

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE
présenté par

Nathalie BESNARD-COCHENNEC

pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

LA BONAMIOSE :
CARACTERISATION DU PARASITE *BONAMIA OSTREAE* ET
ETUDE DE SES INTERACTIONS AVEC L'HOTE, L'HUITRE
PLATE *OSTREA EDULIS*

Soutenu le 20 février 1997 devant la commission d'examen

Mr. PICHON Michel
Mr. BENYAMIN Yves
Mr. RENAULT Tristan
Mr. CHILMONCSIK Stephan
Mr. AUFFRET Michel

Président
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Centre de Recherche en Biochimie
Macromoléculaire
Ecole Pratique des Hautes Etudes (Section des Sciences
de la Vie et la Terre) - Montpellier

Directeur : Mr. Y. BENYAMIN

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
IFREMER La Tremblade

Directeur : Mr. A. GERARD

*Parmi tant d'huîtres toutes closes,
une s'était ouverte, et brillant au soleil , par un doux zéphyr,
humait l'air, respirait, était épanouie,
blanche, grasse et d'un goût, à la voir, non pareil*

*Le rat et l'huître
Jean de la Fontaine*

*A Romain,
Julien,
Eric,
et mes parents*

L'exposé de ce travail m'offre l'occasion de remercier tous ceux qui m'ont encouragée et aidée dans la réalisation de cette étude.

En premier lieu je remercie Messieurs Henri Grizel et André Gérard, responsables successifs du Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie d'IFREMER de La Tremblade, de leur soutien et des moyens qu'ils m'ont accordés pour mener à terme ce travail.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait, Mr Michel Pichou, d'accepter la présidence de ce jury.

Je suis reconnaissante à Monsieur Yves Benjamin d'avoir bien voulu accepter ma candidature à l'EPHE, et je le remercie pour ses encouragements.

Il m'est très agréable de compter parmi les membres de ce jury, Michel Auffret. Je le remercie pour l'intérêt qu'il a manifesté pour mon travail.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur Stephan Chilmonec, qui m'a accueillie chaleureusement dans son laboratoire et m'a prodigué ses conseils pour la cytométrie de flux.

Je remercie Franck Berthe, pour l'intérêt avec lequel il a suivi l'évolution de ce travail. Son soutien a représenté un appui précieux.

J'adresse toute ma reconnaissance à Anne, Sophie et Marc pour leurs conseils éclairés et la patience dont ils ont fait preuve pour la lecture diligente de ce manuscrit.

C'est à toutes les personnes du Laboratoire de Ronce que je m'adresserai pour leur dire combien j'ai été sensible à leur disponibilité, leur compétence, leur bonne humeur et leur gentillesse et pour leur exprimer le plaisir d'avoir travaillé avec eux.

Tous mes remerciements vont également à Gilbert Tigé qui a su, il y a quelques années, me faire partager sa passion pour la pathologie des huîtres.

1. INTRODUCTION **1**

2. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT LES MECANISMES DE DEFENSE OBSERVES CHEZ LES INVERTEBRES **7**

2.1. Les effecteurs cellulaires : les hémocytes	7
2.1.1. Les types hémocytaires	7
2.1.2. L'origine des hémocytes	11
2.1.3. Le nombre d'hémocytes	11
2.1.4. Les fonctions des hémocytes	12
2.2. Les mécanismes de défense cellulaire	12
2.2.1. La phagocytose	12
2.2.2. Les types cellulaires impliqués	13
2.2.3. Les facteurs de reconnaissance et d'opsonisation	14
2.2.4. L'internalisation	16
2.2.5. Les phénomènes post-phagocytaires	16
2.3. Le système de défense humorale	17

3. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES CONCERNANT LA BONAMIOSE **18**

Matériel et méthodes

1. LE MATERIEL BIOLOGIQUE **24**

1. 1. Les huîtres plates, <i>Ostrea edulis</i>	24
1.1.1. Les huîtres d'origine naturelle	24
1.1.2. Les huîtres produites en éclosion	24
1.2. Les huîtres creuses, <i>Crassostrea rivularis</i>	26

2. LES METHODES **26**

2.1. Techniques de pathologie expérimentale	26
2.1.1. Purification du parasite, <i>Bonamia ostreae</i>	26
2.1.2. Infection expérimentale	29
2.1.3. Maintien des animaux au laboratoire	30
2.2. Techniques histologiques et cytologiques	32
2.2.1. Microscopie photonique	32
2.2.2. Microscopie électronique à transmission	37
2.3. Techniques biochimiques	39
2.3.1. Préparations des échantillons	39
2.3.2. Dosage des protéines totales	40
2.3.3. Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)	42
2.3.4. Transfert électrophorétique	44
2.3.5. Révélation de glycoprotéines	45

