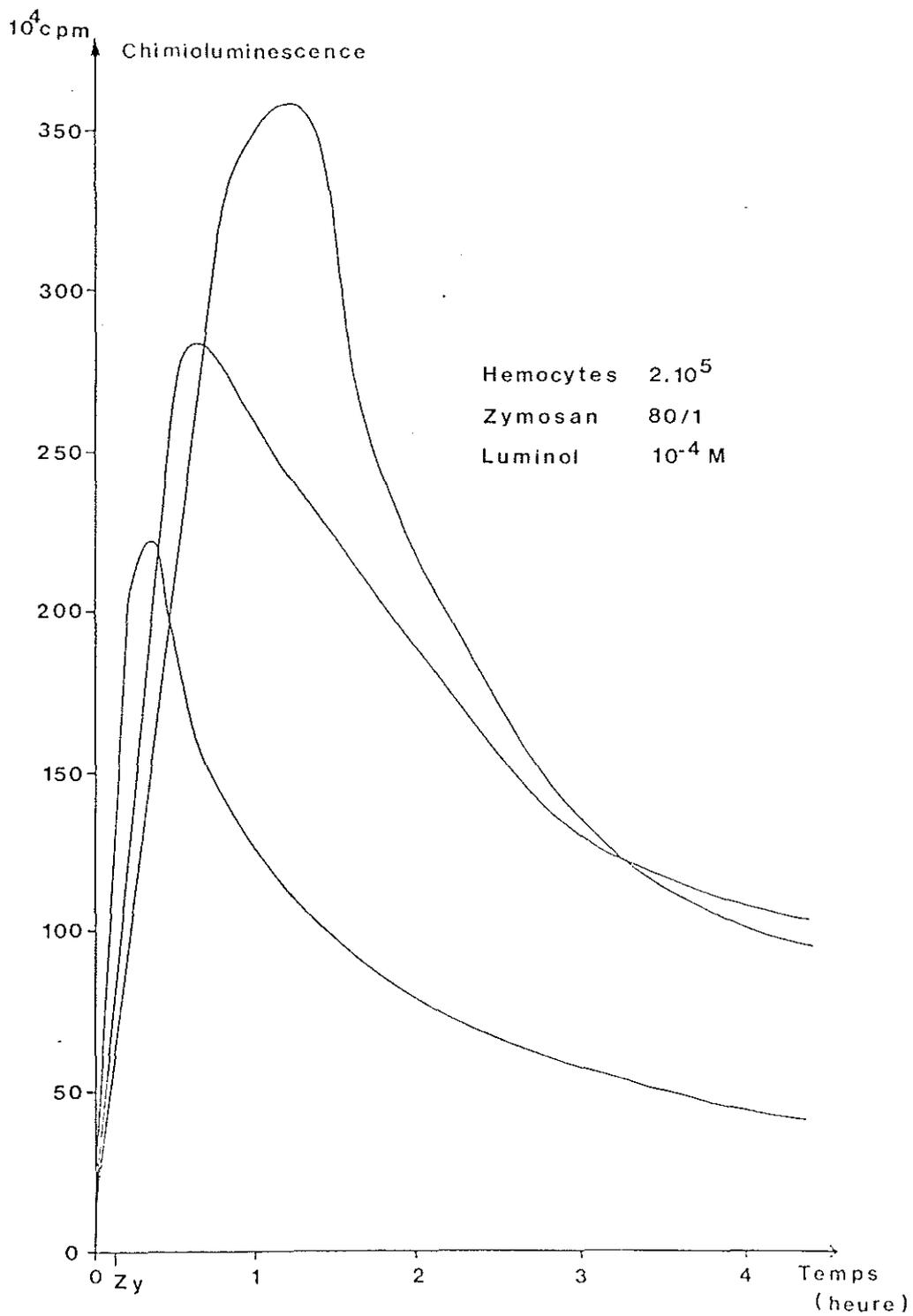


Figure 44 : Chimioluminescence induite par le zymosan (amplifiée par le luminol) de 2×10^5 hémocytes d'*O. edulis* provenant de trois individus différents

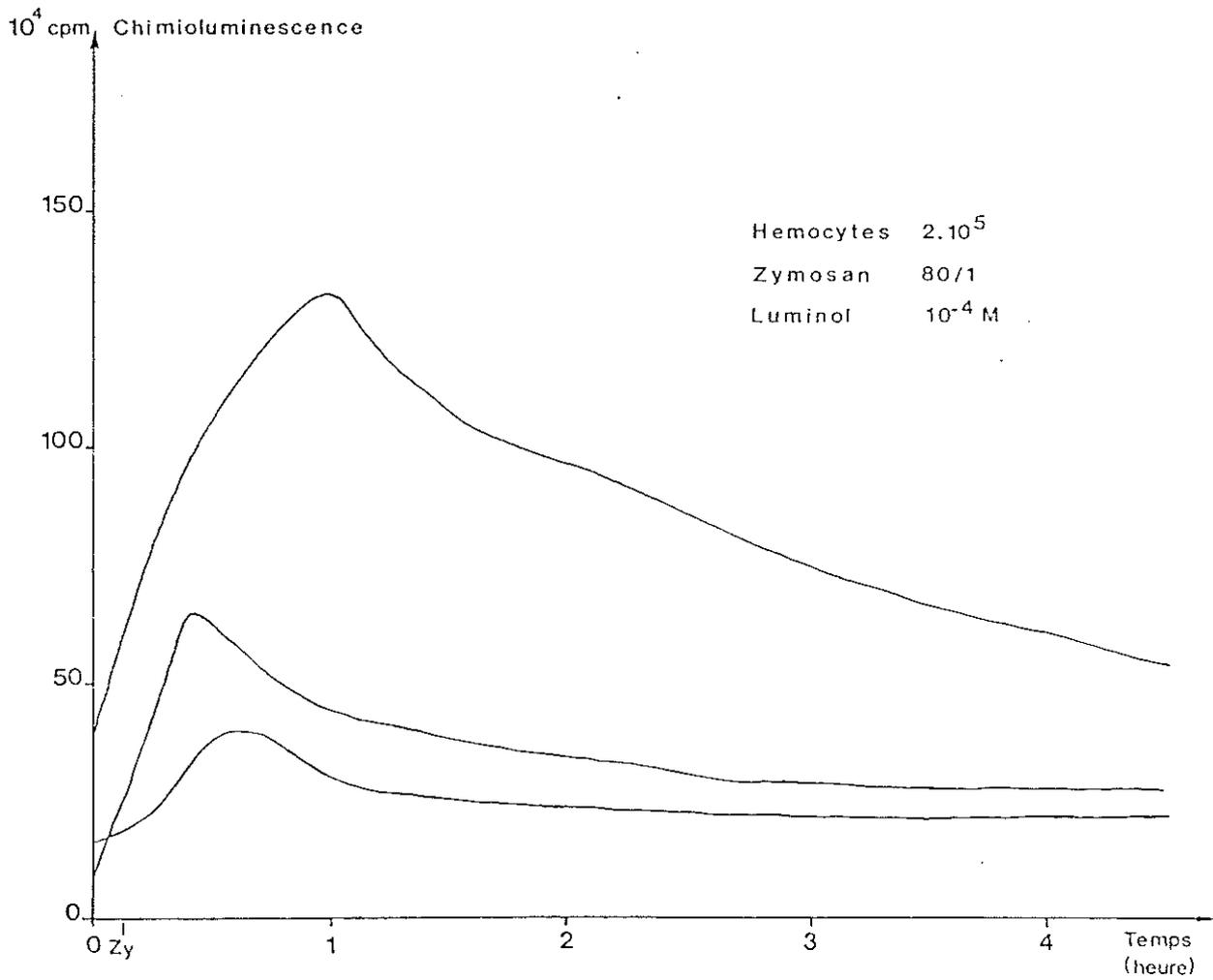


Figure 45 : Chemiluminescence induite par le zymosan (amplifiée par le luminol) de 2×10^5 hémocytes de C.gigas provenant de trois individus différents

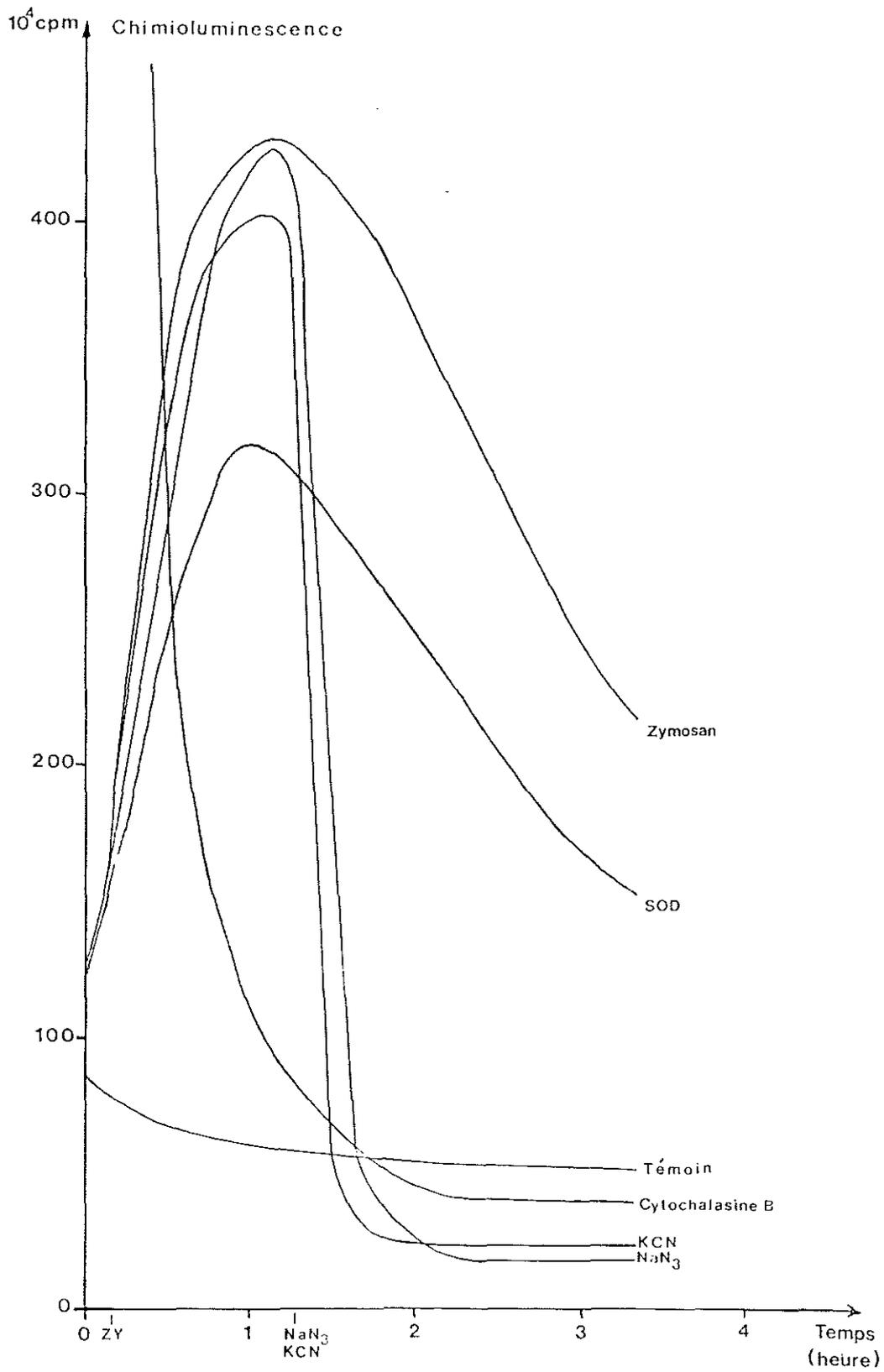


Figure 46 : Effets de différents inhibiteurs sur la chimiluminescence induite par le zymosan (amplifiée par le luminol) des hémocytes d' O. edulis
 S O D : superoxyde dismutase
 KCN : cyanure de potassium
 NaN₃ : azide de sodium

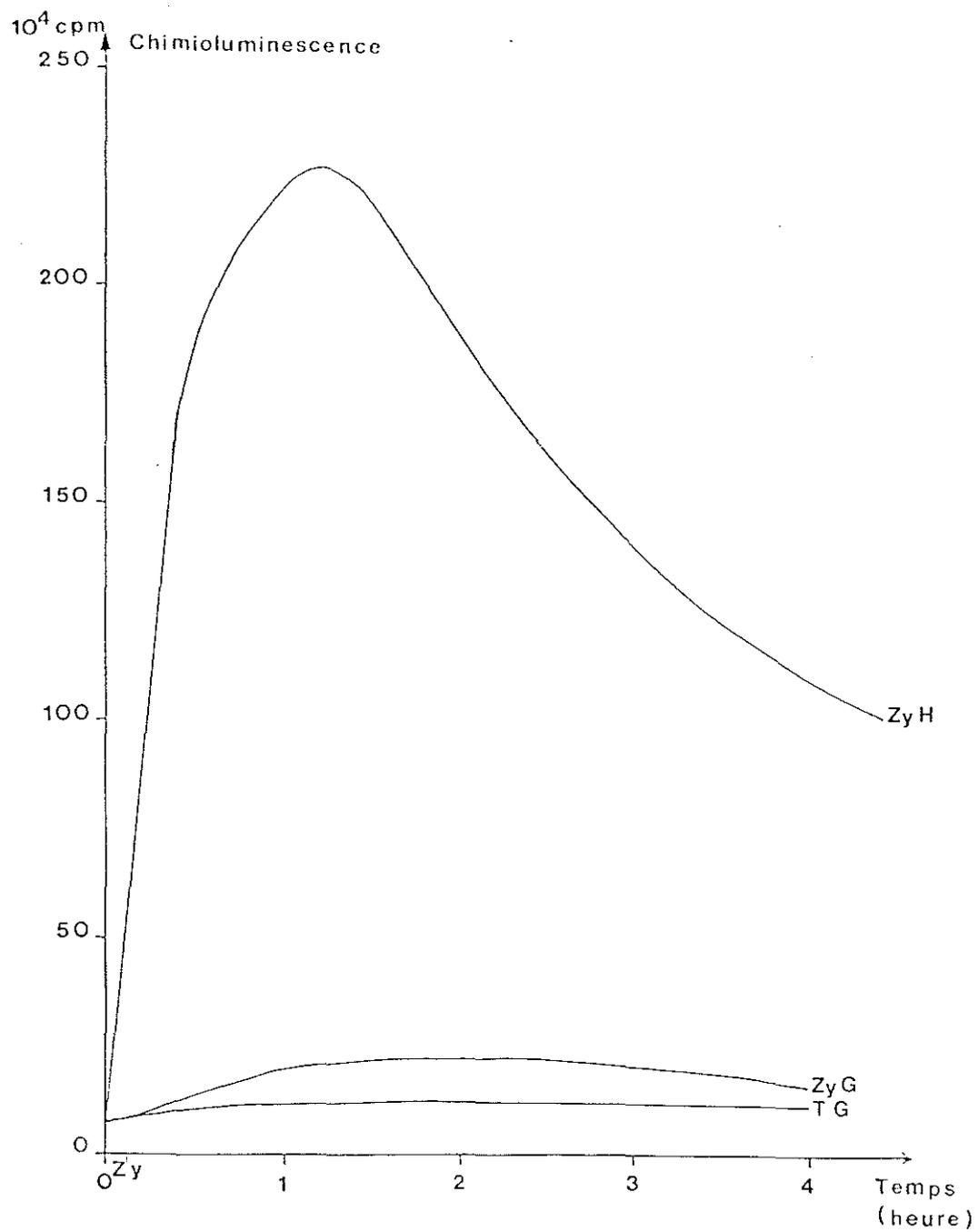


Figure 47 : Chimiluminescence induite par le zymosan (amplifiée par le luminol) des hémocytes séparés sur Percoll d'*O. edulis*
 ZyH : hyalinocytes
 ZyG : granulocytes

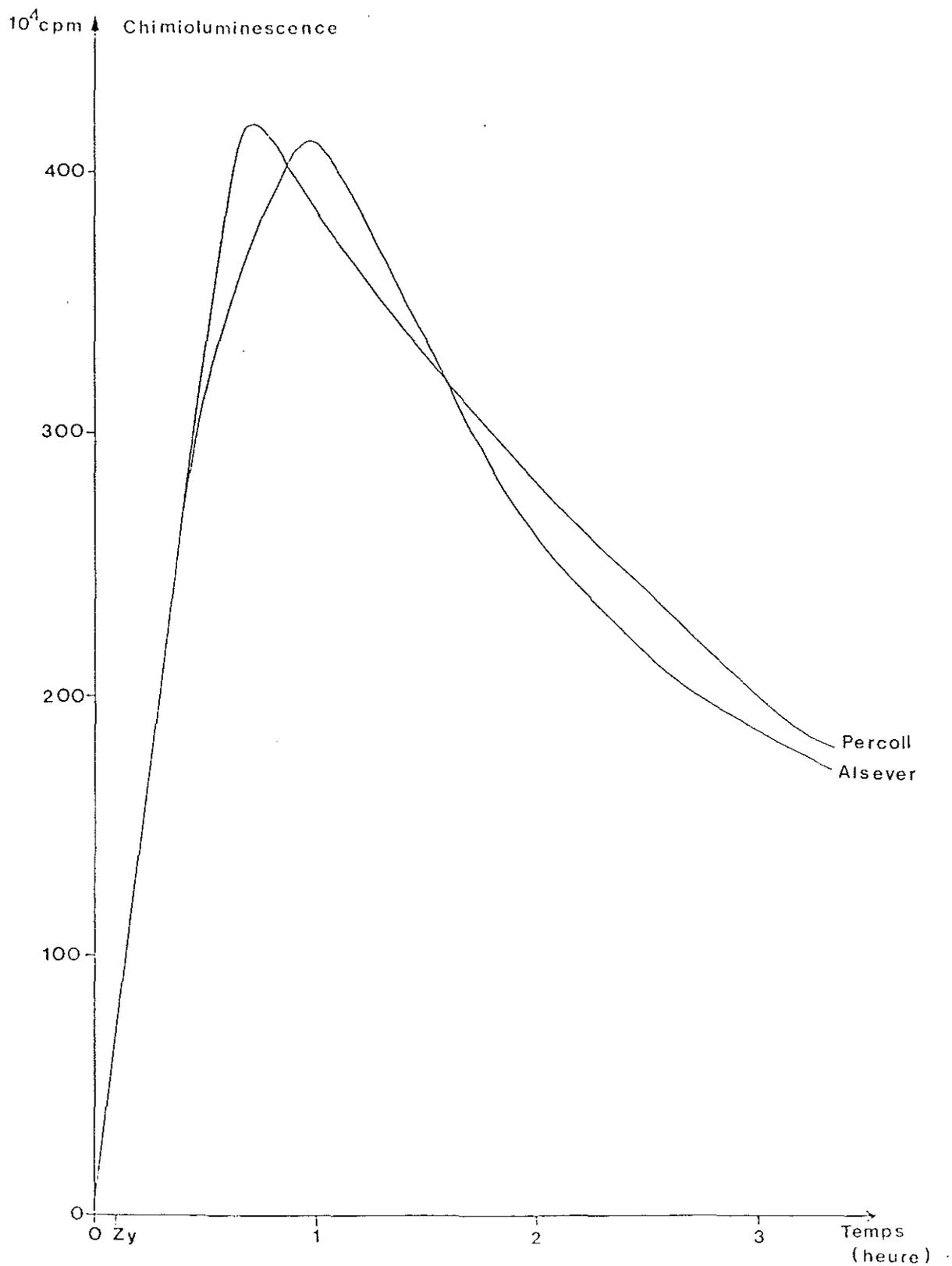


Figure 48 : Chimiluminescence induite par le zymosan (amplifiée par le luminol) de 2×10^5 hémocytes maintenus dans le Percoll ou dans la solution modifiée d'Alsever

unique, dans la mesure où les granules clairs et denses aux électrons qui servent à les définir sont parfois observés dans la même cellule.