2.3.6. Recherche d'activités enzymatiques	47
2.4. Techniques immunologiques	50
2.4.1. Anticorps monoclonaux	51
2.4.2. Production d'anticorps polyclonaux	51
2.4.3. Immunofluorescence indirecte	51
2.4.4. Immunoperoxydase indirecte	53
2.4.5. Immunomarquage à l'or colloïdal	53
2.4.6. Immunodétection sur membranes de nitrate de cellulose et de nylon	54
2.5. Techniques de culture cellulaire	55
2.5.1. Prélèvement des hémocytes	55
2.5.2. Mise en culture	56
2.5.3. Suivi des primocultures	57
2.6. Techniques de biologie moléculaire	57
2.6.1. Extraction de l'ADN	57
2.6.2. Amplification génique enzymatique	58
2.6.3. Restriction enzymatique des fragments amplifiés	59
2.7. Cytométrie de flux	59

Résultats - Chapitre I : contribution à l'étude du parasite *B. ostreae*

1. OPTIMISATION DU PROTOCOLE DE PURIFICATION 62

2. CARACTERISATION DES PROTEINES CONSTITUTIVES MAJEURES DU PARASITE *BONAMIA OSTREAE* 62

2.1. Lyse cellulaire du parasite purifié et extraction des protéines	62
2.2. Caractérisation électrophorétique du parasite <i>B. ostreae</i>	67
2.3. Caractérisation des glycosylations du parasite <i>B. ostreae</i>	70
2.3.1. Sur membranes après transfert	70
2.3.2. En gel SDS-PAGE	70
2.3.3. Sur suspensions parasitaires purifiées	70

3. CARACTERISATION ANTIGENIQUE DES PROTEINES CONSTITUTIVES DE *BONAMIA OSTREAE* 74

3.1. Préparation d'anticorps polyclonaux spécifiques de fractions protéiques parasitaires	74
3.2. Marquage en immunohistochimie	74
3.2.1. Profil d'immunofluorescence indirecte des anticorps polyclonaux	74
3.2.2. Profil d'immunoperoxydase indirecte des anticorps polyclonaux	76
3.2.3. Profils d'immunofluorescence indirecte des anticorps monoclonaux	76
3.3. Localisation ultrastructurale des épitopes	78
3.4. Détection d'antigènes après transfert des protéines par la technique de "western blotting"	80
3.4.1. A l'aide des anticorps polyclonaux	80

3.4.2. A l'aide des anticorps monoclonaux	80
---	----

4 COMPARAISON DE *BONAMIA OSTREAE* AVEC UN PARASITE NOUVEAU OBSERVE CHEZ *CRASSOSTREA RIVULARIS* 81

4.1. Description histologique et cytologique d'un parasite intracellulaire de <i>Crassostrea rivularis</i>	81
4.1.1. Etude histologique	81
4.1.2. Purification du parasite	81
4.1.3. Examen ultrastructural de la suspension de parasites purifiés	81
4.2. Comparaison antigénique du parasite de <i>Crassostrea rivularis</i> et de <i>Bonamia ostreae</i>	84
4.3. Comparaison des profils électrophorétiques de <i>Bonamia ostreae</i> et de ce parasite	84
4.4. Comparaison à l'aide d'outils de biologie moléculaire	85
4.4.1. Amplification génique enzymatique	85
4.4.2. Comparaison des profils de restriction	85

5. DISCUSSION 85

Résultats - Chapitre II : caractérisation des cellules effectrices de l'immunité chez l'huître plate, *Ostrea edulis*

1. CARACTERISATION DES CELLULES EFFECTRICES DE L'IMMUNITE 98

1.1. Etude morphologique des hémocytes	98
1.2. Séparation des populations hémocytaires	100
1.2.1. Séparation sur gradient discontinu de saccharose	100
1.2.2. Séparation sur gradient discontinu de Percoll puis de Ficoll	100
1.2.3. Etude ultrastructurale des populations hémocytaires séparées	101
1.3. Recherche des glycoprotéines sur hémocytes non séparés	103

2. CARACTERISATION ENZYMATIQUE DES POPULATIONS HEMOCYTAIRES 103

2.1. Activités enzymatiques des hémocytes non séparés	103
2.2. Activités enzymatiques des hémocytes séparés en gradient de densité	106
2.3. Recherche d'activités intra-hémocytaires	106

3. ESSAIS DE PRIMOCULTURES D'HEMOCYTES D'HUITRE PLATE 107

3.1. Mise au point d'une technique de lavage des hémocytes	107
3.2. Tests de milieux de culture	109

Résultats - Chapitre III : Etude des mécanismes cellulaires de défense mis en jeu par l'huître plate, *Ostrea edulis*, vis-à-vis du parasite *B. ostreae*

<u>1. CYTOLOGIE COMPARATIVE, <i>IN VIVO</i>, DES POPULATIONS HEMOCYTAIRES PROVENANT D'HUITRES PLATES RESISTANTES ET SENSIBLES AU PARASITE <i>BONAMIA OSTREAE</i></u>	122
1.1. Analyse de la numération cellulaire	122
1.2. Analyse de la formule hémocytaire	124
1.2.1. Observation de préparations cytocentrifugées	124
1.2.2. Etude en cytométrie de flux	127
1.3. Détermination du taux d'infection des différents types hémocytaires	132
<u>2. CYTOLOGIE COMPARATIVE, <i>IN VITRO</i>, DES POPULATIONS HEMOCYTAIRES PROVENANT D'HUITRES SAINES ET PARASITEES</u>	132
<u>3. ANALYSE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DE POPULATIONS PARASITEES</u>	138
3.1. Sur galerie API ZYM	138
3.2. Etude enzymatique des hémocytes parasités	141
3.3. Etude enzymatique ultrastructurale des hémocytes parasités	141
3.3.1. Recherche de la thiamine	141
3.3.2. Recherche de la β -glycérophosphatase	144
3.3.3. Recherche de la cytidine phosphatase	144
<u>4. DISCUSSION</u>	144
<u>CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES</u>	154
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	159
<u>ANNEXES</u>	175