L'analyse ultrastructurale des fractions obtenues par l'élutriation-centrifugation de la population des hyalinocytes conduit à envisager qu'elle constitue une série évolutive. Cette hypothèse est renforcée par la localisation subcellulaire de l'activité peroxydasique : observée dans le réticulum endoplasmique rugueux des deux types hyalinocytaires chez O.edulis et C.gigas, elle est également détectée dans les vésicules claires aux électrons des grands hyalinocytes, qui pourraient ainsi avoir valeur d'organites de stockage et de lysosomes primaires : le grand hyalinocyte serait alors la forme plus mature du petit hyalinocyte. Ces résultats s'intègrent dans le schéma général proposé par CHENG (1981) pour la classification des hémocytes des Mollusques bivalves et qui distingue deux catégories : les cellules granuleuses et les cellules non granuleuses, les types multiples observés représentant des stades de maturation ou des stades fonctionnels de ces deux classes principales.

L'analyse des hémogrammes, tant en ce qui concerne le nombre des hémocytes circulants que leur répartition fait apparaître une grande variabilité et rend difficile l'établissement d'une norme bien définie comme chez les Vertébrés. Les numérations hémocytaires sont globalement très élevées (de 1 à 5 x 10⁶ cellules/ml) par rapport à celles de ces derniers (4000 à 10000 leucocytes/ml) et ne font pas apparaître de différence entre les deux espèces considérées.

Malgré la variabilité observée au niveau des pourcentages en types cellulaires, les granulocytes ne sont pas majoritaires contrairement aux données établies chez C.virginica, espèce pour laquelle CHENG (1981) rapporte 87 % de granulocytes. Les populations les plus représentées

sont respectivement les grands hyalinocytes chez C.gigas et les petits hyalinocytes chez O.edulis. La faible proportion de granulocytes chez C.gigas est d'ailleurs confirmée par les dénombrements cellulaires effectués sur les fractions hémocytaires séparées. Cette différence d'observation peut s'expliquer soit parce qu'il s'agit d'espèces différentes, soit plus probablement parce qu'aucune étude de la répartition des types hémocytaires n'avait été réalisée sur un grand nombre d'échantillons.

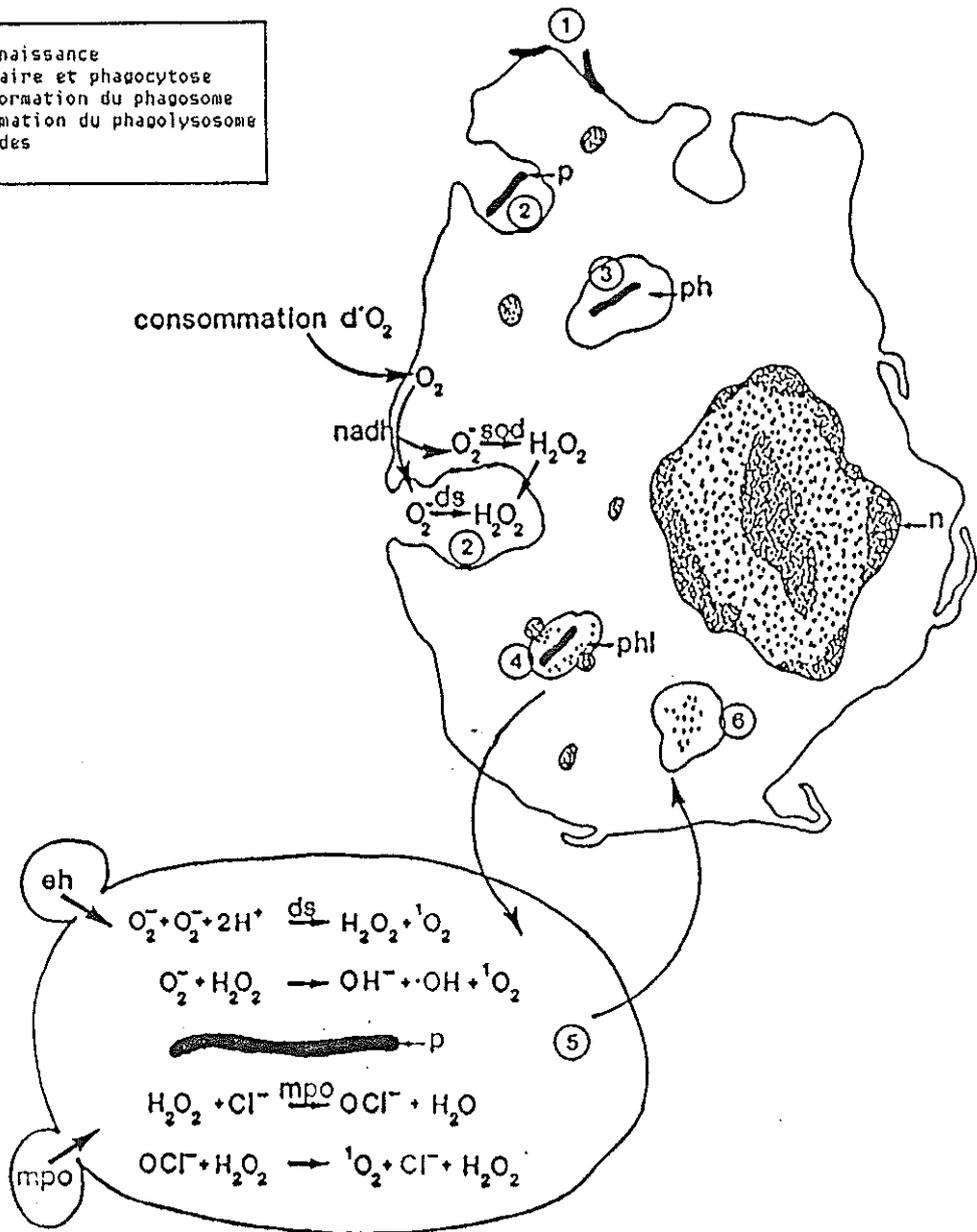
La valeur des évaluations des numérations et des "formules sanguines" chez les Mollusques a été discutée (AUFFRET, 1985) dans le sens où elles ne représentaient que le "pool circulant" de cellules sanguines, et ne tenaient pas compte des cellules associées aux tissus. Cette réserve pourrait aussi bien s'appliquer aux Vertébrés où de telles estimations sont pourtant utilisées en routine à des fins de diagnostic. Les problèmes se situent plutôt au niveau de l'interprétation qui peut être faite de ces éléments dans des espèces où ne sont connues ni la fonction, ni l'hématopoïèse, ni les modifications pathologiques associées aux maladies. Une étude de l'évolution des hémocytes au cours de l'infection expérimentale d'O.edulis par B.ostreae est actuellement en cours au laboratoire. D'autre part, la mise au point d'une technique de séparation de cellules viables permet d'envisager des études fonctionnelles type par type.

Les activités enzymatiques mises en évidence dans les hémocytes des deux espèces sont un autre élément précisant la fonction de ceux-ci.

La phagocytose, chez les Vertébrés donne lieu à des phénomènes membranaires et intracellulaires décrits dans la figure 50.

La reconnaissance d'une particule étrangère peut provoquer une stimulation du métabolisme oxydatif connu comme "Respiratory Burst" ou

- ① Attachement et reconnaissance
- ② Invagination membranaire et phagocytose
- ③ Internalisation et formation du phagosome
- ④ Dégranulation et formation du phagolysosome
- ⑤ Evènements bactéricides
- ⑥ Digestion



Légende

ly : lysosome
 n : noyau
 p : particule
 ph : phagosome
 phl : phagolysosome
 ds : dismutation spontanée

ENZYMES impliquées

eh : enzymes hydrolytiques
 mpo : myéloperoxydase
 nad(p)h : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate), forme réduite
 sod : superoxyde dismutase

molécule cytotoxique : H₂O₂

radicaux libres toxiques de l'oxygène : O₂⁻, ¹O₂, ·OH, OCl⁻

Figure 50 : Activation métabolique respiratoire accompagnant la phagocytose

activation métabolique respiratoire (BADWEY et KARNOSKY, 1980). Le métabolisme du glucose est augmenté par la voie du shunt des hexoses monophosphates, ce qui conduit à la génération de NADPH qui active une NADPH oxydase membranaire. La consommation d'oxygène est augmentée et la NADPH oxydase catalyse la réduction de l'oxygène en ion superoxyde, servant d'intermédiaire dans des réactions d'oxydo-réduction qui produisent de l'eau oxygénée et des oxydants énergiques tels que le radical hydroxyle .OH et l'oxygène singulet 1O_2 . Ces oxydants sont potentiellement cytocides (LOCKSLEY et KLEBANOFF, 1983) et se retrouvent dans le phagozome. Les lysosomes fusionnent alors avec le phagozome. La présence dans les lysosomes de la myéloperoxydase, jointe à celle d' H_2O_2 et d'ions Cl^- donne lieu à des phénomènes cytocides puissants. D'autre part, les hydrolases lysosomiales entraînent la digestion du matériel phagocyté. Parmi ces dernières, les estérases non spécifiques ont valeur de marqueur de la population des phagocytes mononucléaires (VAN FURTH, 1986).

Les petits et grands hyalinocytes des deux espèces étudiées possèdent des estérases non spécifiques. La détection histochimique d'une activité peroxydasique, jointe à celle d'une NADPH membranaire pouvait laisser supposer l'existence de mécanismes de cytocidie oxygène dépendants. Cette hypothèse a été confirmée par la mise en évidence en chimioluminescence d'un métabolisme de type "Respiratory Burst". Les conditions expérimentales, (stimulant particulaire, Luminol comme amplificateur), et les réponses aux inhibiteurs renforcent l'implication de la peroxydase dans le phénomène (ALLEN, 1986 ; DE CHATELET et al., 1982). Les hyalinocytes peuvent ainsi être assimilés à des "macrophages" d'Invertébrés. La production de radicaux libres de l'oxygène n'avait

jusqu'ici été démontrée que chez les gastéropodes (DIKKEBOOM et al., 1988) et chez le bivalve Patinopecten yessoensis (NAKAMURA, 1985).

Les résultats obtenus sur les granulocytes posent le problème de leur fonction par rapport à la bibliographie existante, mais aussi dans l'absolu.

L'absence d'activité phosphatase acide confirme les données établies pour les granulocytes de Ruditapes decussatus (HENRY, 1987), mais contredit celles présentées par d'autres auteurs pour C. virginica (CHENG et DOWNS, 1988), C. gigas et O. edulis (AUFFRET, 1985). L'utilisation du substrat cytidine 5'-monophosphate au lieu du β -glycérophosphate de sodium pourrait expliquer la différence des résultats obtenus comme l'a noté ESSNER (1973b). Cependant, des recherches complémentaires devront être effectuées car la nature lysosomiale des granules ne peut pas être établie sur le seul critère de positivité de la phosphatase acide. Les autres activités enzymatiques lysosomiales étudiées, estérases et peroxydases ne sont pas présentes dans les granulocytes alors qu'elles le sont dans les hyalinocytes. D'autre part, les granulocytes ne semblent pas intervenir dans l'activation métabolique respiratoire, malgré la présence membranaire de NADPH oxydase.

Les granulocytes à grains denses et clairs aux électrons de C. gigas ont une morphologie qui pourrait rappeler celle des granulocytes basophiles des Vertébrés, cellules à grosses granulations sphériques denses aux électrons, devenant claires après dégranulation et libération extracellulaire de médiateurs.

A part des différences dans la répartition des types cellulaires, aucune différence qualitative entre les hémocytes de C. gigas et ceux d'O. edulis ne peut être mise en évidence sur la base des fonctions étudiées.

II - RELATIONS BONAMIA OSTREAE - HEMOCYTES

1. ANALYSE DES CELLULES INFECTEES NATURELLEMENT

1.1. Microscopie photonique

L'examen de frottis de coeur d'O.edulis parasitées met en évidence la capacité de B.ostreae de se développer dans les trois types cellulaires définis comme granulocytes (fig.51, Pl.IX), grands hyalinocytes (fig.52, Pl.IX) et petits hyalinocytes (fig.53, Pl.IX). Dans certains cas, le parasite apparaît nettement auréolé d'un halo chromophile assimilable à une vacuole. Des parasites libres peuvent être observés, provenant de la lyse spontanée des hémocytes pathologiques ou de l'éclatement de ces cellules, fragilisées lors de la confection du frottis.

1.2. Microscopie électronique

Elle confirme les données précédentes quant aux types cellulaires parasités et met en évidence, même lorsque l'infection est faible, des effets cytopathiques drastiques (fig.54) en particulier au niveau du cytoplasme où il devient difficile d'identifier les structures. Le parasite semble généralement enclos dans une vacuole parasitophore, souvent intimement accolée à sa propre membrane plasmique (fig.55, Pl.X), et dans laquelle, il est capable de se diviser par scissiparité (fig.58, Pl.X)). Des formes binucléées, de signification incertaine dans le cycle de développement sont aussi rencontrées (fig.57, Pl.X).

L'ultrastructure de B.ostreae a été décrite dans le détail par COMPS (1983). Le parasite apparaît généralement sous forme d'une cellule arrondie de 2 à 3 μ de diamètre (fig.56, Pl.X), mais peut présenter un

PLANCHE IX

Infections naturelles

Figure 51 :

Apposition de coeur
Granulocyte (G) parasité (B.o)

Micrographie photonique X 1250

Figure 52 :

Apposition de coeur
Grand hyalinocyte (Gh) parasité (B.o)

Micrographie photonique X 1250

Figure 53 :

Apposition de coeur
Petit hyalinocyte (Ph) parasité (B.o)

Micrographie photonique X 1250

Figure 54 :

Culot d'hémocytes d'Ostrea edulis
La cellule infectée contient quatre parasites (B.o).
Elle est considérablement dégradée, le noyau (n) de l'un
des parasites présente un nucléole (nu) excentré

mi = mitochondrie
h = haplosporosome
va = vacuole parasitophore

Micrographie électronique X 18750

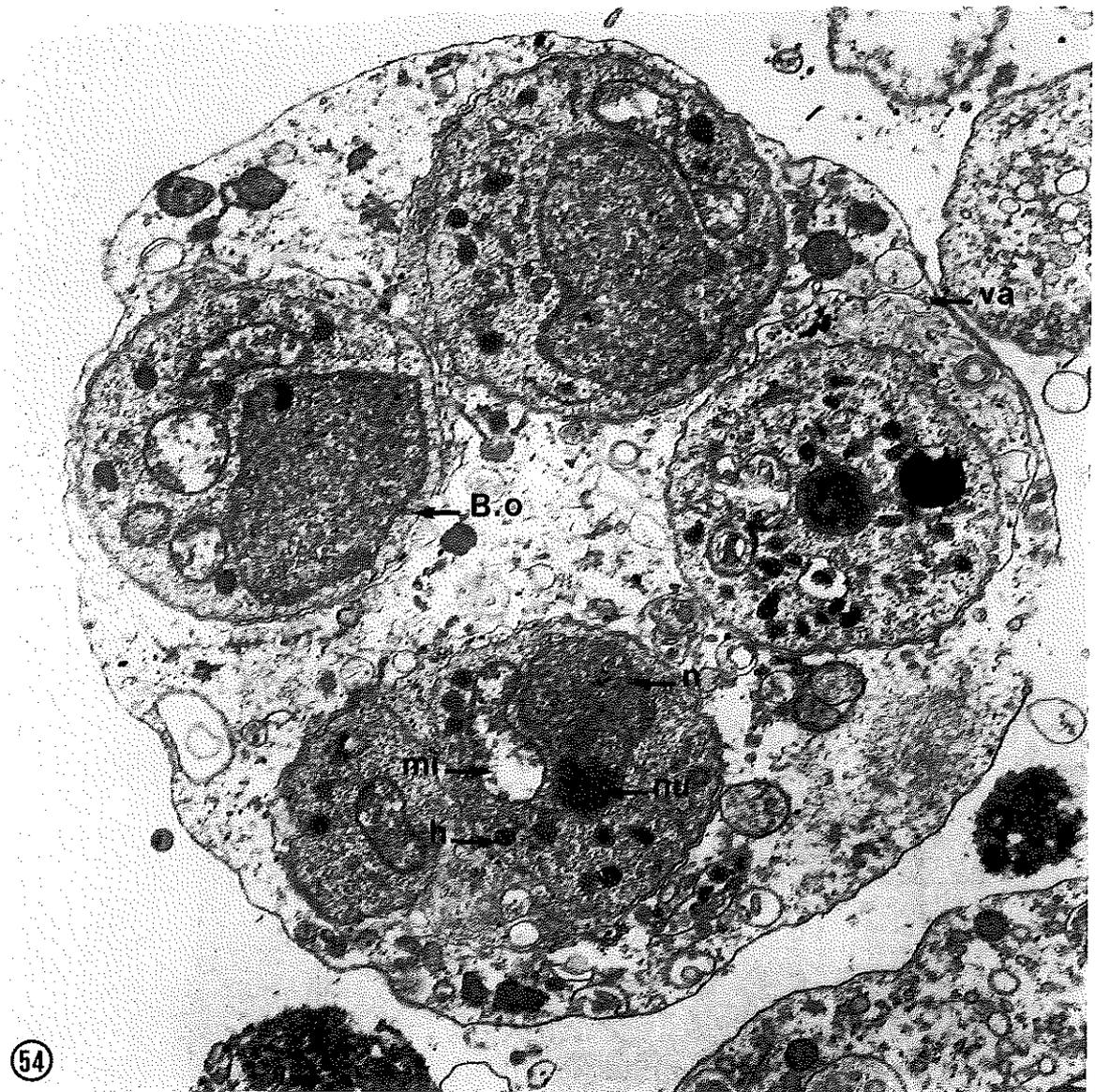
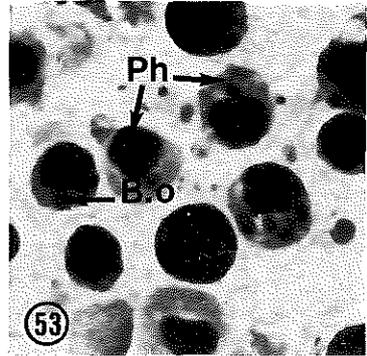
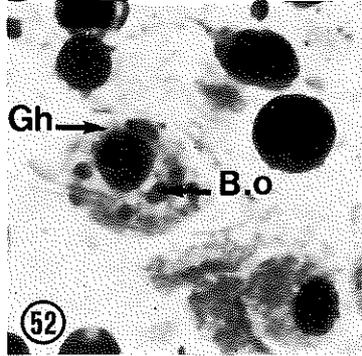
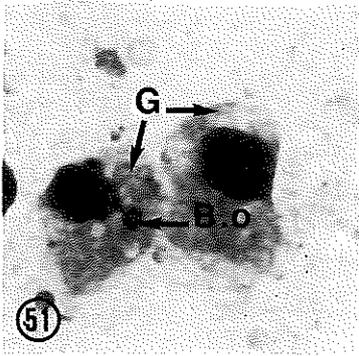


PLANCHE X

Ultrastructure de Bonamia ostreae dans les infections naturelles

Figure 55 :

Forme allongée à contours irréguliers

n = noyau
h = haplosporosome
mu = membrane unitaire
ri = ribosome
mi = mitochondrie
ct = crête tubulaire
va = vacuole parasitophore

M.électronique X 42500

Figure 56 :

Forme ronde de B.ostreae

en = enveloppe nucléaire

M.électronique X 30000

Figure 57 :