Introduction

1. INTRODUCTION

L'ostréiculture représente une part importante de l'aquaculture française avec une production d'environ 150 000 tonnes, par an, ce qui classe la France en troisième position mondiale, derrière le Japon et la Corée du Sud (Antona, 1993). Cependant, outre les contraintes et les risques liés à cet élevage essentiellement réalisé en milieu ouvert, le développement de cette activité peut être limité par des mortalités d'origine infectieuse (parasites, bactéries et virus). En France, une maladie virale (virus apparentés aux *Iridoviridae*) a totalement décimé les populations d'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata* entre 1966 et 1971 (Comps et Duthoit, 1976). L'absence de sensibilité à ce virus de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* a permis son élevage et la relance de l'économie ostréicole. Ultérieurement en France l'huître plate *Ostrea edulis* a subi l'impact de deux maladies : la marteiliose et la bonamiose qui ont engendré une diminution importante de sa production, entraînant une situation de quasi monoélevage pour l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

De nombreux travaux ont été engagés afin de mieux connaître certaines de ces maladies en vue de limiter leur impact sur les productions conchylicoles. Toutefois, certaines caractéristiques des mollusques bivalves marins réduisent les possibilités d'intervention. En effet, peu de moyens sont disponibles pour protéger ces animaux, élevés en milieu ouvert, vis-à-vis des maladies infectieuses.

Les recherches réalisées en matière de traitement n'ont pas pour l'instant débouché sur des applications pratiques, soit en raison de leur inefficacité, soit en raison de leur difficulté d'application (Grizel, 1985). Ce type d'approche ne semble pas une voie à privilégier, et est limité aux élevages en milieu contrôlé.

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

Pour préserver les cheptels et réduire à leur plus bas niveau possible les risques d'introduction et de propagation d'agents pathogènes, les moyens actuels de lutte sont basés sur :

- la prophylaxie zoosanitaire qui, outre un arsenal législatif et un contrôle institutionnel (Directives 91/67 UE et 95/70 UE), repose sur la fiabilité et la rapidité du diagnostic. Aujourd'hui, pour la plupart des agents pathogènes, l'étude s'appuie sur l'histologie et la microscopie électronique à transmission. Ces techniques consommatrices de temps et coûteuses sont inadaptées à la quantification des infections en raison de la difficulté à traiter un grand nombre d'échantillons rapidement, et à détecter de faibles niveaux d'infection,
- la prophylaxie zootechnique qui permet d'améliorer les techniques d'élevage dans le but d'obtenir des animaux en meilleurs conditions plus aptes à résister aux infections,
- l'amélioration génétique qui vise à accroître le niveau de résistance d'une espèce vis-à-vis d'un agent pathogène par sélection ou par transgénèse.

Dans ce cadre, l'IFREMER a développé depuis plusieurs années un programme de recherche concernant la bonamiose, maladie due au parasite protozoaire intracellulaire, *Bonamia ostreae*. Cette maladie a été mise en évidence pour la première fois en Europe, chez les huîtres plates, *Ostrea edulis*, lors d'épisodes de mortalité en Bretagne (Ile Tudy) au cours de l'année 1979. Elle s'est ensuite propagée rapidement à tous les centres ostréicoles français, puis européens (Pichot *et al.*, 1980 ; Bannister et Key, 1982 ; Polanco *et al.*, 1984 ; Grizel, 1985). Elle a par ailleurs été décrite aux USA (Elston *et al.*, 1986 ; Friedman et Perkins, 1994) et en Nouvelle Zélande (Dinamini *et al.*, 1987 ; Doonan *et al.*, 1994).

En raison de son impact économique considérable sur la production d'huître plate, le protozoaire *Bonamia ostreae* a été retenu dans la liste des agents pathogènes à recherche et déclaration obligatoire d'une Directive Européenne (94/67/UE). Cette directive établit les mesures communautaires minimales de contrôle des épizooties pour les espèces de mollusques d'intérêt aquacole.

Dans ce contexte, un premier axe de recherche, a consisté à la mise au point de méthode d'immunodiagnostic permettant de développer une stratégie de prophylaxie zoosanitaire efficace. A partir de parasites purifiés (Mialhe *et al.*, 1988), des anticorps monoclonaux spécifiques ont été produits (Rogier *et al.*, 1991) et l'un deux, couplé à une phosphatase alcaline a été utilisé pour mettre au point un immunodiagnostic enzymatique (Cochennec *et al.*, 1987) disponible sous forme de kit. La commercialisation de ce kit a été toutefois arrêtée. En effet, elle a été confrontée aux coûts de production en petites séries et à l'absence de structures institutionnelles ou privées suffisamment dynamiques pour promouvoir ce type de diagnostic.