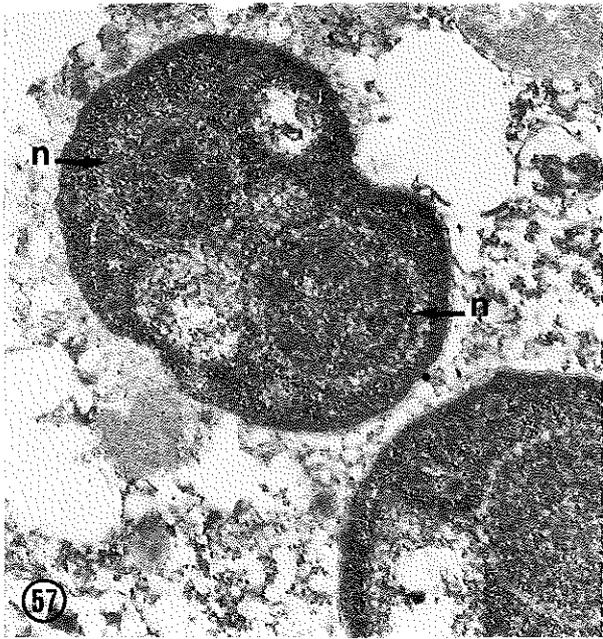
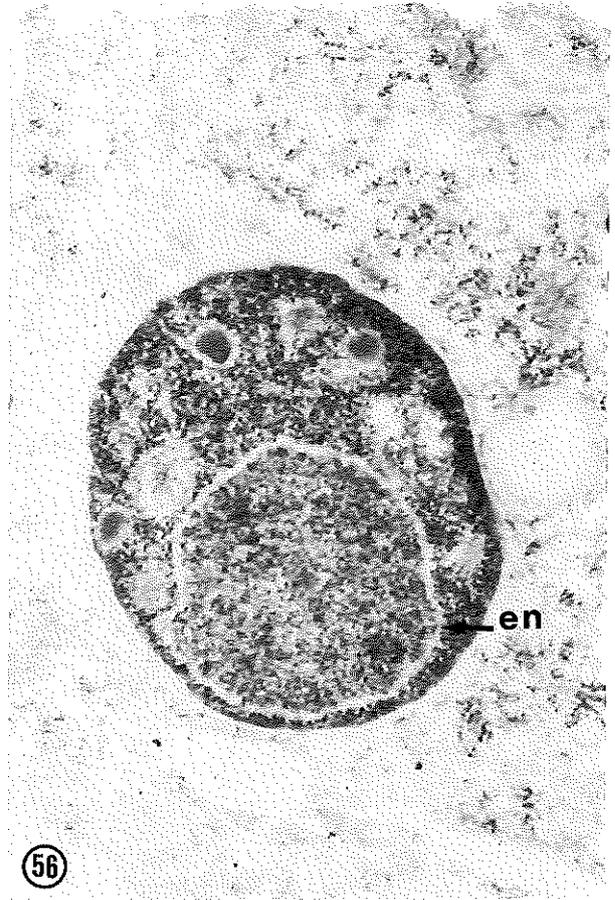
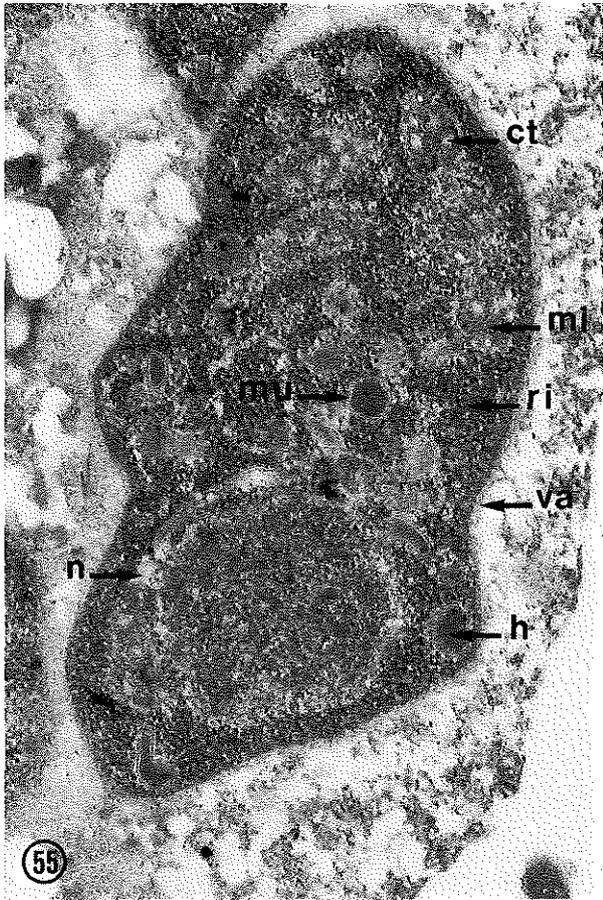
Forme binucléée (n)

M.électronique X 30000

Figure 58 :

Division binaire

M.électronique X 24000



certain polymorphisme (fig.55, Pl.X). Son noyau entouré d'une enveloppe nucléaire contient une chromatine finement granuleuse et répartie de façon homogène. Dans le cytoplasme, on note une forte densité de ribosomes libres, une ou deux grosses mitochondries à crêtes tubulaires et des organites particuliers limités par une membrane unitaire, les haplosporosomes. La présence de ces organites, de taille, de forme, et de densité aux électrons variables a conduit à apparenter le parasite aux protozoaires de la classe des Stellatospora (Phylum des Ascetospora). La nature des haplosporosomes n'est pas connue avec précision, bien que leur soient attribués une origine Golgienne et un contenu en ADN (COMPS, 1983). Une observation mérite cependant d'être mentionnée : le parasite libère ces organites dans la vacuole parasitophore par un processus d'exocytose (fig.59 et 60, Pl.XI). Ce phénomène est décelé lors d'infections naturelles mais aussi lors d'infections expérimentales in vitro.

Certaines cellules contiennent une grosse inclusion plus ou moins dense, parfois associée à des saccules de type Golgien (fig.61, Pl.XI).

2. ETUDE DES INTERACTIONS IN VITRO

2.1. Mécanismes d'entrée

2.1.1. Description des cellules infectées

La mise en contact d'hémocytes d'O.edulis et de C.gigas avec B.ostreae in vitro aboutit à l'internalisation du parasite dans les deux espèces. Les trois types hémocytaires apparaissent réceptifs : les figures 62 et 63 présentent l'estimation des pourcentages de cellules parasitées, type par type, après une heure de contact. Les taux d'infection les plus élevés sont notés chez les granulocytes qui sont plus fréquemment parasités chez C.gigas que chez O.edulis (63.6 % / 45.7 %).

PLANCHE XI

Organites de Bonamia ostreae

Figure 59 et 60 :

Extrusion d'haplosporosomes dans la vacuole parasitophore

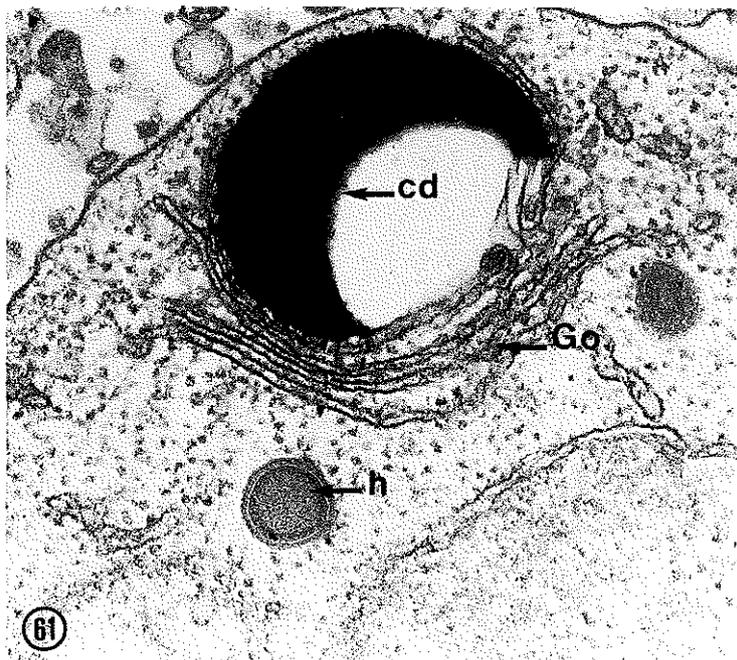
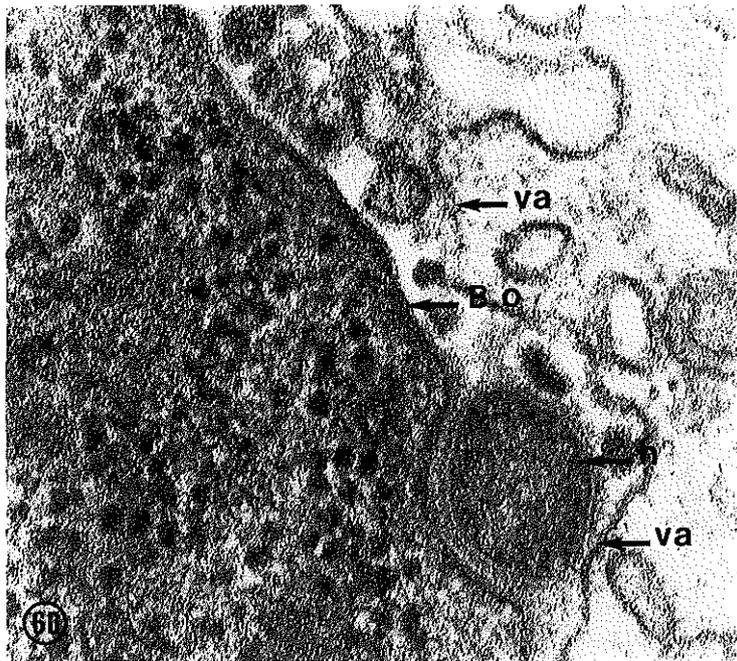
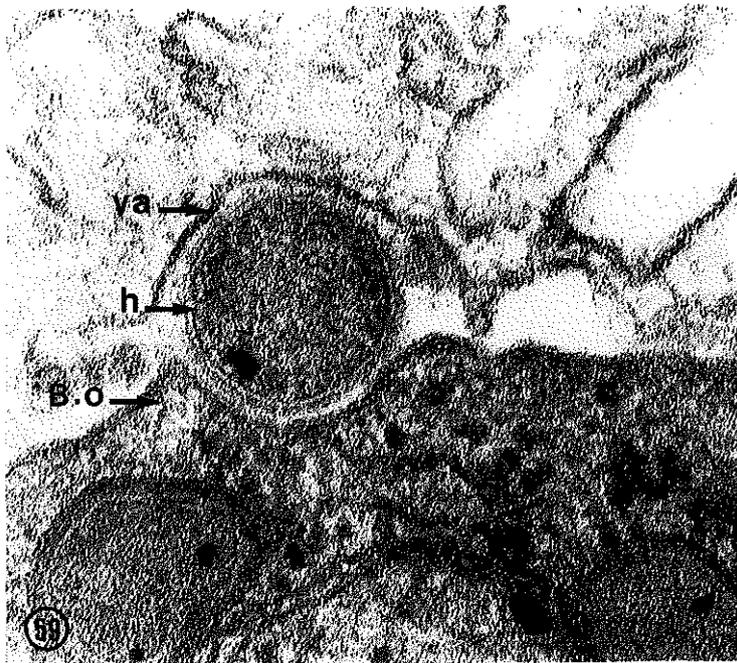
B.o = Bonamia ostreae
va = vacuole parasitophore
h = haplosporosome

Micrographies électroniques X 160000

Figure 61 :

Détail de structure du parasite montrant le corps dense (cd)
associé à des saccules de type Golgien (Go)

Micrographie électronique X 84000



<u>Ostrea edulis Méditerranée</u>		
G	GH	PH
55.50	26.90	26.15
27.30	9.40	5.60
23.10	34.80	2.40
38.90	23.80	22.50
32.70	0	0
30.80	9.80	17.40
100	13.04	11.80
18.70	19.04	11.50
20	16.90	19.40
37.50	28.60	15.80
0	26.50	4.70
20	65.90	30.20
54.20	43.50	8.80
51.30	41	4.55
57.10	43.80	29.51
54.50	45.60	33.33
25	46.30	17.10
70	39	17.20
0	43.10	17.70
39.10	37.50	6.70
28.60	50	1.90
31.20	19.20	17.30
73.30	46.10	6.80
54.50	47.70	2.22
36.40	20	4.20
33.30	9.60	13.90
80.80	36	12.50
53.80	22.40	10
54.20	8.20	13.30
45	34.90	5.90
65.70	52.90	9.70
33.30	20.80	2.70
50	50.90	14.20
0	25.90	8.30
39.30	10.50	0
4.20	63.20	20.60
58.30	48.70	19.60
92.30	24.40	25

Figure 62

<u>Crassostrea gigas</u>		
G	GH	PH
66.60	44.60	30.40
55.50	7.20	40.90
66.60	17.90	30.80
76.40	15	13
75	32.70	50
62.50	51.80	46.10
85.70	7	15.40
66.60	15.60	9.40
76.20	20	35.70
100	14	33.30
69.20	25.90	30
80	25.60	30.50
44.40	34	27.30
41.70	44.30	33.30
33.30	21.70	28.60
40	33.60	33.30
66.70	6.80	4.30
0	15.50	35.70
60	41.40	29.70
15	21.50	0
0	32.20	8.50
42.80	46.40	26.70
40	18.50	0
33.30	29.80	16.70
50	18.40	21
33.30	30.80	23
25	22.80	26.10
33.30	17.60	17.40
18	18.20	16.60
50	37.30	25
100	36.90	29.40
33.30	12	13.80
50	35.90	45.40
100	45.30	17.60
94.90	23.10	0
77.70	19.70	68.40
95.20	26.60	18.80
100	42.10	40.90
33.30	41.50	50

Figure 63

Evaluation des pourcentages de cellules parasitées
type par type après 1 h de contact in vitro

Les taux d'infection les plus faibles sont rencontrés dans les petits hyalinocytes : 26.2 % chez C.gigas et 13.8 % chez O.edulis ; 27.1 % des grands hyalinocytes de C.gigas contiennent des parasites contre 31.9 % chez O.edulis.

L'examen en microscopie électronique de primocultures d'hémocytes fixés après 30 mn, 1h et 2h de contact avec B.ostreae confirme la localisation intracellulaire des parasites dans tous les types et chez les deux espèces. Les images observées, contact ponctuel avec la membrane hémocytaire (fig.64 et 65, Pl.XII), englobement progressif du parasite par des pseudopodes (fig.66 et 67, Pl.XIII), puis internalisation complète au sein d'une vacuole parasitophore (fig.68, Pl. XIII) suggèrent la phagocytose. Dans la plupart des cas, cette vacuole parasitophore persiste dans tous les types cellulaires après 4h de contact (fig.69, 70, Pl.XIV, fig.73, Pl.XV). Cependant, de rares observations dans les grands hyalinocytes (fig.71 et 72, Pl.XV) montrent le parasite libre dans le cytoplasme ; les cellules-hôtes apparaissent alors assez dégradées ce qui rend alléatoire l'interprétation.

Quelques images de B.ostreae dans les hémocytes de C.gigas évoque la dégradation du parasite (fig.74, Pl.XV), mais ne sont pas systématiques.

2.1.2. Traitement des hémocytes par la cytochalasine B

La cytochalasine B empêche la polymérisation des molécules d'actine, et de ce fait inhibe la locomotion cellulaire et la phagocytose (STUART et al., 1985).

Les pourcentages de cellules parasitées sont évalués type par type sur des hémocytes préalablement traités à la cytochalasine B et comparés pour chaque animal à ceux obtenus sur des hémocytes témoins (fig.75).

PLANCHE XII

Expérimentation in vitro : Pénétration de Bonamia ostreae
dans les hémocytes

Figure 64 :

Crassostrea gigas

Grand hyalinocyte après 30 mn de contact. Le parasite (B.O) est en contact ponctuel avec l'hémocyte qui commence à émettre des pseudopodes (ps)

Micrographie électronique X 15000

Figure 65 :

Crassostrea gigas

Contact entre un petit hyalinocyte et Bonamia ostreae (B.o) après 10 mn d'incubation. La coupe passe par l'appareil de Golgi (Go)

Micrographie électronique X 20000

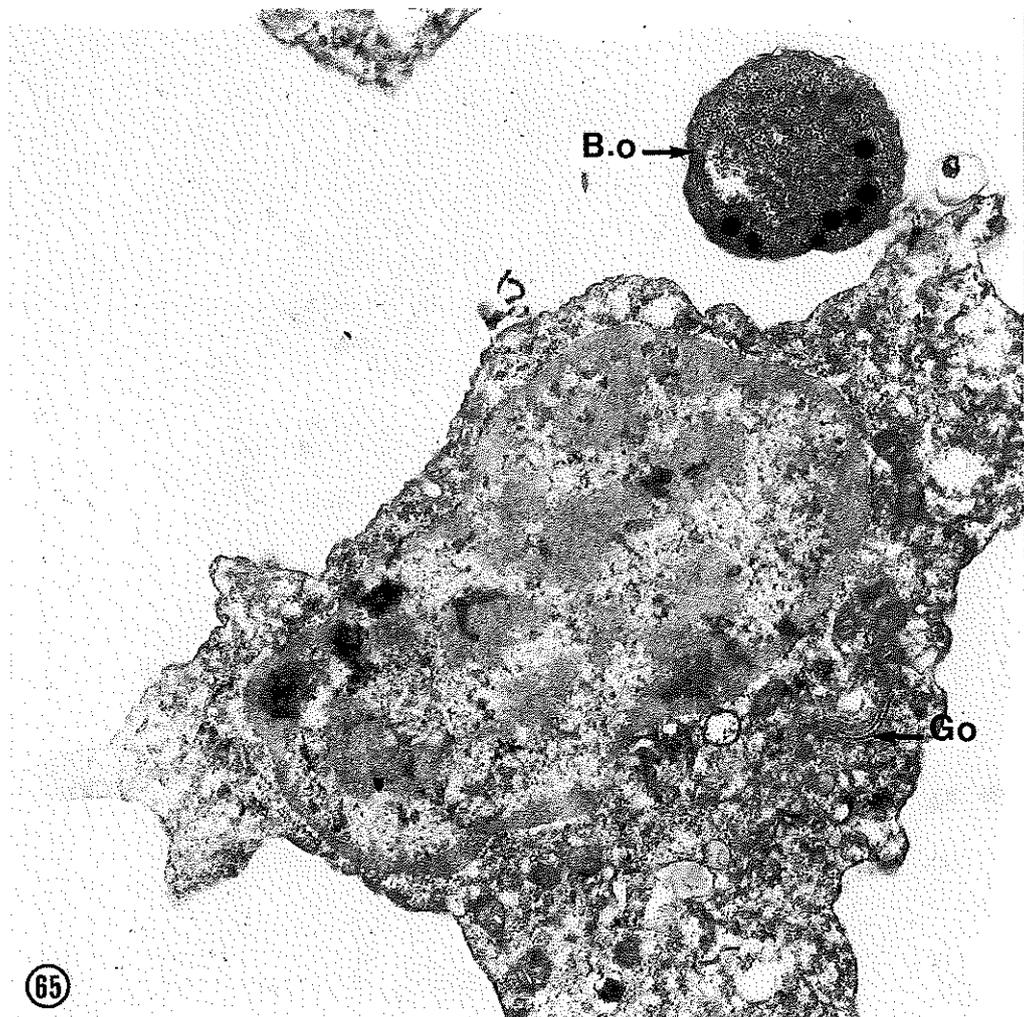
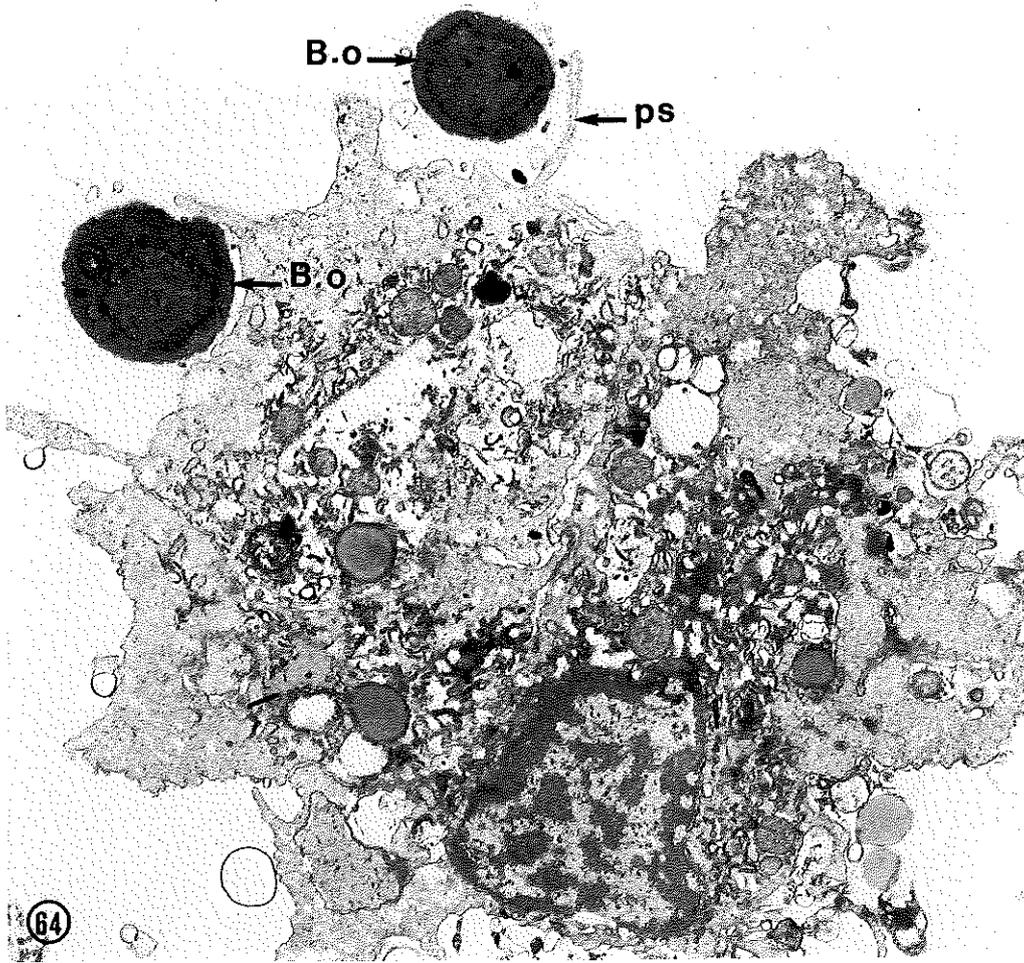


PLANCHE XIII

Expérimentation in vitro : Pénétration de Bonamia ostreae
dans les hémocytes

Figure 66 :

Crassostrea gigas

Fermeture progressive de la vésicule d'endocytose après 1 h
de contact

B.o = Bonamia ostreae

ps = pseudopode

Micrographie électronique X 20000

Figure 67 :

Crassostrea gigas

Internalisation de Bonamia ostreae (B.o) au sein d'une vacuole
parasitophore (va) dans un granulocyte à granules clairs aux
électrons (gc) après 1 h de contact

Micrographie électronique X 15000

Figure 68 :

Crassostrea gigas

Persistance de la vacuole parasitophore (va) dans un petit
hyalinocyte après 2 h de contact

Micrographie électronique X 62500

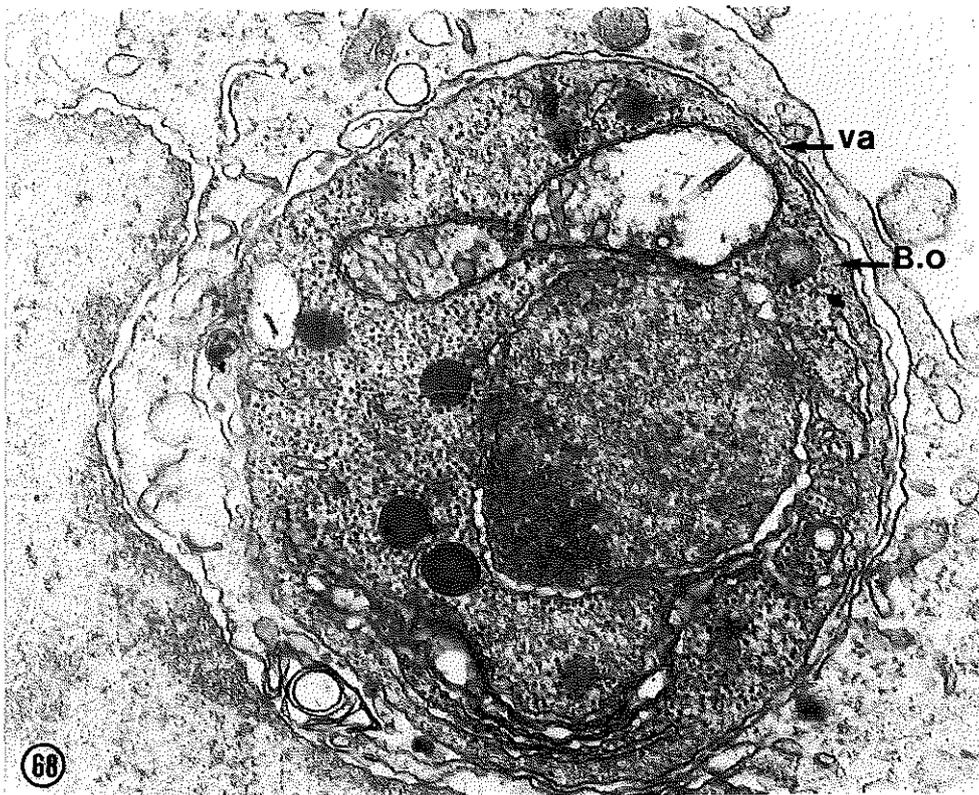
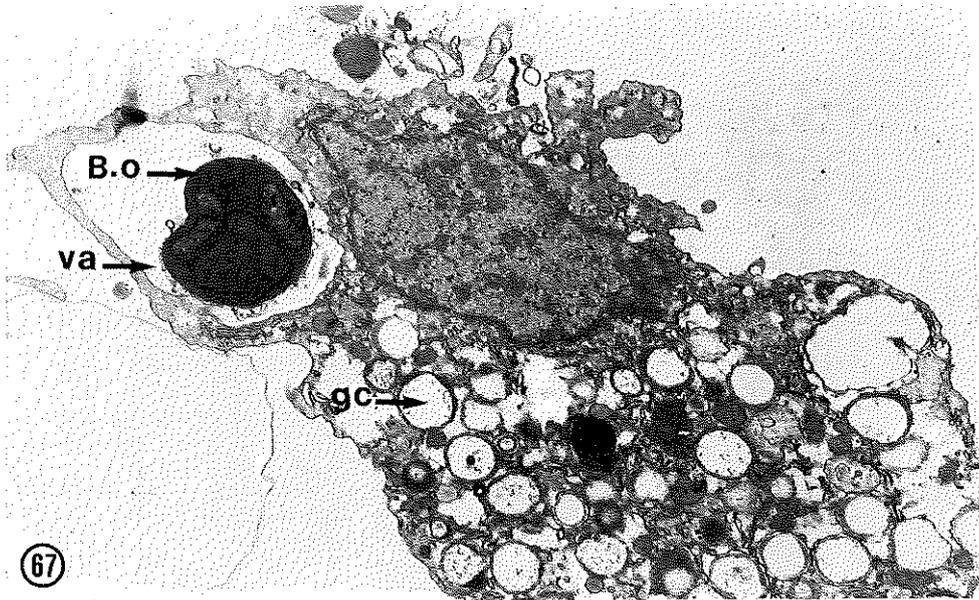
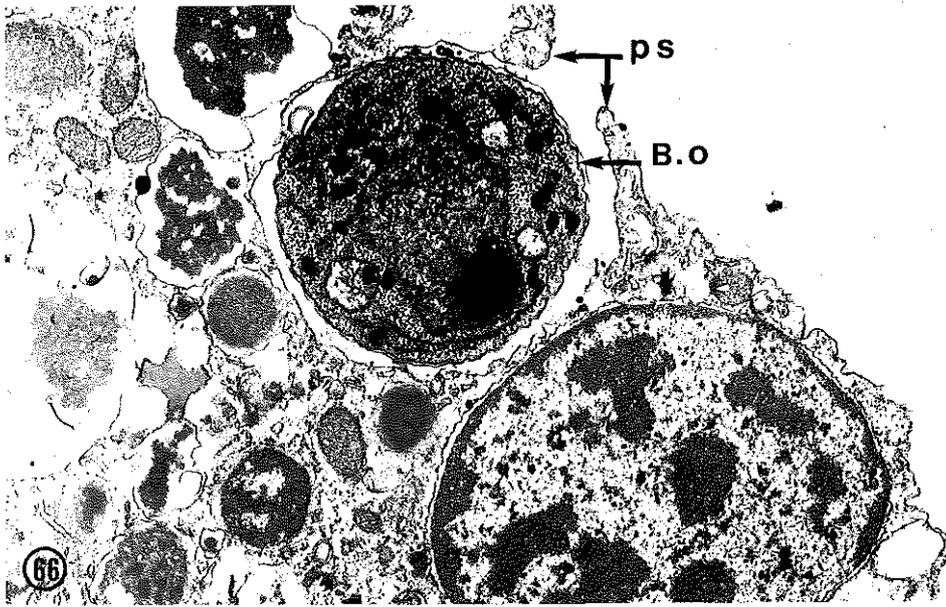


PLANCHE XIV

Expérimentation in vitro : Pénétration de Bonamia ostreae
dans les hémocytes

Figure 69 :

Ostrea edulis - 4 h après infection
Persistence de la vacuole parasitophore (va) dans un granulocyte
contenant des granules uniformément denses aux électrons (gr2)
et des granules à centre dense et cortex clair (gr3)

B.o = Bonamia ostreae

gr1 = granule à centre clair et cortex dense

Micrographie électronique X 17100

Figure 70

Ostrea edulis - 4 h après infection
Petit hyalinocyte

B.o = Bonamia ostreae

mi = mitochondrie

rer = réticulum endoplasmique rugueux

La vacuole parasitophore (va) est ici accolée à la membrane
plasmique du parasite

Micrographie électronique X 18000

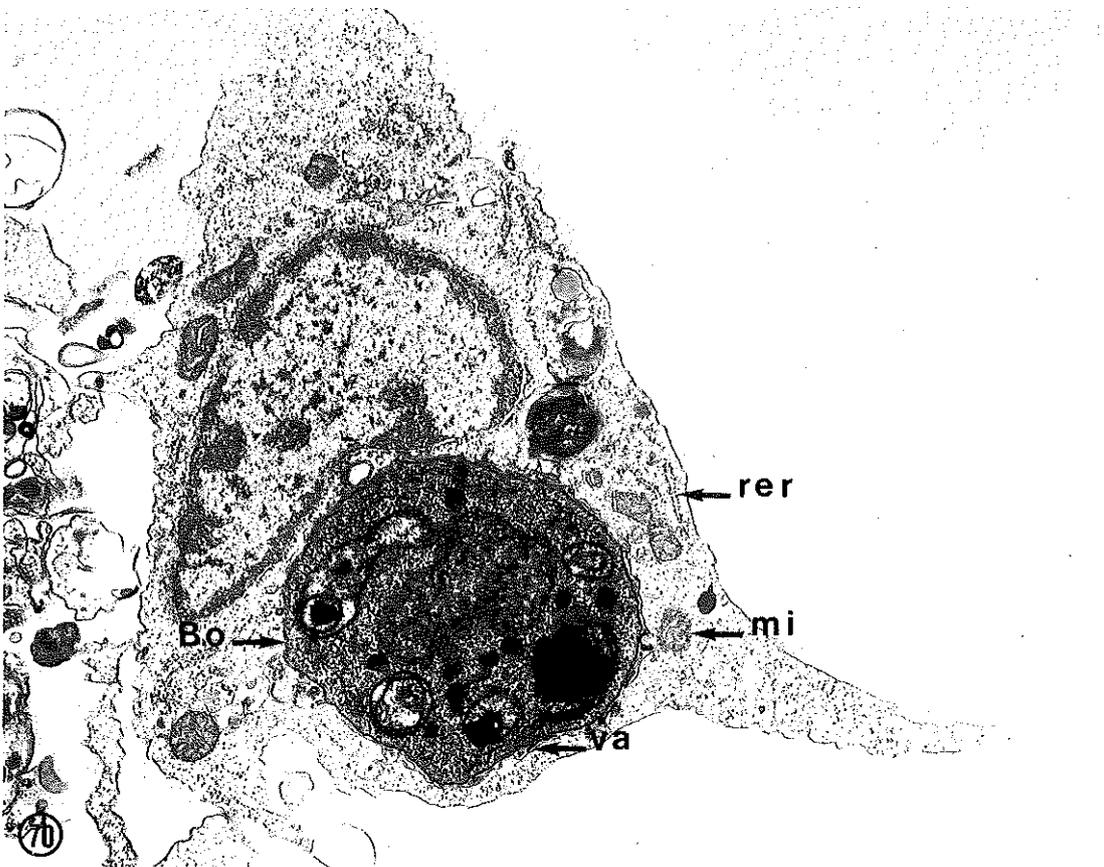
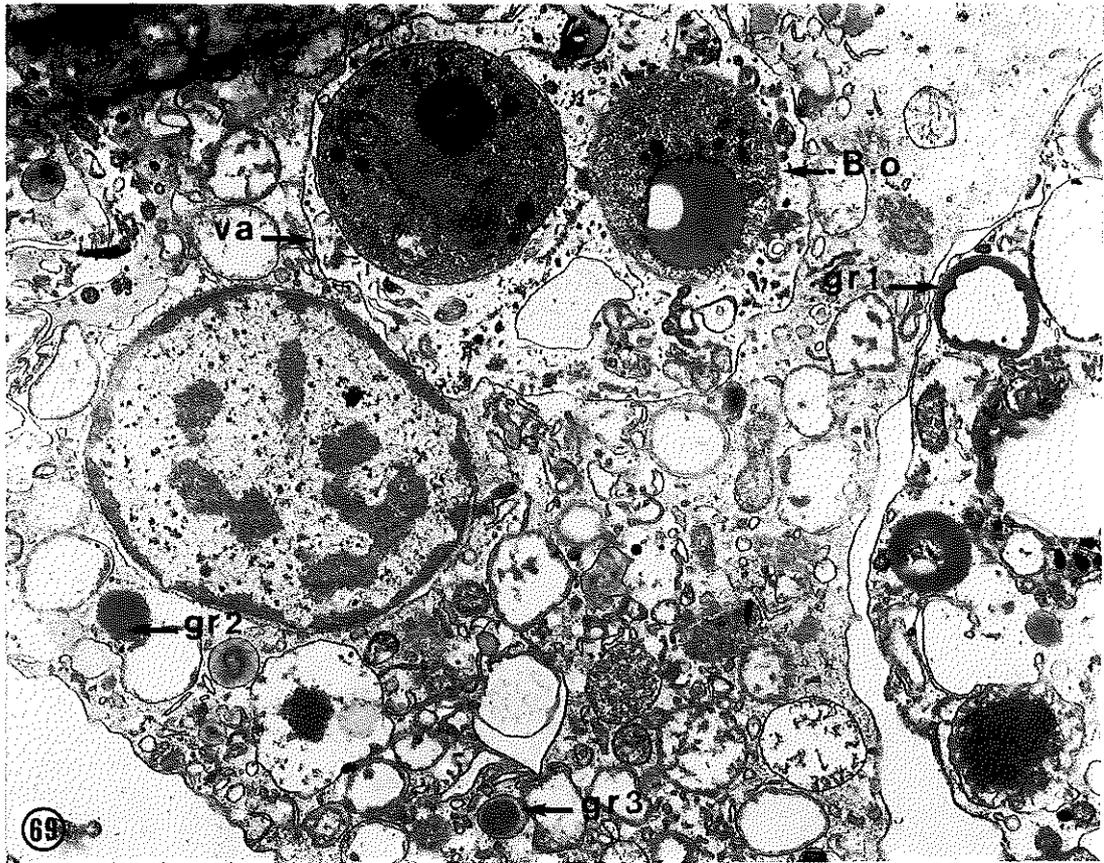


PLANCHE XV

Expérimentation in vitro : Pénétration de Bonamia ostreae
dans les hémocytes

Figure 72 :

Plus fort grossissement
du parasite de la
figure 71

M.électronique X 22500

Figure 71 :

Ostrea edulis 4 h après infection
Grand hyalinocyte. B.ostreae semble
libre dans le cytoplasme mais la
cellule hôte est assez dégradée

M.électronique X 15000

Figure 74 :