Le deuxième axe de recherche a concerné l'étude de cette maladie, à l'échelle de l'huître. Ainsi la morphologie et l'ultrastructure de ce parasite ont pu être précisées (Comps, 1980 ; Chagot, 1989 ; Hervio, 1992).

A l'échelle des populations d'huîtres, *Ostrea edulis*, la sensibilité d'animaux a été estimée et a permis d'identifier des populations géographiques et des individus présentant un caractère de résistance à la maladie (Hervio, 1992). En outre, le laboratoire IFREMER de la Tremblade dispose depuis plusieurs années de populations d'huître sélectionnées pour leur "résistance" accrue à la bonamiose (Martin *et al.*, 1993 ; Naciri, 1994). Ces populations, outre leur intérêt économique certain, ouvrent de nouvelles perspectives dans l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans les phénomènes de sensibilité ou de résistance.

D'un point de vue plus fondamental, ce modèle de parasitisme intracellulaire est particulièrement intéressant par le fait du double rôle joué par les hémocytes dans cette pathologie. En effet, ils correspondent d'une part, aux cellules-hôtes, et d'autre part, aux cellules effectrices de l'immunité à médiation cellulaire. Il est évident que *B. ostreae* constitue un modèle d'étude unique en pathologie des mollusques pour appréhender, à l'échelle cellulaire, les relations hôte-parasite et les réactions immunitaires.

Dans le cadre de ce travail de mémoire EPHE, je me suis attachée, tout d'abord, à la caractérisation des différents compartiments impliqués dans ce modèle, puis à étudier leurs interactions dans une approche immunologique.

La première partie de cette étude a été focalisée sur la caractérisation du protozoaire *Bonamia ostreae*, et a été dictée par le manque d'informations relatives à ce parasite, pour lequel les données étaient essentiellement ultrastructurales et épidémiologiques. Cette caractérisation devrait permettre en outre des comparaisons de nature taxonomique au sein du phylum des Asctospora.

Certaines des méthodes et des réactifs mis au point dans cette première partie ont été appliqués à la description et à la comparaison du parasite *Bonamia ostreae* avec un nouveau parasite décrit sur une espèce asiatique, l'huître creuse *Crassostrea rivularis*.

La deuxième partie de ce travail a été consacré à l'élaboration de méthodes simples et reproductibles pouvant être utilisées pour la description des constituants cellulaires de l'hémolymphe de l'hôte, *O. edulis*. En dépit des nombreux travaux réalisés sur la caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes, il n'y a pas de consensus sur le nombre et la distinction des types cellulaires décrits. En effet, leur description est souvent partielle et la nomenclature est hétérogène (Auffret, 1988).

Nous avons ensuite focalisé notre étude sur la caractérisation enzymatique des hémocytes. Ceci a été réalisé afin de relever d'éventuelles différences fonctionnelles entre les populations hémocytaires, et ainsi d'acquérir des données sur le rôle respectif des types cellulaires dans les phénomènes de dégradation post-phagocytaire.

La troisième partie de ce travail a concerné l'étude des interactions parasite *B. ostreae*-hémocytes de l'huître plate, en comparant notamment des populations d'*O. edulis* sensibles et sélectionnées pour leur résistance à la bonamiose. En effet, les mécanismes par lesquels les parasites s'établissent dans l'hôte et induisent cette maladie sont peu étudiés. En outre, les travaux comparatifs effectués jusqu'à présent

étaient interspécifiques et ne concernaient que l'étude de ces mécanismes chez l'espèce sensible *O. edulis* et une espèce réfractaire *C. gigas*.

L'utilisation de ce modèle et l'analogie à des systèmes *in vitro* parasite-macrophage chez les vertébrés (Chang *et al.*, 1986) doivent permettre de mieux appréhender les interactions parasite-cellules cibles. Grâce à ce modèle, l'acquisition de données concernant la pathogénie et les processus de l'immunité cellulaire devrait aboutir à une meilleure connaissance des mécanismes qui régissent les systèmes de défense des mollusques bivalves. Cette étude pourrait constituer une base de départ pour les programmes de sélection d'animaux résistants à cette maladie en utilisant des huîtres présentant des caractéristiques immunitaires particulières.

Rappels bibliographiques

2. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT LES MECANISMES DE DEFENSE OBSERVES CHEZ LES INVERTEBRES

Il convient en premier lieu de noter que le système de défense des Invertébrés se distingue, entre autre, de celui des Vertébrés par l'absence de réponse immunitaire faisant intervenir des cellules spécialisées (lymphocytes T ou B). De ce point résulte l'impossibilité à mettre en évidence une réponse basée sur la spécificité et la mémoire immunitaire. Cependant, sur la base d'expériences de rejet de greffes, l'existence d'une mémoire immunitaire semble prouvée chez les Annélides (Cooper et Roch, 1986) et l'existence d'un facteur de type anticorps a été démontré chez l'étoile de mer, *Asterias rubens* (Brillouet *et al.*, 1985).

Chez les bivalves, les mécanismes de défense observés sont immédiats et non inductibles, à médiation cellulaire, et reposent essentiellement sur l'activité phagocytaires des hémocytes (cellules circulantes trouvées dans l'hémolymphe).

2.1. Les effecteurs cellulaires : les hémocytes

2.1.1. Les types hémocytaires

Le système de défense cellulaire des mollusques est assurée par les hémocytes, cellules véhiculées par l'hémolymphe dans un système circulatoire semi-ouvert (Figure 1). Les hémocytes peuvent ainsi être retrouvés en différentes localisations, dans le compartiment circulatoire (vaisseaux et grands sinus) et au niveau des tissus conjonctifs (Cheng, 1981 ; Sminia et Van der Knaap, 1987).

L'étude de ces cellules a suscité de nombreux travaux (Poder, 1980 ; Auffret, 1985 ; Chagot, 1989 ; Hinsh et Hunte, 1990 ; Mc Cormick-Ray et Howard, 1991 ; Ford *et al.*, 1994). Différents critères ont été utilisés, séparément ou en association, pour classier les types hémocytaires chez les mollusques bivalves : critères morphologiques, critères cytochimiques, critères fonctionnels et critères antigéniques. Cependant, une certaine confusion semble régner dans la littérature essentiellement

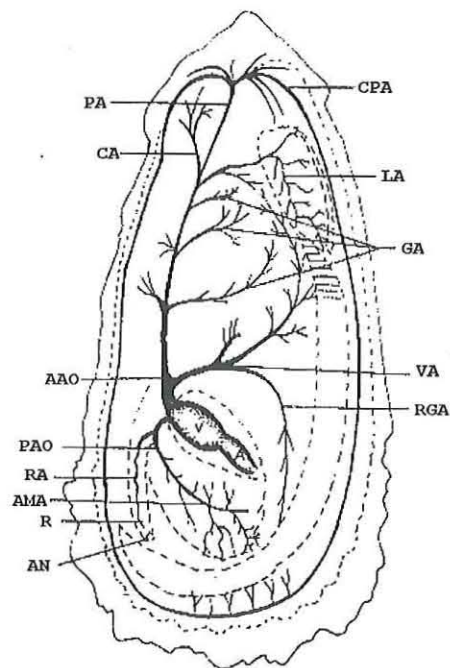


Figure 1. Schéma du système circulatoire artériel de l'huître creuse américaine, *Crassostrea virginica* (d'après Cheng, 1980). A: auricule cardiaque. CA : artère céphalique. CPA : artère circumpalléale. GA : artères gastriques. RGA : artère gonado-rénale. AMA : artère du muscle adducteur. AN : anus. AAO : aorte antérieure. PAO : aorte postérieure. PA : artère palléale. RA : artère rectale. VA : artère viscérale. R : rectum. V: ventricule.

descriptive. En effet, l'absence de critères d'identification bien établis amène une multiplicité de dénominations et de descriptions des hémocytes (Tableau 1). Ainsi, plusieurs descriptions d'un même type cellulaire ou inversement le regroupement de types différents à l'intérieur d'une même population sont retrouvés dans la littérature. Citons les travaux de Tanaka rapportés par Cheng en 1981 qui ne distinguait pas moins de douze types et sous types en considérant la morphologie et la taille des cellules chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Moore et Lowe (1977), pour identifier et classer les types hémocytaires, ont utilisé, entre autres, des critères morphologiques, la présence, la forme, la taille ou les affinités tinctoriales des granulations.

D'autres critères d'identification, comme l'équipement enzymatique des hémocytes, ont été pris en compte pour caractériser des types hémocytaires chez la moule, *Mytilus edulis* (Pipe, 1990), chez les huîtres, *Ostrea edulis* (Auffret, 1985), *Tiostrea chilensis* (Hine et Wesney, 1994) et chez *Crassostrea gigas* (Chagot, 1989).

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

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

Les ostréidés		
L'huître plate, <i>Ostrea edulis</i>	L'huître creuse japonaise, <i>Crassostrea gigas</i>	L'huître creuse américaine, <i>Crassostrea virginica</i>
Les cellules agranuleuses		
Hyalinocytes Hémocytes agranuleux	Hyalinocytes Hémocytes agranuleux Amébocytes agranuleux	Hyalinocytes Hémocytes agranuleux de type I Hémocytes agranuleux de type II Hémocytes agranuleux de type III
Les cellules granuleuses		
Granulocytes	Hémocytes granuleux basophiles Hémocytes granuleux acidophiles Hémocytes granuleux	Granulocytes Hémocytes granuleux Hémocytes de type IV

Tableau 1 : Types hémocytaires selon la nomenclature chez trois espèces d'ostréidés (d'après Auffret, 1988).