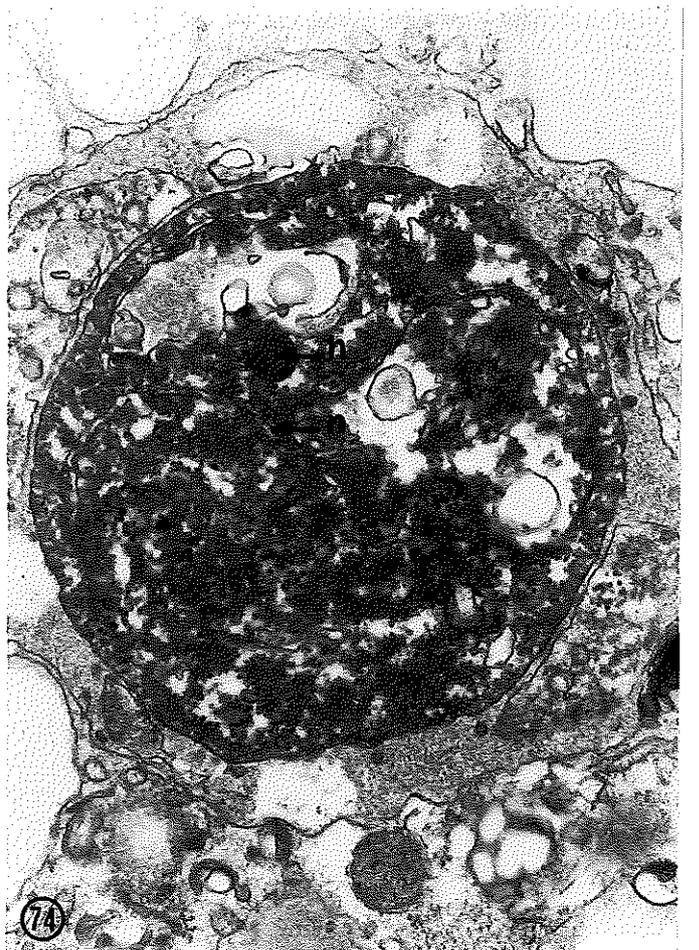
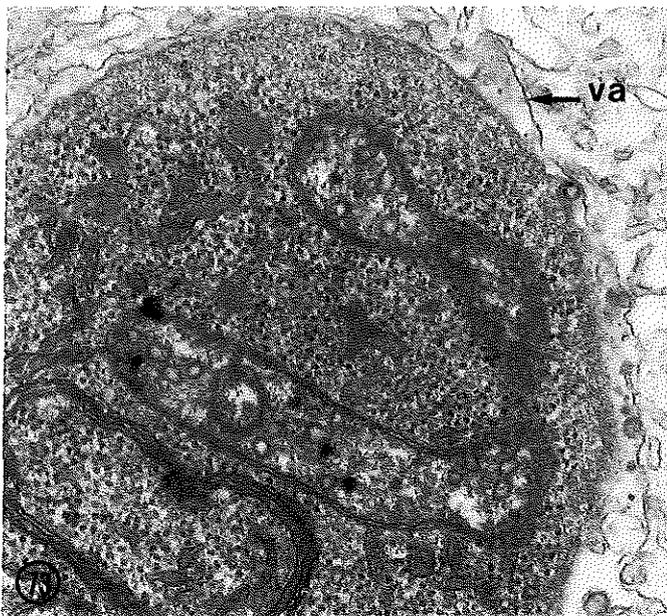
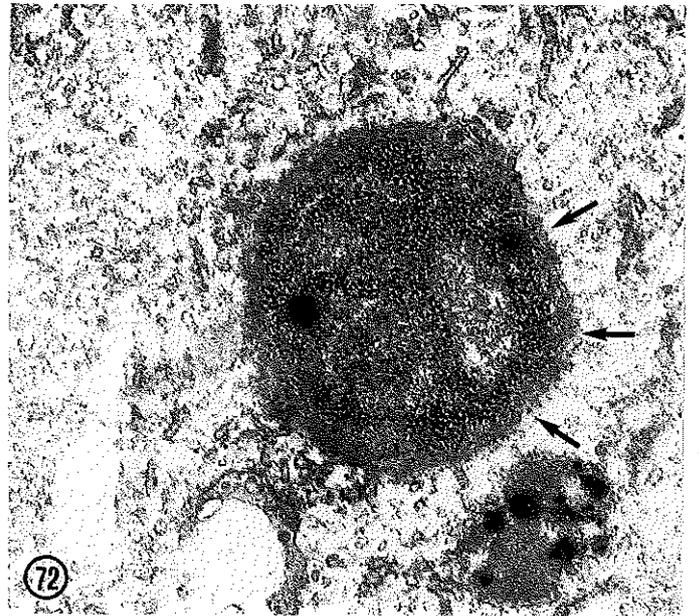
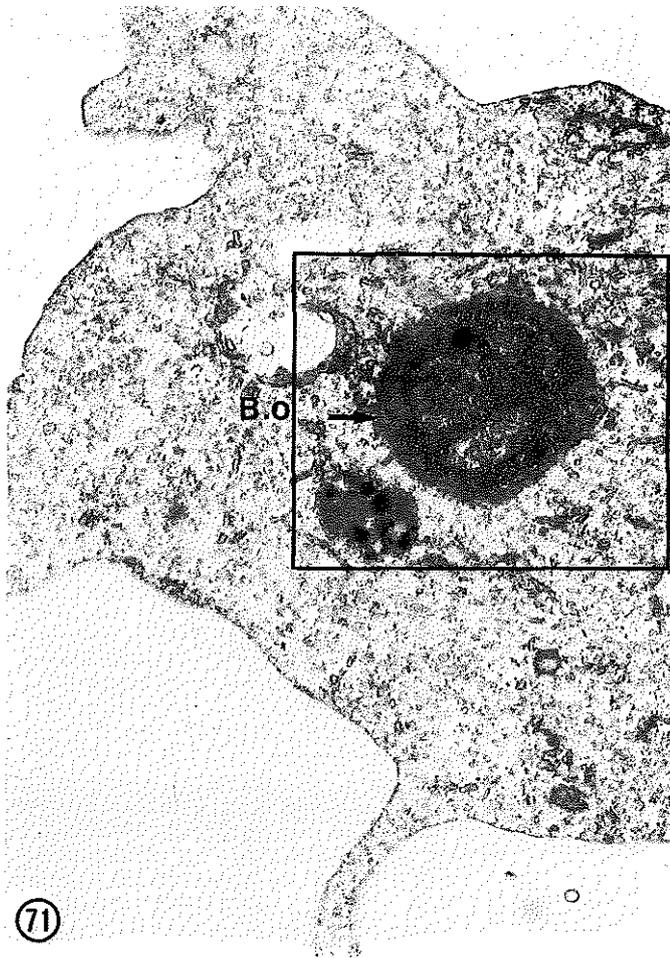
Crassostrea gigas
Vacuole parasitophore contenant
un parasite dégradé où l'on
identifie encore un haplosporosome (h)

M.électronique X 41500

Figure 73 :

Ostrea edulis 4 h après infection
Grand hyalinocyte. Dans ce cas,
la vacuole parasitophore (va) subsiste

M.électronique X 48500



<u>Crassostrea gigas</u>					
G		GH		PH	
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
66.60	0	44.60	16.60	30.40	12.90
55.50	50	7.20	30.90	40.90	0
66.60	62.50	17.90	30.60	30.80	6.70
76.40	0	15	0	13	15.55
75	8.30	32.70	3.80	50	3.20
62.50	0	51.80	0	46.10	0
85.70	66.60	7	36.10	15.40	4
66.60	0	15.60	1.90	9.40	0
76.19	33.30	20	36	35.70	25.50
100	20	14.50	8.30	33.30	0
69.20	0	25.90	6.70	30	10
80	20	25.60	17	30.55	11.40

P = 0.00
P = 0.3
P = 0.00

<u>Ostrea edulis</u>					
G		GH		PH	
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
55.50	0	26.90	0	26.15	1.60
27.30	36.40	9.40	4.40	5.60	0
23.10	10	34.80	3.78	2.40	0
38.90	0	23.80	2.10	22.50	2
32.70	0	0	0	0	2.10
30.80	0	9.80	0	17.40	0
100	100	13.04	14.30	11.80	1.10
18.70	21.70	19.04	27.70	11.50	5.10
20	9.10	16.90	5	19.40	2
37.50	0	28.60	0	15.80	3.60
0	0	26.50	9.80	4.70	6.50

P = 0.01
P = 0.009
P = 0.004

P : Test de comparaison de séries appariées

Figure 75 : Traitement des hémocytes par la cytochalasine B

<u>Crassostrea glgas</u>					
G		GH		PH	
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
44.44	40	34.04	33.33	27.27	25.53
41.66	25	44.29	41.55	33.33	9.10
33.33	40.50	21.69	3.66	28.57	7.69
40	0	33.56	8.24	33.33	9.69
66.66	12.50	6.75	1.30	4.35	13.33
0	0	15.50	3.45	35.70	12.82
60	57.14	41.38	55	29.73	30.30

P = 0.11 P = 0.18 P = 0.06

<u>Ostrea edulis</u>					
G		GH		PH	
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
20	15.60	65.95	30.43	30.23	11.11
54.16	26.66	43.48	12.12	8.82	0
51.28	9.30	41.02	22.86	4.55	16.66
57.14	0	43.75	28.58	29.51	7
54.54	47.05	45.61	41.66	33.33	31.43
25	38.46	46.34	25.50	17.14	2.77
70	17.65	39.02	10.25	12.25	4.54
0	20	43.10	19.35	17.07	0
39.13	19.05	37.50	27.77	6.66	4

P = 0.006 P = 0.000 P = 0.003

P : Test de comparaison de séries appariées

Figure 76 : Traitement de Bonania ostreae par la cytochalasine B

Le traitement des hémocytes provoque une baisse des taux d'infection qui passent en moyenne chez O.edulis de 33 % à 9 % dans les granulocytes, de 19 % à 5 % dans les grands hyalinocytes et de 13 % à 2 % dans les petits hyalinocytes, et parallèlement chez C.gigas de 75 % à 13 %, de 22 % à 16 % et de 30 % à 7 %. Les différences sont analysées statistiquement par un test de signification appliqué à des séries appariées à l'aide d'un logiciel STATITCF. Ce test montre que le traitement des hémocytes par la cytochalasine B entraîne une diminution significative des taux d'infection quelle que soit l'espèce, sauf dans les grands hyalinocytes de C.gigas. Le DMSO, utilisé comme solvant de la cytochalasine B est sans effet sur les taux d'infection.

2.1.3. Traitement de B.ostreae par la cytochalasine B

La figure 76 présente les résultats de l'expérience parallèle à la précédente dans laquelle les taux d'infection sont estimés lorsque le parasite est traité par la cytochalasine B avant sa mise en contact avec des hémocytes non traités et comparés à des taux d'infection témoin. La diminution des taux d'infection observée lorsque B.ostreae est prétraité à la cytochalasine B, soit en moyenne 17.4 % dans les granulocytes, 7.9 % dans les grands hyalinocytes, 8.2 % dans les petits hyalinocytes chez C.gigas et respectivement 24.2 %, 21.2 et 10 % chez O.edulis, est non significative chez C.gigas, alors qu'elle est significative chez O.edulis, et pour tous les types cellulaires, selon le même test statistique que précédemment.

2.2. Phénomènes de reconnaissance : étude des récepteurs impliqués

2.2.1. Rôle opsonisant de l'hémolymphe

Afin de déterminer l'intervention de facteurs humoraux dans la phagocytose de B.ostreae, les taux d'infections sont comparés lorsque l'on met le parasite en contact, soit avec l'hémolymphe complète, soit avec des hémocytes lavés et remis en suspension dans de l'eau de mer filtrée.

L'analyse statistique des données obtenues (fig.77) montre que les résultats ne sont pas significativement différents chez C.gigas pour les trois catégories d'hémocytes, en présence ou en l'absence d'hémolymphe.

Par contre, la baisse des taux d'infections chez O.edulis est significative dans les granulocytes et les petits hyalinocytes en l'absence d'hémolymphe, alors qu'elle ne l'est pas dans les grands hyalinocytes.

2.2.2. Intervention d'épitopes membranaires de B.ostreae

. Localisation d'un épitope membranaire

L'anticorps monoclonal anti-B.ostreae 20B2, utilisé comme marqueur dans une technique d'immunofluorescence indirecte donne des images qui suggèrent que l'épitope reconnu sur le parasite se localise sur la membrane plasmique (fig.78, Pl.XVI).

Cette hypothèse a été vérifiée par immunomarquage à l'or colloïdal de coupes ultra-fines congelées de coeur d'O.edulis atteinte de bonamiose. Aucun marquage n'est observé lorsque les coupes sont incubées avec un anticorps témoin de souris anti-amylase au lieu de l'anticorps 20B2 comme anticorps primaire. De même, il ne se produit aucun marquage si les coupes sont incubées seulement avec la protéine A-gold.

<i>Crassostrea gigas</i>					
G		GH		PH	
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
15	11	21.50	15.50	0	6
0	0	32.20	8.60	8.5	13
42.80	5.90	46.40	15	16.21	0
40	16.60	18.51	16.20	26.66	30
33.30	50	29.76	28	0	8.3
50	37.50	18.42	14.66	16.66	11.8
33.30	50	30.76	19.44	21.05	3.8
25	27.20	22.78	10	23	5.3
33.30	66.60	17.56	30	26.08	21.4
18	25	18.18	14.28	17.4	3.4

P = 0.9

P = 0.06

P = 0.2

<i>Ostrea edulis</i>					
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
28.60	40	50	1.85	1.85	2.70
31.20	15.40	19.23	17.30	17.30	10.71
73.30	58.33	46.15	6.80	6.80	7.55
54.50	16.66	47.70	2.22	2.22	12.50
36.36	50	20	4.16	4.16	2.56
33.33	30	9.60	13.88	13.88	20
80.76	51.35	36	12.50	12.50	9.68
53.80	0	22.38	10	10	0
54.16	50	8.20	13.33	13.33	17.65
45	15.40	34.90	5.88	5.88	7.70
65.71	55.55	52.90	9.67	9.67	8.33
33.33	22.70	20.80	2.74	2.74	4.35

P = 0.02

P = 0.5

P = 0.08

P : Test de comparaison de séries appariées

Figure 77 : Intervention de facteurs humoraux dans la phagocytose de *Bonamia ostreae*

Témoins : en présence d'hémolymphe
 Expériences : en l'absence d'hémolymphe

PLANCHE XVI

Mise en évidence d'épitopes membranaires

Figure 78 :

Apposition de coeur d'huître parasitée
Immunofluorescence indirecte avec l'anticorps monoclonal
anti Bonamia ostreae 20B2

Micrographie photonique X 1250

Figure 79 :

Coupe ultra-fine congelée de coeur d'huître parasitée, Immunogold.
Dans la vacuole parasitophore (va) d'un hémocyte contenant un
parasite (B.o), les flèches indiquent les particules d'or colloïdal
qui signalent la fixation de l'anticorps monoclonal 20B2

Micrographie électronique X 36000

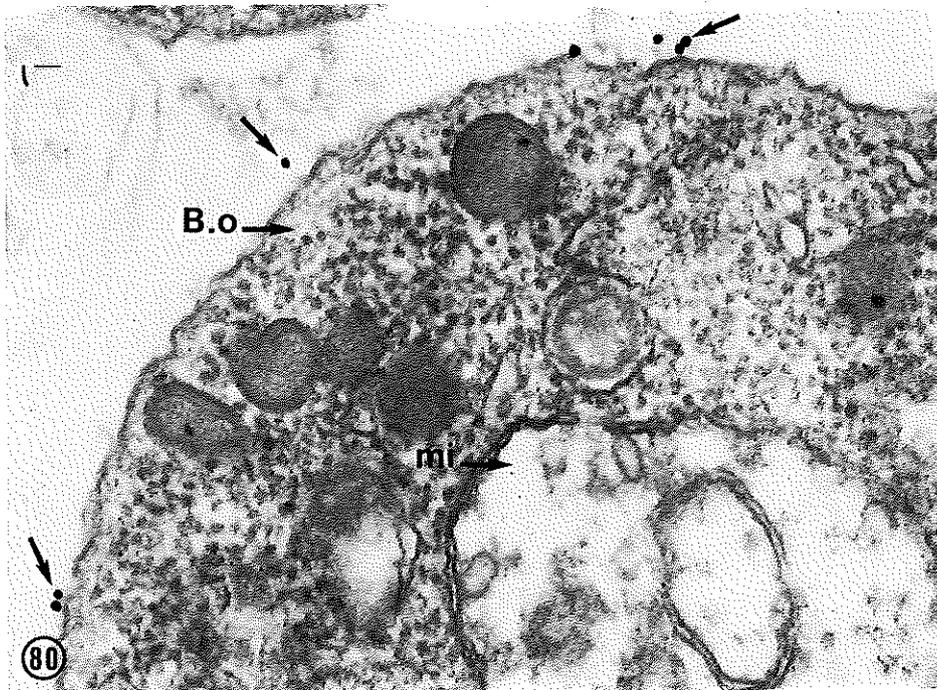
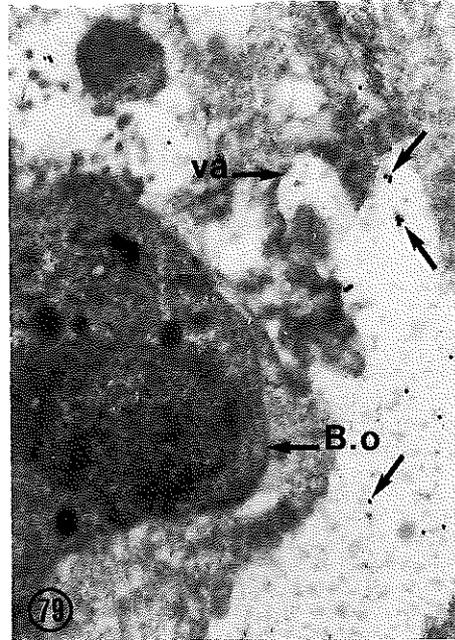
Figure 80 :

Coupe ultra-fine congelée de coeur d'huître parasitée, Immunogold.
Détail d'un parasite (B.o)

mi = mitochondries

Les flèches indiquent les sites de fixation de l'anticorps
monoclonal 20B2 sur la membrane du parasite et dans la
vacuole parasitophore

Micrographie électronique X 100000



Lorsque l'anticorps monoclonal 20B2 est appliqué, suivi de la protéine A-gold, les particules d'or sont observées sur la membrane plasmique de B.ostreae (fig.80, Pl.XVI), mais aussi dans la vacuole parasitophore (fig.79, Pl.XVI). Aucun marquage n'est observé sur les tissus adjacents.

. Traitement du parasite par des anticorps monoclonaux 20B2 + 15C2

Ces anticorps sont utilisés préalablement au contact hémocytes - parasite afin de masquer des épitopes membranaires susceptibles de jouer un rôle dans les phénomènes de reconnaissance. Les taux d'infection sont plus faibles lorsque le parasite est ainsi prétraité (fig.81). Le test statistique de comparaison de séries appariées montre que la diminution observée est significative chez O.edulis et C.gigas. Elle est significative pour les grands hyalinocytes des deux espèces et pour les petits hyalinocytes de C.gigas seulement.

2.2.3. Reconnaissance liée aux interactions sucre-lectine

Des données récentes (SHARON et OFEK, 1986 ; SHARON, 1987) mettent en évidence une reconnaissance spécifique entre phagocytes et cellules-cibles par l'intermédiaire de protéines membranaires de type lectine, présentes sur l'une des cellules et capable de se combiner à des sucres complémentaires à la surface de l'autre cellule, la liaison pouvant entraîner la phagocytose. Cette hypothèse a été envisagée pour le modèle B.ostreae-hémocytes.

. Traitement des hémocytes par des sucres simples

Les sucres sont choisis sur la base de leur reconnaissance la plus fréquente par les lectines de bivalves et appliqués en panel comprenant

<u>Crassostrea gigas</u>					
G		GH		PH	
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
60	0.25	16.70	17.50	9	0
22.20	71.40	25.70	26.40	0	0
100	50	35	25.20	0	0
100	0	21.70	7.50	0	0
94	100	24.70	18.30	20	0
36.40	37.50	28	21.50	15.80	5.20
100	100	27.40	16.20	0	0
50	62.50	47	24.20	25	0

P = 0.3
P = 0.01
P = 0.05

<u>Ostrea edulis</u>					
Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %	Témoins %	Expériences %
0	100	34	17.20	0	0
63.60	13.30	33.70	22.40	5.50	0
49.20	0	30.50	21.10	0	0
100	0	36	14.70	11.10	12.50
100	20	24	6.40	0	0
20	0	19.40	5.70	0	0
88.20	50	21.70	11.20	7	0
68.57	44.40	5.70	8.60	0	0

P = 0.21
P = 0.04
P = 0.2

P : Test de comparaison de séries appariées

Figure 81 : Traitement de Bonamia ostreae par un mélange d'anticorps monoclonaux 20 B2 et 15C2

du glucose, du mannose, du fucose et des N-acétyl glucosamine et galactosamine. La figure 82 donne les résultats des taux d'infection dans les trois types cellulaires des deux espèces avec des hémocytes témoins et des hémocytes dont les lectines membranaires sont liées à des oligosaccharides. Il n'y a pas d'effet évident du traitement sur les taux d'infection, ce qui est confirmé par l'analyse statistique.

. Traitement de B.ostreae par des sucres simples

Le même mélange de sucres est utilisé pour pré-incuber B.ostreae. Après lavage, les parasites sont utilisés pour infecter des hémocytes normaux. Dans ce cas, on observe dans les deux espèces une diminution des taux d'infection quelle que soit la population hémocytaire considérée (fig.83). Cette diminution est statistiquement significative, pour les grands et petits hyalinocytes de C.qiqas et non significative pour les granulocytes ; elle est aussi significative pour les granulocytes et les petits hyalinocytes d'O.edulis alors qu'elle est non significative pour les grands hyalinocytes de cette espèce.

3. PHENOMENES DE SURVIE

La comparaison des résultats expérimentaux in vivo montre que C.qiqas est réfractaire à la bonamiose alors qu'O.edulis est sensible. Or, in vitro, B.ostreae est internalisé par les cellules sanguines des deux espèces ce qui suggérait une destruction du parasite par les hémocytes de C.qiqas et une survie dans ceux d'O.edulis. L'analyse des phénomènes de survie a été conduite du point de vue des capacités cytocides oxygène dépendantes mises en évidence chez les hémocytes.

<u>Crassostrea gigas</u>					
G		GH		PH	
Témoins	Hémocytes traités	Témoins	Hémocytes traités	Témoins	Hémocytes traités
71.40		37.30		16.60	5.70
57.10	50	36.90	53	25	4.20
62.50	100	12	33.30	29.40	19.04
28.60	33.30	35.90	45.30	13.80	20
66.70	50	45.30	37.90	45.40	21.43
100	100	23.10	48.30	17.60	11.60
93.30	94.90	19.70	17.30	0	0
0		26.60		68.40	28.60
75	77.70	42.10	27.80	18.75	7.10
92.30	95.20	41.50	24.20	40.90	0
89.20	100	29.60	25.90	50	18.20
78.60	33.30	47	36.40	38.90	28.60

P = 0.4

P = 0.3

P = 0.15

<u>Ostrea edulis</u>					
G		GH		PH	
Témoins	Hémocytes traités	Témoins	Hémocytes traités	Témoins	Hémocytes traités
68.90	50	50.90	64.90	14.20	39.10
33.30	0	25.90	1.20	8.30	0
33.30	39.30	10.53	43.90	0	9.70
31.60	4.20	63.16	50	20.60	23.50
26.70	58.30	48.72	60	19.60	17.60
84.20		24.40		25	
80	92.30	40	55.50	4.30	13.80

P = 0.3

P = 0.7

P = 0.8

P : Test statistique de comparaison de séries appariées

Figure 82 : Traitement des hémocytes par un mélange de sucres simples

<u>Crassostrea gigas</u>					
G		GH		PH	
Témoins	Bonamia traité	Témoins	Bonamia traité	Témoins	Bonamia traité
71.40	35.70	37.30	31.40	16.60	31.20
57.10	53.80	36.90	39.70	25	5.26
62.50	50	12	18.20	29.40	8.60
28.60	60	35.90	41.30	13.80	10.50
66.70	80	45.30	35.50	45.40	42.80
100	0	23.10	18.40	17.60	21.40
93.30	91.20	19.70	17.80	0	0
0	0	26.60	19.70	68.40	39.30
75	59.10	42.10	20.30	18.75	6.25
92.30	94.40	41.50	14.10	40.90	13.30
89.20	69.20	29.60	21.10	50	29.40
78.60	62.50	47	25	38.90	30.40

P = 0.2
P = 0.04
P = 0.003

<u>Ostrea edulis</u>					
G		GH		PH	
Témoins	Bonamia traité	Témoins	Bonamia traité	Témoins	Bonamia traité
68.90	20	50.90	42	14.20	12
33.30	0	25.90	14.10	8.30	0
33.30	5.90	10.53	10.50	0	3.60
31.60	10	63.16	11.80	20.60	2.60
26.70	44.40	48.72	41.20	19.60	10.52
84.20	3	24.40	31.25	25	4.25
80	33.30	40	38.78	4.30	9.10

P = 0.02
P = 0.2
P = 0.04

P : Test de comparasion de séries appariées

Figure 83 : Traitement de Bonamia ostreae par un mélange de sucres simples

3.1. Activités enzymatiques de détoxification chez B.ostreae

3.1.1. Phosphatase acide

Le principe de la détection d'une activité phosphatasique acide au niveau ultrastructural est le même que celui utilisé pour les hémocytes.

Pratiquée sur une suspension de B.ostreae purifié, la réaction donne lieu à la formation d'un produit insoluble qui se localise au niveau du corps dense (fig.84.Pl.XVII).

3.1.2. Catalase

Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, lors d'une réaction où H_2O_2 est à la fois donneur et accepteur d'électrons. En milieu alcalin, elle est partiellement dissociée en sous-unités de peroxydase et peut ainsi être détectée par l'oxydation de la DAB. L'incubation de B.ostreae dans le milieu de Novikoff et Goldfisher donne lieu à la formation cytoplasmique d'un précipité brun révélateur d'une activité catalase. Si le milieu contient du 3-amino-1,2,4-triazole, aucun précipité ne se développe : la sensibilité de la réaction à ce puissant inhibiteur de catalase confirme la présence d'une activité enzymatique de ce type chez B.ostreae (fig.85, Pl.XVII).

3.2. Interférence de B.ostreae avec le "Respiratory Burst"

La réponse des hémocytes en chimioluminescence est étudiée lorsque B.ostreae est utilisé comme stimulant. La figure 86 présente les courbes obtenues lorsque B.ostreae vivant ou tué est phagocyté par les hémocytes des deux espèces. Des témoins hémocytes non stimulés et hémocytes stimulés par la zymosan sont inclus dans l'expérience. Aucun pic d'activité n'est enregistré lors de la phagocytose de B.ostreae vivant

PLANCHE XVII

Caractérisations d'activités enzymatiques
chez Bonamia ostreae

Figure 84 :

Phosphatase acide
Coupe ultra-fine non contrastée à partir d'un culot de
Bonamia ostreae purifié

h = haplosporosome
mi = mitochondrie
cd = corps dense

Les flèches indiquent le précipité de phosphate de plomb formé
sous l'action de la phosphatase acide

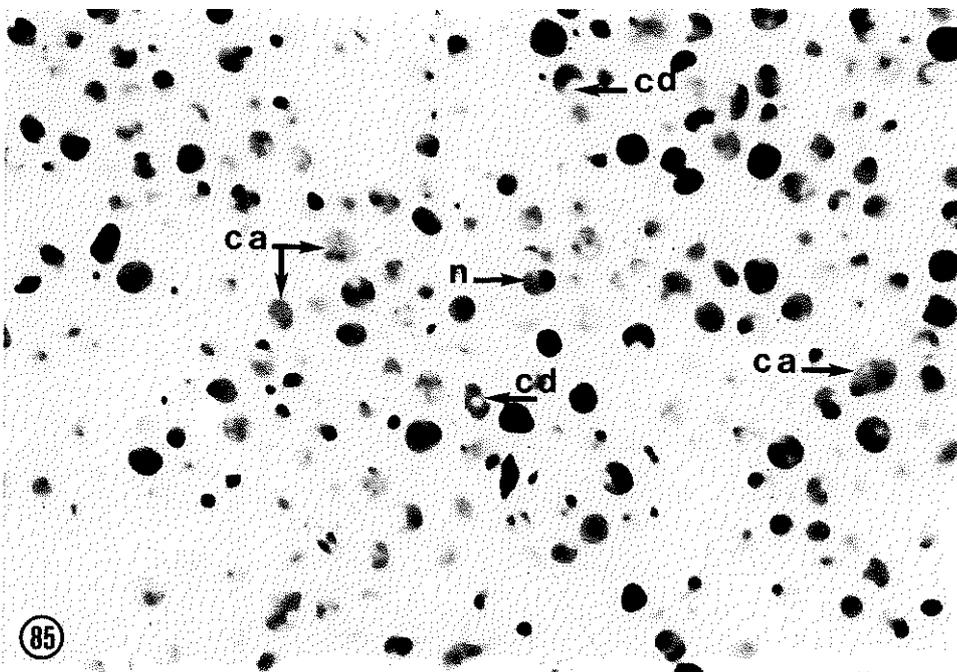
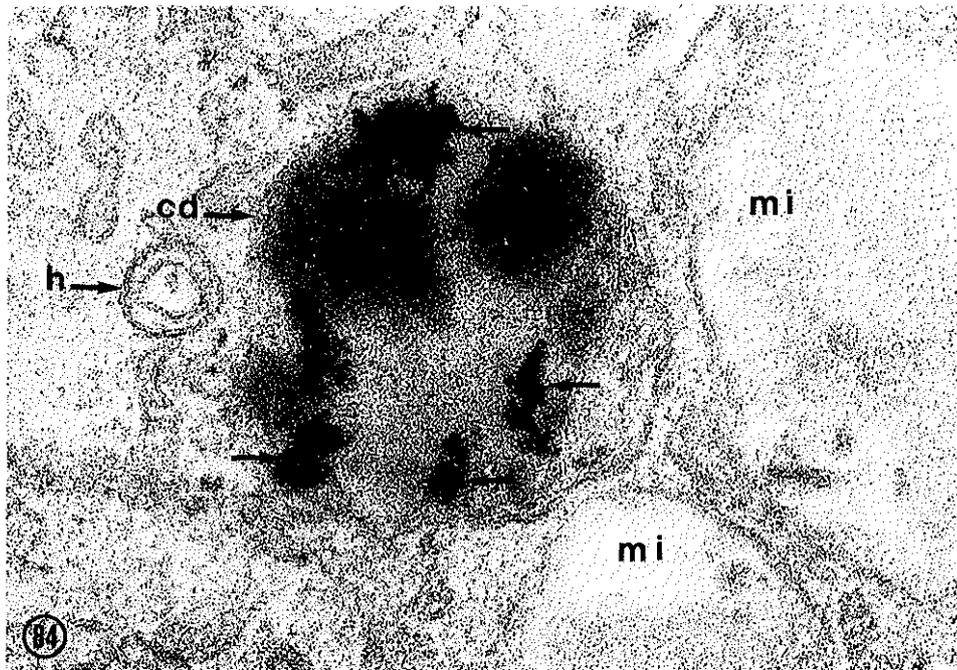
Micrographie électronique X 150000

Figure 85

Catalase
Frottis de Bonamia purifié
Les sites d'activité catalase se localisent dans le cytoplasme du
parasite qui prend un aspect granuleux

n = noyau
cd = corps dense

Micrographie photonique X 1250



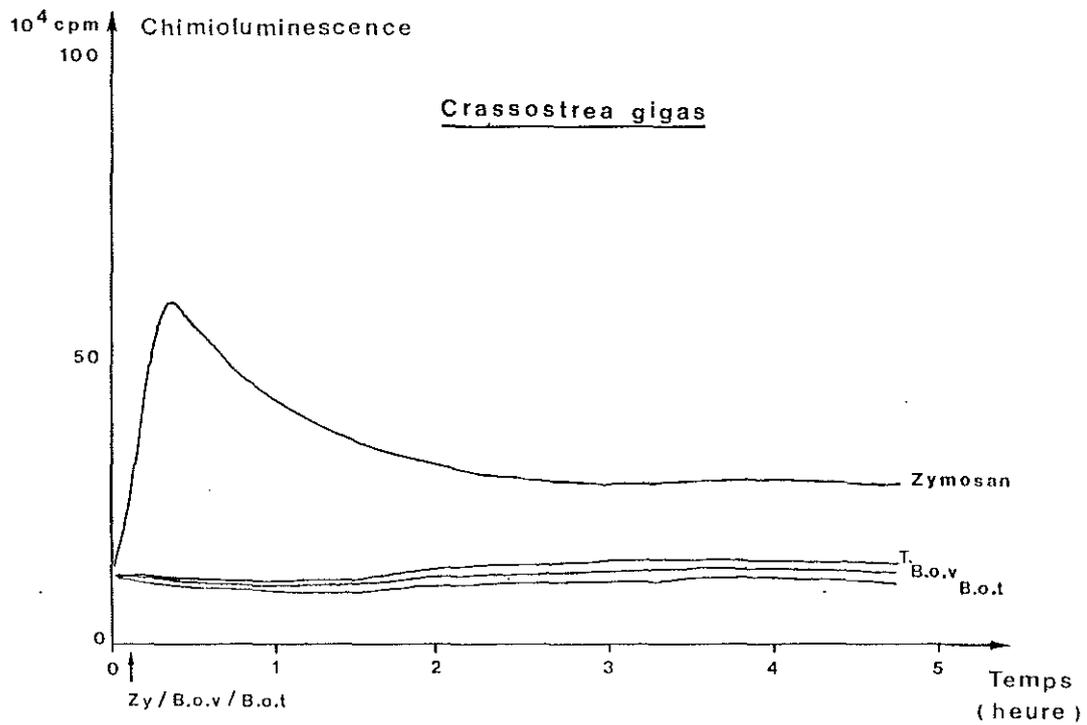
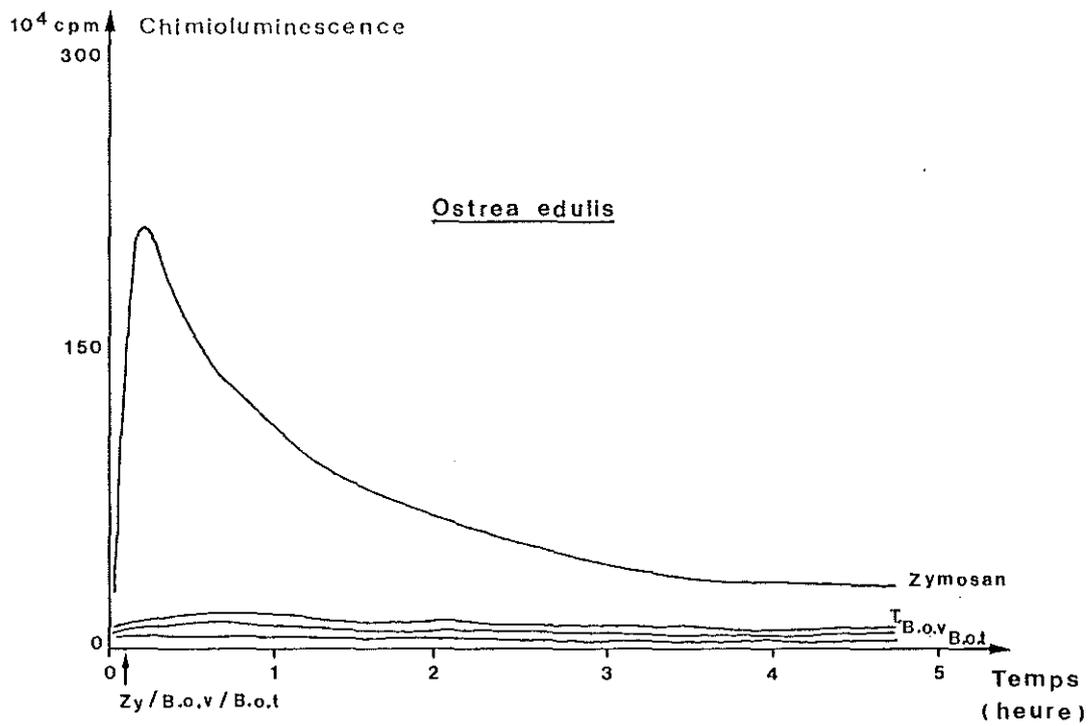


Figure 86 : Chimiluminescence amplifiée par le luminol de 2×10^5 hémocytes d'O.edulis et de C.gigas phagocytant B.ostreae
 T : Témoin
 B.o.t : B.ostreae tué
 B.o.v : B.ostreae vivant

ou tué et ceci dans les deux espèces.

4. DISCUSSION

Les mécanismes par lesquels les parasites des bivalves marins s'établissent dans l'hôte et induisent la pathogénèse restent peu étudiés. La disposition d'un modèle d'étude in vitro B.ostreae-hémocytes (MOURTON, 1987) a permis d'aborder ces questions avec une démarche expérimentale inspirée des recherches effectuées en médecine humaine sur des protozoaires parasites intracellulaires tels que Leishmania donovani, Trypanosoma cruzi, ou Toxoplasma gondii, capables de survivre dans des macrophages.

En effet, l'hémocyte, cellule-hôte de B.ostreae présente des caractéristiques qui le rapprochent du macrophage.

Dans les deux espèces, O.edulis et C.gigas, le mécanisme d'entrée, dont le déroulement a été suivi en ultrastructure, se révèle sensible à la cytochalasine B : la diminution significative des taux d'infection par traitement des hémocytes avec cette molécule indique une phagocytose dirigée par l'hôte (MOULDER, 1985) dans les deux cas. Chez O.edulis seulement, le traitement du parasite par la cytochalasine B entraîne une diminution significative des taux d'infection : il y aurait donc pour cette espèce, une possible pénétration active, les deux modes d'entrée pouvant par ailleurs être simultanés comme pour T.gondii (WERK, 1985). Des études complémentaires devront être entreprises pour pouvoir établir si B.ostreae induit sa propre endocytose.

C'est de cette façon que Rickettsia tsutsugamushi et R.prowazekii entrent dans les cellules hôtes par un mécanisme sensible à la cytochalasine B qui ressemble à la phagocytose. Cependant, elles ne pénètrent plus si elles sont inactivées par la chaleur, le formaldéhyde

ou la lumière ultra-violette (COHN et al., 1959 ; WALKER et WINKLER, 1978). D'autre part, le traitement de T.cruzi par un inhibiteur de synthèse, le cycloheximide, réduit de 80 % l'internalisation du parasite (ZINGALES et COLLI., 1985) pour lequel le concept de phagocytose induite est également valable.

Les expérimentations entreprises mettent en évidence des interactions de type récepteur-ligand au niveau des membranes plasmiques des hémocytes et du parasite. Ces interactions conditionnent l'internalisation ou non de B.ostreae. De telles études présentent un double intérêt : celui de définir les processus d'adaptation du parasite à sa cellule hôte, mais aussi celui plus général de la reconnaissance immune chez les Mollusques bivalves.

Chez C.gigas, la séquence des évènements membranaires peut conduire à une interprétation relativement simple : le parasite est inactif et la phagocytose semble se produire par l'intermédiaire d'un ligand de type lectine présent sur B.ostreae de spécificité glucose, mannose, fucose, N-acétyl glucosamine ou N-acétyl galactosamine, le récepteur hémocytaire glycoprotéique ou glycolipidique comportant un ou plusieurs de ces oligosaccharides en position terminale. Le blocage d'épitopes membranaires masqués par les anticorps monoclonaux 20B2 et 15C2 influence significativement les taux de phagocytose. Aucun des autres récepteurs étudiés n'influence significativement le taux de phagocytose : s'il existe un récepteur de type lectine à la surface des hémocytes, susceptible d'être bloqué par les sucres utilisés, il n'intervient pas, pas plus que n'intervient un récepteur pour un ligand humoral agissant comme opsonine. Chez O.edulis, le phénomène d'entrée est plus complexe, puisqu'il met en évidence une phagocytose initiée par l'hôte, mais aussi une phagocytose induite par B.ostreae. Comme chez

C.gigas, un récepteur hémocytaire de membrane de type lectine de membrane ne semble pas jouer alors qu'un tel récepteur est opérant sur le parasite. Il faut rappeler qu'un récepteur de type agglutinine du germe de blé (WGA) a été mis en évidence sur les promastigotes de Leishmania mexicana (BRAY, 1983) et est supposé sur les trypomastigotes de T.cruzi (ZINGALES et COLLI, 1985). D'autre part, de nombreuses espèces bactériennes comportent des lectines qui interagissent avec des structures membranaires contenant des sucres sur les phagocytes et provoquent une "lectinophagocytose" (OFEK et SHARON, 1988). La spécificité du récepteur de type lectine de B.ostreae devra être précisée par des études d'inhibition réalisées en traitant le parasite avec les sucres préalablement utilisés en solutions séparées.

Des récepteurs d'une nature différente paraissent impliqués dans l'internalisation de B.ostreae par les hémocytes de l'huître plate. La diminution significative des taux d'infection en l'absence d'hémolymphe suggère chez O.edulis l'intervention de facteurs humoraux facilitant l'internalisation. Des études ultérieures devront établir s'il s'agit de lectines plasmatiques, puisque ces molécules sont présentes chez les Mollusques et fortement impliquées dans l'opsonisation. Les lectines exogènes facilitent l'ingestion de bactéries (GALLILY et al., 1984) et de levures (BAR-SHAVIT et GOLDMAN, 1976) par des macrophages de Vertébrés.

Il semble donc que l'entrée de B.ostreae dans les hémocytes d'O.edulis mette en jeu comme chez L.donovani (ALEXANDER et RUSSEL, 1985), plusieurs récepteurs dont le fonctionnement coordonné ou indépendant reste à démontrer.