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

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

2.1.2. L'origine des hémocytes

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

2.1.3. Le nombre d'hémocytes

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

Feng (1965) a considéré que les cellules circulantes représentaient une estimation exacte de la population hémocytaire totale. De même, Oubella *et al.*, (1993) considèrent que cette densité peut représenter un paramètre quantifiable de la réponse immunitaire des mollusques bivalves vis-à-vis de stress dus à des facteurs environnementaux ou à des agents pathogènes. Ce type de paramètres a d'ailleurs été retenu pour étudier la réponse cellulaire de l'huître américaine, *Crassostrea virginica* vis-à-vis de deux parasites *Haplosporidium nelsoni* (Ford *et al.*, 1993) et *Perkinsus marinus* (La Peyre *et al.*, 1995). Récemment, Paillard *et al.* (1996) ont mis en évidence une diminution du nombre des hémocytes totaux et une modification du comptage différentiel des hémocytes chez des huîtres *C. virginica* infectées par le J.O.D. (Juvenile Oyster Disease).

2.1.4. Les fonctions des hémocytes

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

2.2. Les mécanismes de défense cellulaire

2.2.1. La phagocytose

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

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

- *le chimiotactisme* des hémocytes circulants vers le site lésé (infection ou blessure) a été démontré bien que la (les) substance(s) chimioattractante(s) ne soit(ent) pas identifiée(s),

- *la reconnaissance* semble être facilitée par des lectines qui ont un effet opsonisant. Elles stimulent la phagocytose lorsqu'elles se lient simultanément à la cellule cible et à la cellule effectrice,

- *l'internalisation* consiste en la formation de pseudopodes qui vont progressivement entourer et finalement ingérer la particule,

- *la destruction*, après internalisation, est assurée par deux types de processus : un mécanisme oxydatif ou « respiratory burst » et un mécanisme faisant intervenir les enzymes lysosomiales.

2.2.2. Les types cellulaires impliqués

Cheng (1981) considère que tous les types hémocytaires sont phagocytaires. Cependant, les auteurs ne sont pas unanimes quant aux types hémocytaires impliqués dans le phénomène de phagocytose de substances particulières étrangères. Pour Reade (1976), les hémocytes agranuleux du bénitier, *Tridacna maxima*, et pour Rudell (1969) ceux de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* sont capables de phagocytose, tandis que pour Lowe et Moore (1979) chez la moule, *Mytilus edulis*, cette activité appartient aux macrophages basophiles plus ou moins granuleux. Auffret (1985) met en évidence le rôle essentiel joué par les granulations cytoplasmiques des hémocytes granuleux d'*Ostrea edulis* dans le processus de phagocytose.

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

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

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

2.2.3. Les facteurs de reconnaissance et d'opsonisation

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

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

Des réactions d'immunité humorale de type agglutinine (Renwranz et Stahmer, 1983 ; Olafsen, 1988 ; Tuan et Yoshino, 1987) semblent exister chez certains mollusques (la moule, *M. edulis* ; l'huître japonaise, *C. gigas* ; le clam, *Corbicula flunimea*). Il a été décrit un phénomène d'agglutination de microorganismes et ensuite de facilitation de la fixation entre les hémocytes et les microorganismes (Renwranz et Stahmer, 1983). *In vitro*, Olafsen *et al.* (1992) ont décrit un accroissement des

agglutinines dans le sérum de *Crassostrea virginica* en réponse à une inoculation de *Vibrio anguillarum*. Des modifications considérables de la quantité des molécules d'agglutinine présentes dans l'hémolymphe d'huître *Crassostrea virginica* infectée par le parasite *Haplosporidium nelsoni* ont été également notées (Kanaley et Ford, 1990 ; Ling, 1990 ; Chintala *et al.*, 1994). Lorsqu'elles ont été caractérisées, ces molécules se sont révélées être des lectines. L'hémolymphe n'est pas leur seule localisation puisqu'elles sont retrouvées dans les organes (Lis et Sharon, 1985). Des lectines sont également présentes sur la membrane des hémocytes (Van der Knaap *et al.*, 1981 ; Yoshino, 1983 ; Vasta *et al.*, 1984). Cependant, leur nature constitutive ou cytophile n'a pas été déterminée. Chez la moule, *Mytilus edulis*, une lectine a été mise en évidence à la surface des hémocytes et dans l'hémolymphe laissant supposer un rôle opsonisant (Renwrautz et Stahmer, 1983). Chen et Bayne (1994) ont montré le rôle de carbohydrates dans les communications hémocytes-cible et inter-hémocytes chez la moule, *M. californianus*. Un récepteur de type lectine existe également sur les macrophages des Vertébrés (Kaplan et Buys, 1985).

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

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

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

Ces molécules peuvent permettre la caractérisation de différentes populations cellulaires. En particulier, la recherche de huit lectines a permis de mettre en évidence des différences quantitatives et qualitatives entre trois populations géographiquement différentes d'huître américaine, *C. virginica* (Cheng *et al.*, 1995). La présence d'une

lectine, la "lathyrose", a été associée à l'absence du parasite *Haplosporidium nelsoni* chez certaines populations de *C. virginica* (Cheng *et al.*, 1995) et pourrait être utilisée comme marqueur de résistance à cette maladie.