Les épitopes membranaires de B.ostreae, susceptibles d'être masqués par les anticorps monoclonaux 20B2 et 15C2 reconnaissent des structures communes aux hémocytes des deux espèces. La disponibilité d'anticorps

monoclonaux rend possibles la purification et la caractérisation de ces déterminants antigéniques de B.ostreae par des techniques de chromatographie d'affinité ou d'immunoprécipitation (HANDMAN et GOODING, 1985 ; DIRK et al., 1985) ce qui constituerait une première étape dans l'étude de leur rôle biologique. La localisation membranaire et vacuolaire de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 20B2 présente dans cette optique un intérêt certain, car des antigènes de localisation similaire ont été décrits chez Leishmania major ou T.gondii (HANDMAN et GOODING, 1985 ; EILAM et al., 1985 ; SIBLEY et al., 1986a) et sont impliqués dans des phénomènes de reconnaissance et de résistance aux enzymes lysosomiales.

L'ingestion d'un agent pathogène par un macrophage donne lieu à une série d'évènements qui doivent aboutir à la mort du premier. Ces évènements comprennent l'activation métabolique respiratoire, la production de radicaux libres de l'oxygène et la fusion des lysosomes avec le phagosome contenant l'agent pathogène. Les parasites intracellulaires ont élaboré des stratégies pour éviter les conséquences létales des phénomènes post-phagocytaires (EDELSON, 1982 ; MAUEL, 1984). Ainsi, l'étude en chimioluminescence de la phagocytose de B.ostreae montre qu'il y a interférence avec l'activation métabolique respiratoire des hémocytes des deux espèces. Trois hypothèses peuvent être émises :

- l'interaction ligand-récepteur qui entraîne l'internalisation de B.ostreae ne stimulerait pas le "Respiratory Burst", la nature du récepteur conditionnant le devenir du parasite. La phagocytose sans "Respiratory Burst" a été démontrée pour des macrophages humains (WRIGHT et SILVERSTEIN, 1983),

- le parasite inhiberait activement le "Respiratory Burst". La détection d'une phosphatase acide chez B.ostreae constitue dans ce cas un élément d'importance puisque la phosphatase acide membranaire de L.donovani décrite par GOTTLIEB et DWYER (1981) est capable de déprimer sévèrement la production de radicaux libres de l'oxygène (REMALEY et al., 1984). La phosphatase acide de B.ostreae n'est cependant pas une exoenzyme et se localise dans un organite interne, le corps dense. La fonction du corps dense et le mode de libération de la phosphatase acide devront être précisés,

- les radicaux libres de l'oxygène formés par les hémocytes seraient métabolisés et détoxifiés par B.ostreae, dans ce cas, la catalase mise en évidence pourrait avoir cette fonction (SIBLEY et al., 1986b ; PENKETH et al., 1987).

En ce qui concerne les mécanismes mis en jeu par B.ostreae afin d'éviter les dommages consécutifs à l'action des enzymes lysosomiales, l'analyse ultrastructurale des infections in vivo et in vitro montre d'une façon à peu près constante la présence d'une vacuole parasitophore. Cette vacuole subsiste, après 4 heures de contact in vitro. L'adaptation parasitaire ne consiste donc probablement pas en une fuite hors du phagosome, comme pour T.cruzi, retrouvé libre dans le cytoplasme une heure après entrée dans la cellule au sein d'un phagosome (NOGUEIRA et COHN, 1976 ; MILDER et KLOETZEL, 1980) ou pour R.tsutsugamushi pour laquelle une phospholipase A peut être responsable de la dissolution de la membrane du phagosome, 30 mn après infection (WINKLER et MILLER, 1982).

Des images suggèrent que la fusion phagolysosomiale se produit (MOURTON, 1987) mais demandent à être confirmées par marquage de lysosomes par des produits sélectivement sequestrés par ces organites (HORWITZ et SILVERSTEIN, 1981). B.ostreae semble capable de survivre dans l'environnement hostile du phagolysosome. Les parasites du groupe des leishmanies ont fait cette adaptation. Les mécanismes mis en jeu sont assez mal connus, mais les facteurs excrétés par les parasites de ce groupe et discutés précédemment inhibent certaines enzymes lysosomiales.

L'observation inattendue de figures d'extrusion d'haplosporosomes, organites dont la structure biochimique et la fonction sont inconnues soulève la question de leur implication dans des processus de survie. La disponibilité d'un protocole de purification des parasites peut laisser envisager la purification des haplosporosomes afin d'étudier leurs caractéristiques.

Si des différences sont notées dans les processus d'entrée et dans le comportement spécifique de chaque type cellulaire, il n'existe pas de différence apparente dans les phénomènes post-phagocytaires observés entre C.gigas et O.edulis.

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

L'infection des hémocytes d'O.edulis par B.ostreae constitue un cas particulier de parasitisme intracellulaire si l'on se réfère au double rôle des hémocytes dans la bonamiose. Ils sont en effet les cellules-hôtes au point de vue parasitologique et en même temps les cellules effectrices dans le contexte immunitaire, cette dualité conditionnant le choix du modèle. Pour ces deux axes possibles de recherche, il était de plus particulièrement intéressant de disposer d'un modèle réfractaire C.gigas.

Le système B.ostreae-hémocytes présenté dans ce mémoire est une première tentative de passage à une phase expérimentale in vitro à l'échelle de la pathologie des Mollusques bivalves. Inspiré des méthodes de pathologie générale, il repose sur des acquis techniques tels que la purification des parasites et la réalisation de primocultures d'hémocytes.

Comme il pouvait être attendu de l'utilisation d'un tel système et par analogie avec des modèles parasite-macrophage de Vertébrés in vitro (CHANG et al., 1986), il a été possible d'appréhender les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'infection, notamment au niveau des interactions précoces qui accompagnent l'entrée du parasite.

Des hypothèses ont été émises sur les mécanismes d'adaptation parasitaire relatifs à la survie intracellulaire. Ces hypothèses devront être vérifiées. Des études complémentaires visant à améliorer la connaissance du parasite, en particulier des systèmes enzymatiques sont nécessaires. Dans ce domaine, il faut envisager une évolution des techniques de cytochimie utilisées vers des techniques électrophorétiques et spectrophotométriques, plus faciles à mettre en oeuvre et plus facilement quantifiables.

Le modèle in vitro B.ostreae-hémocyte doit permettre de comprendre l'évolution intracellulaire spécifique du parasite dans les deux espèces et de démontrer en particulier sa multiplication dans les phagocytes d'O.edulis. Ceci passe par des progrès techniques en culture in vitro. L'absence de lignée hémocytaire peut être palliée si des primocultures peuvent être maintenues en culture durant une période plus longue grâce à une meilleure connaissance des métabolismes cellulaires des hémocytes. Un suivi quantitatif efficace des infections est envisageable par microdosage immunologique.

L'étude comparée des hémocytes des deux espèces O.edulis et C.gigas ne fait pas apparaître de différence évidente dans les potentialités cytocides oxygène dépendantes : O.edulis ne semble pas pouvoir être considérée comme immunologiquement déficiente pour les phénomènes étudiés. Cependant, des différences fonctionnelles existent parmi les types cellulaires. La disponibilité d'une technique de séparation rend possibles des études fonctionnelles type par type, études qui devront là encore être étendues du stade descriptif au stade analytique.

Les données acquises sur les hémocytes demandent à être élargies et les voies de cytocidie oxygène indépendantes doivent être explorées. La difficulté à mettre en évidence des différences dans l'activation métabolique respiratoire entre O.edulis et C.gigas peut résulter de la méconnaissance des signaux chimiques susceptibles de modifier le comportement des hémocytes. La réponse à ces signaux, facteurs de croissance, hormones, cytokines (ADAMS et HAMILTON, 1984 ; DRYSDALE et al., 1988) conduit chez les Vertébrés à l'état de macrophage activé. Ainsi activées, ces cellules deviennent cytocides pour L.donovani (MURRAY, 1984 ; WEISER et al., 1987).

La recherche d'éventuels médiateurs humoraux de la réponse cellulaire, dans des phénomènes d'activation ou de coopération hémocytaires entre types fonctionnellement différents constitue une autre voie d'investigation.

L'entrée de B.ostreae dans les phagocytes des deux espèces suggère que la barrière de spécificité ne se situe pas au niveau de la membrane hémocytaire et que, par conséquent, les hémocytes de l'espèce non permissive C.gigas doivent contrecarrer efficacement le parasite, d'où l'intérêt d'examiner de manière approfondie le modèle réfractaire. Au vu des résultats obtenus, le système permissif devra être réexaminé in vitro, individu par individu, mais aussi in vivo afin d'expliquer la variabilité individuelle de réponse à l'infection expérimentale de l'espèce hôte. Les données acquises pourraient ainsi s'intégrer dans des programmes de sélection génétique et permettre une meilleure gestion des populations d'huîtres plates.

Enfin, le modèle B.ostreae-hémocyte peut être étendu à d'autres groupes d'agents pathogènes natifs de bivalves, procaryotes ou virus, pour lesquels l'approche sera plus spécifiquement immunologique du fait de leur localisation extra-hémocytaire. Des études sont actuellement développées sur les interactions entre les hémocytes de Pecten maximus et les rickettsies purifiées à partir de branchies infectées de ce bivalve et l'extrapolation du modèle est en cours pour étudier les réponses des hémocytes dans le cadre de l'immunité anti-tumorale chez Mytilus edulis.

L'acquisition de l'ensemble de ces données devrait, à terme, permettre de mieux comprendre les mécanismes qui régissent les systèmes de défense des Mollusques et ainsi de pouvoir envisager le développement de travaux dans d'autres disciplines que la pathologie, telle la génétique selon des orientations bien définies.

B I B L I O G R A P H I E

A

ADAMS, D.O. and HAMILTON, T.A., 1984. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.*, 2 : 283-318.

ALEXANDER, J. and RUSSEL, D.G., 1985. Parasite antigens, their role in protection, diagnosis and escape : the leishmaniases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 120 : 43-67.

ALLEN, R.C. 1986. Phagocytic leucocytes oxygenation activities and chemiluminescence : a kinetic approach to analysis. In DE LUCA M.A. and Mc ELROY W.D. (eds) "Bioluminescence and chemiluminescence". *Methods in enzymology*, Academic Press, New-York, 133 : 449-493.

ANDERSON, R.S., 1977. Biochemistry and physiology of Invertebrate macrophages in vitro in L.A. BULLA and T.C. CHENG (eds), "Comparative Pathobiology", Plenum New-York/London, 3 : 1-20.

ANDERSON, R.S., 1981. Comparative aspects of the structure and function of Invertebrate and Vertebrate leucocytes. In N.A. RATCLIFFE and A.F. ROWLEY (eds), "Invertebrate Blood Cells", Academic Press, London, pp 629-641.

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.

B

BACHERE, E., CHAGOT D. and GRIZEL H., 1988. Separation of Crassostrea gigas hemocytes by density gradient centrifugation and counter flow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.*, 12 (3) : 549-559.

BADWEY, J.A. and KARNOVSKY, M.L., 1980. Active oxygen species and the functions of phagocytic leucocytes. *Ann. Rev. Biochem.*, 49 : 695-726.

BANG, F.B., 1975. Phagocytosis in Invertebrates. In K. MARAMOROSCH and R.E. HOPE (eds) "Invertebrate Immunity", Academic Press, New-York, pp 137-151.

BAR-SHAVIT, Z. and GOLDMAN, R., 1976. Concanavalin A mediated attachment and ingestion of yeast cells by macrophages. *Exp. Cell. Res.*, 99 : 221-236.

BAYNE, C.J., 1983. Molluscan Immunobiology. In K.M. WILLBUR (ed) "The Mollusca", Academic Press, New-York, 5 : 407-486.

BAYNE, C.J. and STEPHENS, S.A., 1983. Schistosoma mansoni and Biomphalaria glabrata share epitopes : Antibodies to sporocysts bind host snail hemocytes, *J. Invertebr. Pathol.*, 42 : 221-223.

BRAY, R.S., 1983. Attachment and uptake of promastigotes to and by macrophages in vitro. *J. Protozool.*, 30 : 221-223.

BRIDE, M., BARRE, P. and GRIFFOND, B., 1986. Fibronectin and ovotestis development in the snail Helix aspersa : comparative immunology. *Dev. Comp. Immunol.*, 10 (1) : 117.

BRIGGS, R.T., ROBINSON, J.M., KARNOVSKY, M.L. and KARNOVSKY, M.J., 1986. Superoxide production by polymorphonuclear leucocytes. A cytochemical approach. *Histochemistry*, 84 : 371-378.

COHN, Z.A., BOZEMAN, M., CAMPBELL, J.M., HUMPHRIES, J.W. and SAWYER, T.K., 1959. Study on growth of rickettsiae. V : penetration of Rickettsia tsutsugamushi into mammalian cells in vitro. J. Exp. Med., 109 : 271-292.

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.

COOPER, E.L. and ROCH, P., 1986. Second set allograft responses in the earthworm Lumbricus terrestris : kinetics and characteristics. Transplantation, 41 (4) : 514-520.

COUCH, J.A., 1969. An unusual lesion in the mantle of the american oyster, Crassostrea virginica. Natl. Cancer Inst. Monogr., 31 : 557- 562.

D

DAGEFORDE, S., SCHMUKER, A. and RENWRANTZ, L., 1986. Capping of cell surface receptors on blood cells from the molluscs Helix pomatia (Gastropoda) and Mytilus edulis (Lamellibranchiata). Eur. J. Cell. Biol., 41 : 113-120.

DE CHATELET, L.R., LONG, G.O., SHIRLEY, P.S., BASS, D.A., THOMAS, M.J., HENDERSON, F.W. and COHEN, M.S., 1982. Mechanisms of the Luminol-dependant chemiluminescence of human neutrophils. J. Immunol., 129 : 1589-1593.

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., TIJNAGEL, J.M.G.H. and VAN DER KNAPP, W.P.W., 1988a. Monoclonal antibody recognized hemocytes subpopulations in juvenile and adult Lymnaea stagnalis : functional characteristics and lectin binding. Dev. Comp. Immunol., 12 (1) : 17-32.

DIKKEBOOM, R., VAN DER KNAPP, W.P.W., MEULEMAN, E.A. and SMINIA, T., 1984. Differences between blood cells of juvenile and adult specimens of the pond snail Lymnaea stagnalis. Cell Tissue. Res., 238 : 43-47.

DIKKEBOOM, R., VAN DER KNAAP, W.P.W., VAN DEN BOVENKAMP, W., TIJNAGEL, J.M.G.H. and BAYNE, C.J., 1988b. The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species. Dev. Comp. Immunol., 12 (3) : 509-520.

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.

DIRK, A., DOBBELAERE, E., SHAPIRO, S.Z. and WEBSTER, P., 1985. Identification of a surface antigen on Theileria parva sporozoites by monoclonal antibody. Immunology, 82 : 1771-1775.

DONDERO, T.J., OW YANG, C.K. and LIE, K.J., 1977. Failure of irradiated Echinostoma audyi and Hypoderaeum dingeri to sensitize Lymnaea rubicincta snails. S.E. Asian J. Trop. Med. Publ. Health, 8 : 359-363.

DRYSDALE, B.E., AGARWAL, S. and SHIN, H.S., 1988. Macrophage-mediated tumoricidal mechanisms of activation and cytotoxicity. Prog. Allergy, 40 : 111-161.

E

EDELSON, P.J., 1982. Intracellular parasites and phagocytic cells. Cell biology and pathophysiology. Rev. Infect. Dis., 4 (1) : 124-135.

EILAM, Y., EL-ON, J. and SPIRA, D.T., 1985. Leishmania major : excreted factor, calcium ions, and the survival of amastigotes. Exp. Parasitol., : 59 : 161-168.

ELSTON, R.A., FARLEY, C.A. and KENT, M.L., 1986. Occurrence and significance of bonamiosis in European flat oyster Ostrea edulis in North America. Dis. Aquat. Org., 2 : 49-54.

ESSNER, E., 1973a. Hemoproteins. In M.A. HAYAT (ed) "Electron Microscopy of Enzymes", Van Nostrand Reinhold Company, New-York, 2 : 1-33.

ESSNER, E., 1973b. Phosphatases. In M.A. HAYAT (ed) "Electron Microscopy of Enzymes", Van Nostrand Reinhold Company, New-York, 1 : 45-76.

F

FENG, S.Y., FENG, J.S., BURKE, C.N. and KHAIRALLAH, L.H., 1971. Light and electron microscopy of the leucocytes of Crassostrea virginica (Mollusca : Pelecypoda). Z. Zellforsch, 120 : 222-245.

G

GALLILY, R.B., VRAY, B., STAIN, I. and SHARON, N., 1984. Wheat germ agglutinin potentiates uptake of bacteria by murine peritoneal macrophages. Immunology, 52 : 679-686.

GELDER, S.R. and MOORE, C.A., 1986. Cytochemical demonstration of several enzymes associated with phagosomal processing of foreign material within hemocytes of Mercenaria mercenaria. Trans. Am. Microsc. Soc., 105 (1) : 51-58.

GILBOA-GARBER, N., SUSSWEIN, A.J., MIZRAHI, L. and AVICHEZER, D., 1985. FEBS Lett., 181 : 267-270.

GOTTLIEB, M. and DWYER, D.W., 1981. Leishmania donovani, protozoan parasite of humans : surface membrane with externally disposed acid phosphatase. Science, 212 : 939-941.

GRAHAM, R.C. and KARNOVSKY, M.J., 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem., 14 : 291-297.

GRANATH, W.O.JR. and YOSHINO, T.P., 1983. Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzyme markers. J. Exp. Zool., 226 : 205-210.

GRANATH, W.O.JR. and YOSHINO, T.P., 1984a. Schistosoma mansoni : passive transfer of resistance by serum in the vector snail Biomphalaria glabrata. Exp. Parasitol., 58 : 188-193.

GRANATH, W.O.JR. and YOSHINO, T.P., 1984b. Intracellular distribution of lysosomal enzymes within the hemocytes of Biomphalaria glabrata. Trans. Am. Microsc. Soc., 103 (1) : 38-43.

GRIFFITHS, G., Mc DOWALL, A., BACK, R. and DUBOCHET, J., 1984. On the preparation of cryosections for immunochemistry. *J. Ultrastruct. Res.*, 89 : 69-78.

GRIFFITHS, G., SIMONS, K., WARREN, G. and TOKUYASU, K.T., 1983. Immunoelectron microscopy using thin frozen sections : applications to studies of the intracellular transport of Semliki forest virus spike glycoproteins. *Methods Enzymol.*, 96 : 466-483.

GRIZEL, H., 1985. Etude des récentes épizooties de l'huitre plate Ostrea edulis Linné et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse Doctorat d'Etat en Sciences Naturelles, Université de Montpellier, 145 pp.

H

HANDMAN, E. and GOODING, J.W., 1985. The Leishmania receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO J.*, 4 (2) : 329-336.

HANKER, J.S., YATES, P.E., CLAPP, D.H. and ANDERSON, W.A., 1972. New methods for the demonstration of lysosomal hydrolases by the formation of osmium black. *Histochemie*, 30 : 201.

HARM, H. and RENWRANTZ, L., 1980. The inhibition of serum opsonins by a carbohydrate and the opsonizing effect of purified agglutinin on the clearance of non-self particles from the circulation of Helix pomatia. *J. Invertebr. Pathol.*, 36 : 40-70.

HAWKINS, W.F. and HOWSE, H.D., 1982. Ultrastructure of cardiac hemocytes and related cells in the oyster Crassostrea virginica. *Trans. Am. Micros. Soc.*, 101 (3) : 241-252.