2.2.4. L'internalisation

Chez les Vertébrés, la phase d'internalisation se déroule en plusieurs étapes : après la phase d'adhésion, les cellules phagocytaires englobent le micro-organisme en émettant autour de lui des pseudopodes. Ceux-ci fusionnent et le micro-organisme se trouve internalisé dans une vacuole appelée phagosome. Puis les lysosomes fusionnent à leur tour avec le phagosome, pour détruire le micro-organisme ainsi piégé. Cette partie du processus phagocytaire est bien documentée pour les vertébrés, alors que chez les mollusques bivalves marins peu de travaux ont été effectués. Après un contact ponctuel avec la membrane phagocytaire, Chagot (1989) décrit un englobement progressif du parasite *B. ostreae* par des pseudopodes des hémocytes de l'huître plate. L'internalisation se complète au sein d'une vacuole parasitophore. Ce type de mécanisme semble correspondre à ce qui est retracé chez les Vertébrés.

2.2.5. Les phénomènes post-phagocytaires

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

L'équipement enzymatique des hémocytes a été étudié par des méthodes histochimiques. Des phosphatases acides et alcalines, des estérases non spécifiques, peroxydase, aminopeptidase, phospholipase C, β -glucuronidase, ATPase et α -naphthylacétate estérase ont été détectées dans tous les types cellulaires (Adema *et al.*, 1991). La répartition non uniforme des activités enzymatiques permet de révéler des

sous-populations discrètes, non corrélées avec les types morphologiques (Granath et Yoshino, 1984b). Les granules des granulocytes sont considérés comme des lysosomes en raison de la présence de phosphatase acide (Yoshino et Cheng, 1976 ; Auffret, 1985). D'ailleurs, différentes études ont permis de préciser le rôle des hémocytes dans la réponse post-phagocytaire vis-à-vis de parasites (Hine and Wesley, 1994) ou de cellules tumorales (Bechman *et al.*, 1992 ; Noël, 1994). Le deuxième mécanisme, oxydatif, a été démontré chez le pétoncle *Patinopecten yessoensis* (Nakamura *et al.*, 1985), la coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1991), l'huître creuse *C. gigas* (Bachère *et al.*, 1991), l'huître plate *O. edulis* (Bachère *et al.*, 1991) et le gastéropode *Lymnaea stagnalis* (Dikkeboom *et al.*, 1987 ; Adema *et al.*, 1991). Chez cette dernière espèce, les intermédiaires réactionnels de l'oxygène pourraient être à l'origine de la cytotoxicité des hémocytes face à des sporocystes de *Schistosoma mansoni* (Dikkeboom *et al.*, 1988).

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

2.3. Le système de défense humorale

Aucun anticorps n'ayant été identifié, il est considéré que le système de défense des invertébrés est essentiellement non spécifique. L'immunité humorale existe, puisqu'un certain nombre de facteurs humoraux ont été mis en évidence, la majorité étant produite par les hémocytes. Plusieurs facteurs ont été identifiés : lysosyme (Takahashi *et al.* 1986), bactéricidines (Mori *et al.* 1984), enzymes lysosomiales plasmatiques (Cheng, 1983), activité sérine-protéase (Bachère *et al.*, 1990 ; Pipe,

1990, b), lectines (Renwranz, 1986), cytolysines plasmatiques (Leippe et Renwranz, 1988). Hubert *et al.* (1995) ont également mis en évidence une activité cytotoxique dans le plasma de la moule *M. edulis*. La purification par chromatographie échangeur d'anions a révélé une protéine cytotoxique multimérique de 320 kDa, qui semble agir par polymérisation après fixation sur la membrane des cellules cibles. Par ailleurs, la présence de molécules de type cytokine dans l'hémolymphe de *M. edulis* a été suspectée suite à la mise en évidence d'une immunoréactivité avec des anticorps polyclonaux spécifiques du TNF- α et de l'IL1 recombinants humains par test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Hughes *et al.*, 1990 ; 1991a ; 1991b).

3. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES CONCERNANT LA BONAMIOSE

3.1. Taxonomie

Suite à des mortalités estivales d'huîtres plates *Ostrea edulis* un protozoaire intrahémocytaire fut mis en évidence (Pichot *et al.*, 1980). Ce parasite, sur la base de ses caractéristiques ultrastructurales et notamment la présence d'haplosporosomes a été apparenté aux protozoaires de la classe des Stellatospora (Phylum des Ascetospora) (Levine *et al.*, 1980). Cependant en l'absence de spores le parasite intrahémocytaire d'*O.edulis* fut considéré comme représentant d'un genre nouveau. Il est constitué à ce jour de deux espèces *B. ostreae* chez *O. edulis*, et *Bonamia sp* chez *Tiostrea lutaria* (Dinamini *et al.*, 1987).

3.2. Anatomo-pathologie

Dans la cellule hôte, les parasites sont présents dans une vacuole parasitophore au sein de laquelle ils semblent se multiplier par simple scissiparité. Cependant, quelques plasmodes contenant 4 à 6 noyaux peuvent être observées (Bréhelin *et al.*, 1982). Le nombre de parasites par cellule varie de 1 à plus de 20. Les effets cytopathiques sont importants et aboutissent à la destruction de la cellule hôte (Comps,

1983). Dans des stades avancés de la maladie, de nombreux parasites extracellulaires sont observables.