HENRY, M., 1987. La glande digestive de la palourde méditerranéenne Ruditapes decussatus L. Recherches ultrastructurales, cytochimiques, écophysiologicalues. Thèse, Doct. es Sciences, Aix Marseille, 439 pp.

HORISBERGER, M. and ROSSET, J., 1977. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 25 : 295-305.

HORWITZ, M.A. and SILVERSTEIN, S.C., 1981. Influence of the Escherichia Coli capsule on complement fixation and on killing by human phagocytes. *J. Clin. Invest.*, 65 : 82-94.

HOWLAND, K.H. and CHENG, T.C., 1982. Identification of bacterial chemoattractants for oyster (Crassostrea virginica) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 39 : 123-132.

HUFFMAN J.E. and TRIPP, M.R., 1982. Cell types and hydrolic enzymes of soft shell clam (Mya arenaria) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 40 : 68-74.

J

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.

K

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, pp 79-88.

- KEARNEY, J.F., 1984. Hybridomas and monoclonal antibodies in fundamental immunology. In W.E. PAUL (ed). *Fundamental immunology*, Raven Press, New-York, pp 751-783.
- KINNE, O., 1983. Diseases of marine animals. *Biologische anstalt helgoland, Hamburg*, (2), pp 468-1038.
- KLUHSPIES, G., 1983. Angeborene und erworbene resistenz von Lymnea stagnalis und Radix ovata gegen miracidien. *Invasion*, 2, Parasitenk, 69 : 591-611.
- KOCH, C. and NIELSEN, H.E., 1984. Activation of vertebrate complement by Helix pomatia haemolymph. *Dev. Comp. Immunol.*, 8 (1) : 15-21.
- KOLHER, G. and MILSTEIN, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature*, 256 : 495-497.
- L
- LACKIE, A.M., 1980. Invertebrate immunity. *Parasitology*, 80 : 393-412.
- LEIPPE, M. and RENWRANTZ, L., 1985. On the capability of bivalve and gastropod hemocytes to secrete cytotoxic molecules. *J. Invertebr. Pathol.*, 46 : 209-210.
- LEIPPE, M. and RENWRANTZ, L., 1988. Release of cytotoxic and agglutinating molecules. *Dev. Comp. Immunol.*, 12 (2) : 297-308.
- LIE, K.J., 1982. Survival of Schistosoma mansoni and other trematode larvae in the snail Biomphalaria glabrata. A discussion of the interference theory. *Trop. Geogr. Med.*, 34 : 111-122.
- LIE, K.J. and HEYNEMAN, D., 1975. Studies on resistance in snails : a specific tissues reaction to Echinostoma lidoense in Biomphalaria glabrata snails. *Int. J. Parasitol.*, 5 : 621-625.
- LIE, K.J., HEYNEMAN, D. and JEONG, K.H., 1980b. Tissue reactions induced by Schistoma mansoni in Biomphalaria glabrata. *Ann. Trop. med. Parasitol.*, 74 : 157-166.
- LIE, K.J., HEYNEMAN, D. and YAU, P., 1975. The origin of amoebocytes in Biomphalaria glabrata. *Int. J. Parasitol.*, 61 : 574-576.
- LIE, K.J., JEONG, K.H. and HEYNEMAN, D., 1980a. Inducement of miracidia-immobilizing substance in the hemolymph of Biomphalaria glabrata. *Int. J. of Parasitol.*, 10 : 183-188.
- LIE, K.J., JEONG, K.H. and HEYNEMAN D., 1981. Selective interference with granulocyte function induced by Echinostoma paraensei (Trematoda) larvae in Biomphalaria glabrata (Mollusca). *Int. J. Parasitol.*, 67 : 790-796.
- LIS, H., L. and SHARON, N., 1986. Lectins as molecules and as tools. *Am. Rev. Biochem.*, 55 : 35-67.
- LOCKSLEY, R.M. and KLEBANOFF, S.J., 1983. Oxygen dependant microbicidal systems of phagocytes and host defense against intracellular protozoa. *J. Cell Biochem.*, 22 : 173-185.
- LOKER, E.S., 1979. Pathology and host responses induced by Schistosomatium douthitti in the fresh water snail Lymnea catascopium. *J. Invertebr. Pathol.*, 33 : 265-273.

LOKER, E.S. and BAYNE, C.J., 1982. In vitro encounters between Schistosoma mansoni primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of Biomphalaria glabrata. Am. J. Trop. Med. Hyg., 31 : 999-1005.

LOKER E.S. and BAYNE, C.J., 1986. Immunity to trematode larvae in the snail Biomphalaria glabrata. In A.M. LACKIE (ed), Immune mechanisms in Invertebrate vectors. Symp. Zool. Soc. Lond., 56 : 199-220.

M

MAC HENERY, J.G., BIRBECK, T.H., ALLEN, J.A., 1979. The occurrence of lysozyme in marine bivalves. Comp. Biochem. Physiol., 63B : 25-28.

MAC MICHAEL, A.J. and FABRE, J.W., 1982. Monoclonal antibodies in clinical medicine. Academic Press, London, 347 pp.

MAUEL, J., 1984. Mechanisms of survival of protozoan parasites in mononuclear phagocytes. Parasitology, 88 : 579-592.

MEULEMAN, E.A ., BAYNE, C.J., VAN Der KNAAP, W.P.W., 1987. Immunological aspects of snail-trematode interactions. Dev. Comp. Immunol., 1 : 113-127.

MIALHE, E., BACHERE, E., CHAGOT, D. and GRIZEL, H., 1988. 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.

MILDER, R. and KLOETZEL, J., 1980. The development of Trypanosoma cruzi in macrophages in vitro. Interactions with lysosomes and host cell fate. Parasitology, 80 : 139-145.

MOORE, C.A. and EBLE, A.F., 1977. Cytochemical aspects of Mercenaria mercenaria hemocytes. Biol. Bull. Woods Hole, 152 (1) : 105-119.

MOORE, C.A. and GELDER, S.R., 1983. The role of the "Blunt" granules in hemocytes of Mercenaria mercenaria following phagocytosis. J. Invertebr. Pathol., 41 : 369-377.

MOORE, C.A. and GELDER, S.R., 1985. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of Mercenaria mercenaria (Mollusca : Bivalvia). Trans. Am. Microsc. Soc., 104 (3) : 242-249.

MOORE, M.N. and LOWE, D.M., 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.

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 (1) : 55-61.

MOULDER, J.W., 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. Microbiol. Rev., 49 : 298-337.

MOURTON, C., 1987. Modèle d'étude in vitro de Bonamia ostreae (Asctospora) parasite intra-hémocytaire d'Ostrea edulis. Etude d'interactions cellulaires hôte-parasite, Université de Clermont II, 25 pp.

MUHLPFORDT, H., 1982. The preparation of colloidal gold particles using tannic acid as an additional reducing agent. Experientia, 38 : 1127-1128.

MULLAINADHAN, P. and RENWRANTZ, L., 1986. Lectin dependant recognition of foreign cells by hemocytes of the mussel, Mytilus edulis. Immunobiology, 171 : 263-273.

MURRAY, H.W., 1984. Activation of macrophages to display enhanced oxidative and antiprotozoal activity. Comtemp. Top. Immunobiol., 14 : 97-115.

N

NAKAMURA, M., MORI, K., INOOKA, S. and NOMURA, T., 1985. In vitro production of hydrogen peroxide by the amoebocytes of the scallop, Patinopecten vessoensis (Jay). Dev. Comp. Immunol. 9 : 407-417.

NICOLSON, G.L., 1976. Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. II Surface changes associated with transformation and malignancy. Biochem. Biophys. Acta, 458 : 1-72.

NOGUEIRA, N. and COHN Z.A., 1976. Trypanosoma cruzi : mechanisms of entry and intracellular fate in mammalian cells. J. Exp. Med., 143 : 1402-1420.

NOVIKOFF, A.B., 1963. Lysosomes in the physiology and pathology of cells : contribution of staining methods. In RENCK and CAMERON (eds), JA CHURCHILL, London, Ciba Found. Symp. Lysosomes, pp 36-77.

NOVIKOFF, A.B. and GOLDFISHER, S., 1969. Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. J. Histochem. Cytochem., 17 : 675.

O

OFEK, I. and SHARON, N., 1988. Lectinophagocytosis : a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. Infec. Immunity., 56 (3) : 539-547.

OLAFSEN, J.A., 1986. Invertebrate lectins : biochemical heterogeneity as a possible key to their biological function. In M. BREHELIN (ed), "Immunity in Invertebrates", Springer Verlag, Berlin, 94 pp.

P

PARKS, D.R., BRYAN, V.M., OI, V.T. and HERZENBERG, L.A., 1979. Antigen specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence activated cell sorter (FACS). Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76 : 1962.

PENKETH, P.G., KENNEDY, W.P.K., PATTON C.L. and SARTORELLI, A.C., 1987. Trypanosomatid hydrogen peroxide metabolism, FEBS Lett., 221 (2) : 427-431.

PICHOT, Y., COMPS, M., GRIZEL, H. et RABOUIN, M.A., 1980. Recherches sur Bonamia ostreae, gen. n. sp. n., parasite nouveau de l'huitre plate Ostrea edulis L. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43 : 131-140.

PODER, M., 1980. Les réactions hémocytaires inflammatoires et tumorales chez Ostrea edulis (L). (Essai de classification des hémocytes des Mollusques bivalves). Thèse 3ème cycle. Univ. Bret. Occ. U.E.R. Sci. Tech., 95 pp.

R

REMALEY, A.T., KUHN, D.B., BASFORD, R.E., GLEW, R.H. and KAPLAN, S.S., 1984. Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O₂ production. J. Biol. Chem., 259 : 1173-1175.

- RENWRANTZ, L., 1979. Eine untersuchung molekularer und zellularer Bestandteile der Hamolymphe von Helix pomatia unter besonderer Berücksichtigung immunobiologisch aktiver komponenten. Zool. J. Physiol., 83 : 283
- RENWRANTZ, L., 1986. Lectins in molluscs and arthropods : their occurrence, origin and roles in immunity. In A.M. LACKIE (ed), "Immune mechanisms in Invertebrate vectors". University Press, Oxford, 81 pp.
- RENWRANTZ, L., DANIELS, J. and HANSEN, P.D., 1985. Lectin binding to hemocytes of Mytilus edulis. Dev. Comp. Immunol., 9 : 203-210.
- RENWRANTZ, L. and MOHR, R., 1978. Opsonizing effect of serum and albumin gland extracts on the elimination of erythrocytes from the circulation of Helix pomatia. J. Invertebr. Pathol., 31 : 164-170.
- RENWRANTZ, L., SCHANCKE, W., HARM, H., ERL, H., LIEBSCH, H. and GERCKEN, J., 1981. Discriminative ability and function of the immunobiological recognition system of the snail Helix pomatia. J. Comp. Physiol., 141 : 477-488.
- RENWRANTZ L. and STAHRER 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.
- RUDELL, C.L., 1971a. Elucidation of the nature and function of the granular oyster amoebocytes through histochemical studies of normal and traumatized oyster tissues. Histochemie, 26 : 98-112.
- RUDELL, C.L., 1971b. The fine structure of the granular amoebocytes of the Pacific oyster Crassostrea gigas. J. Invert. Pathol., 18 : 269-275.
- RUDELL, C.L., 1971c. The fine structure of agranular amoebocytes from regenerating mantle wounds in the Pacific oyster, Crassostrea gigas. J. Invertebr. Pathol., 18 : 260-268.
- S
- SHARON, N., 1987. Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. FEBS lett., 217 (2) : 145-157.
- SHARON, N. and OFEK, I., 1986. Mannose specific bacterial surface lectins. In D.MIRELMAN (ed), "Microbial lectins and agglutinins : properties and biological activity", John Wiley and Sons, New-York, pp 55-81.
- SCHREVEL, J., GROS, D. and MONSIGNY, M., 1981. Cytochemistry of cell glycoconjugates. Prog. Histochem. Cytochem., 14 (2) : 1-269.
- SIBLEY, D.L., KRAHENBUHL, J.L., ADAMS, G.M.W. and WEIDER, E., 1986a. Toxoplasma modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. J. Cell Biol., 103 : 867-874.
- SIBLEY, D.L., LAWSON, R. and WEIDNER, E., 1986(b). Superoxide dismutase and catalase in Toxoplasma gondii. Molec. Biochem. Parasitol., 19 : 83-87.
- SLOT, J.W., and GEUZE, H.J., 1985. A new method of preparing colloidal gold probes for multiple labelling cytochemistry. Eur. J. Cell Biol., 38 : 87-93.
- SMINIA, T. and BARENDSEN, L., 1980. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of Biomphalaria glabrata and Bulinus truncatus. J. Morphol., 165 : 31-39.

SMINIA, T., BORGHARDT-REINDERS, E. and VAN DE LINDE A.W., 1974. Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the fresh water snail Lymnaea stagnalis : an electron microscopic and autoradiographic study. Cell Tissue Res., 153 : 307-326.

SMINIA, T. and VAN DER KNAAP, W.P.W., 1986. Immunorecognition in Invertebrates with special reference to Molluscs. In M. BREHELIN (ed), "Immunity in Invertebrates", Springer-Verlag, Berlin, pp 112-124.

SMINIA, T., VAN DER KNAAP, W.P.M. and BOERRIGHTER-BARENDSEN, L.H., 1982. Peroxidase positive blood cells in snails. J. Reticul. Soc., 31 : 399-404.

SMINIA, T., VAN DER KNAAP, W.P.W. and ELLENBOSCH, 1979. The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the fresh water snail Lymnaea stagnalis. Dev. Comp. Immunol., 3 : 37-44.

SMINIA, T., VAN DER KNAAP, W.P.W. and VAN ASSELT, L.A., 1983. Blood cell types and blood cell formation in gastropod molluscs. Dev. Comp. Immunol., 7 : 667-668.

STAUBER, L.A., 1950. The fate of india ink injected intracardially into the oyster Ostrea virginica Gmelin. Biol. Bull. Woods Hole, 98 : 227-241.

STUART, J., Mac ROBBIE, M.N. and NEWELL, P.C., 1985. Effects of Cytochalasin B on cell movements and chemoattractant-elicited actin changes of Dictyostelium. Exp. Cell Res., 160 : 275-286.

T

TAKAHASHI, K., MORI, K. and NOMURA, T., 1986. Occurrence and characterization of lysozyme in the marine bivalves. Bul. Jpn. Soc. Sci. Fish., 52 (5) : 863-868.

TOKUYASU, K.T., 1980. Immunocytochemistry on ultra-thin frozen sections. Histochem. J., 12 : 381-403.

TOKUYASU, K.T. and UKAMARA, S., 1959. Glass knives for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6 : 305.

TRIPP, M.R., 1963. Cellular responses of Molluscs. Ann. N.Y. Acad. Sci, 113 : 467-474.

TUAN, TL. 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.

V

VAN DER KNAAP, W.P.W., BOERRIGHTER-BARENDSEN, 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 Lymnaea stagnalis. Cell tissue Res., 219 : 291-296.

VAN DER KNAAP, W.P.W., BOOTS, A.M.H., MEULEMAN, E.A. and SMINIA, T., 1985a. Search for shared antigens in the schistosome-snail combination Trichobilharzia ocellata-Lymnaea stagnalis. Z. Parasitenk., 71 : 219-226.

VAN DER KNAAP, W.P.W. and MEULEMAN, E.A., 1986. Interaction between the immune system of lymnaeid snails and trematode parasites. In A.M. LACKIE (ed), "Immune mechanisms in Invertebrate vectors". University Press. Symp. Zool. Soc. Lond. 56 : 179-198.

VAN DER KNAAP, W.P.W., MEULEMAN, E.A. and MELLINK, J.J., 1985b. Shistosome-snail immunological compatibility : shared antigens in the model Trichobilharzia ocellata. Dev. Comp. Immunol., 9 : 172-178.

VAN FURTH, R., 1986. Overview : the mononuclear phagocyte system. In D.M. WEIR (ed). "Handbook of experimental immunology in four volumes. Volume 2. Cellular Immunology", Blackwell Scientific publications, London, pp 42/1-42/5.

VASTA, G.R., CHENG, T.C., MARCHALONIS, J.J., 1984. A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (Crassostrea virginica). Cell. Immunol., 83 : 475-488.

VUILLEMIN, V., 1987. Mise au point d'un modèle expérimental de reproduction et d'étude de la bonamiose, maladie hémocytaire de l'huitre plate Ostrea edulis. Rapport DEA, U.E.R. d'Aix-Marseille II, 29 pp.

W

WALKER, T.S. and WINKLER, H.H., 1978. Penetration of cultured mouse fibroblasts (L.cells) by Rickettsia prowazekii. Infec. Immunity, 22 : 200-208.

WEISER, W.Y., VAN NIEL, A., CLARK, S.C., DAVID, J.R. and REMOLD, H.G., 1987. Recombinant human granulocyte/macrophages colony stimulating factor activate intracellular killing of Leishmania donovani by human monocyte-derived macrophages. J. Exp. Med., 166 : 1436-1446.

WERK, R., 1985. How does Toxoplasma gondii enter host cells ? Rev. Infect. Dis., 7 (4) : 449-457.

WINKLER, H.H. and MILLER, E.T., 1982. Phospholipase A and the interaction of Rickettsia prowazekii and mouse fibroblasts (L 929 cells). Infec. Immunity., 38 : 109-113.

WITKE, M. and RENWRANTZ, L., 1984. Quantification of cytotoxic hemocytes of Mytilus edulis using a cytotoxicity assay in agar. J. Invertebr. Pathol., 43 : 248.

WRIGHT, S.D. and SILVERSTEIN, S.C., 1983. Receptors for C3b and iC3b promote phagocytosis but not the release toxic oxygen from human phagocytes. J. Exp. Med., 158 : 2016-2023.

Y

YOSHINO, T.P., 1981. Comparison of concanavalin A-reactive determinants on hemocytes of two Biomphalaria glabrata snail stocks : receptor binding and redistribution. Dev. Comp. Immunol., 5 : 229-239.

YOSHINO, T.P., 1982. Lectin induced modulation of snail hemocyte surface determinants : clearance of Con A-receptor complexes. Dev. Comp. Immunol., 6 : 451-459.

YOSHINO, T.P., 1983. Lectins and antibodies as molecular probes of molluscan hemocyte surface membranes. Dev. Comp. Immunol., 7 : 641-644.

YOSHINO, T.P., 1988. Phospholipase C-like activity in phagocytic cells of the Asian clam, Corbicula fluminea, and its possible role in cell mediated cytolytic reactions. J. Invertebr. Pathol., 51 : 32-40.

YOSHINO, T.P. and BAYNE, C.J., 1983. Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of Schistosoma mansoni. Parasite Immunol., 5 : 317-328.

- YOSHINO, T.P. and CHENG, T.C., 1976. Fine structural localization of acid phosphatase in granulocytes of the pelecypod Mercenaria mercenaria. Trans. Am. Microsc. Soc., 95 (2) : 215-220.
- YOSHINO, T.P. and CHENG, T.C., 1978. Snail host like antigens associated with the surface membranes of Schistosoma mansoni miracidia. J. Parasitol., 64 :752-754.
- YOSHINO, T.P. and GRANATH, W.O., 1983. Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in Biomphalaria glabrata (gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers. Cell Tissue Res., 232 : 553-561.
- YOSHINO, T.P. and GRANATH, W.O., 1985. Surface antigens of Biomphalaria glabrata (Gastropoda) hemocytes. Functional heterogeneity in cell subpopulations recognized by a monoclonal antibody. J. Invertebr. Pathol., 45 : 174-186.
- YOSHINO, T.P. and TUAN, TL., 1985. Soluble mediators of cytolytic activity in hemocytes of the Asian clam, Corbicula fluminea. Dev. Comp. Immunol., 9 : 515-522.
- ZINGALES, B. and COLLI, W., 1985. Trypanosoma cruzi : Interaction with host-cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 117 : 129-152.