Au niveau macroscopique l'infection peut s'accompagner d'ulcérations branchiales. D'un point de vue anatomo-pathologique l'infection se caractérise par l'accumulation d'hémocytes dans les lacunes de tous les tissus conjonctifs (Comps, 1983).

La transmission de la maladie s'effectue dans le milieu tout au long de l'année (Grizel, 1985) probablement par contamination directe avec des parasites provenant de cadavres d'animaux parasités.

3.3. Interactions *Bonamia ostreae*/hémocyte

L'obtention de parasites purifiés (Mialhe *et al.*, 1988) a permis d'entreprendre la reproduction et la modélisation de la bonamiose au laboratoire. Des suspensions purifiées et quantifiées de parasites ont été injectées dans le tissu conjonctif d'huître plate *O. edulis*, et d'huître creuse *C. gigas* (naturellement réfractaire) afin de déterminer leur sensibilité respective à la bonamiose (Vuillemin, 1987 ; Renault *et al.*, 1994). Des parasites ont été observés uniquement chez l'huître plate, *O. edulis*, suite à l'inoculation. En outre, les taux et les degrés d'infection étant variables en fonction des doses inoculées, Vuillemin (1987) a supposé que la barrière de spécificité se situait au niveau des hémocytes. Ainsi, les hémocytes, en tant que cellules immunitaires, doivent être directement impliqués dans l'élimination des parasites chez *C. gigas*, mais aussi dans la variabilité des infections initiées chez *O. edulis*.

Ce modèle d'étude a permis une première tentative de passage à une phase expérimentale *in vitro*, à l'échelle de la pathologie des mollusques bivalves (Mourton *et al.*, 1992). Inspiré des méthodes de pathologie générale, il repose sur des acquis techniques tels que la purification du parasite (Mialhe *et al.*, 1988) et la réalisation de primoculture d'hémocytes (Mourton *et al.*, 1992).

La disponibilité de telles méthodes a permis d'étudier la phagocytose. Ce processus mis en évidence pour la plupart des protozoaires parasites intracellulaires, a pour origine des interactions de type récepteur-ligand au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules hôtes et du parasite. Les expérimentations entreprises dans le but de mettre en évidence ce type d'interaction dans le modèle *Bonamia ostreae*-hémocyte *in vitro* ont donné des résultats parfois contradictoires.

Chagot (1989) rapporte que le traitement du parasite, *B. ostreae*, avec des anticorps monoclonaux spécifiques de déterminants antigéniques membranaires induit une réduction significative de la phagocytose par certains types hémocytaires chez *O. edulis* et *C. gigas*. Hervio (1992) indique qu'aucun effet notable de ces mêmes anticorps n'est observable chez *O. edulis* sur l'internalisation du parasite. Par contre, cet auteur relève une augmentation significative du phénomène de phagocytose chez *C. gigas*. Ces premiers résultats tendent à prouver l'existence d'interaction récepteur-ligand dans l'internalisation du parasite.

D'autre part, il semble que les anticorps monoclonaux facilitent la phagocytose. Ce type de phénomène peut être rapproché du rôle opsonisant joué par les anticorps sériques lors de certaines parasitoses chez les mammifères, et laisserait suspecter la présence d'un récepteur éventuel sur les hémocytes d'huître. Il est important de noter que Chagot (1989) travaille en considérant les différents types hémocytaires et que les travaux de Hervio (1992) sont rapportés aux hémocytes totaux.

Des recherches concernant d'éventuelles interactions lectines-sucres ont été recherchées dans les phénomènes de reconnaissance du parasite par les hémocytes. Les travaux de Chagot (1989) montrent que le traitement des hémocytes par un mélange de sucres simples n'a aucun effet sur la phagocytose. Inversement, l'incubation des protozoaires en présence de sucres préalablement au contact avec les cellules cibles, induit une diminution significative du taux d'infection pour certains types hémocytaires. L'hypothèse de la présence de lectine à la surface du parasite reste néanmoins à préciser.

Enfin, les travaux réalisés pour déterminer l'intervention de facteurs humoraux, dans la phagocytose de *B. ostreae* par les hémocytes d'huître donnent également des résultats contradictoires. Chagot (1989) n'observe aucune différence dans les taux

d'infection hémocytaire chez l'huître creuse, *C. gigas*, lorsque les parasites sont préalablement ou non incubés avec de l'hémolymphe homologue. Par contre, cet auteur rapporte une diminution significative de ces taux chez l'huître plate, *O. edulis*, pour certains types d'hémocytes en l'absence d'hémolymphe homologue. Hervio (1992) obtient des résultats différents, puisque la présence d'hémolymphe homologue chez *O. edulis* ne semble aucunement jouer sur la phagocytose du parasite par les hémocytes. Ces résultats, parfois opposés, pourraient être expliqués par le fait que les expérimentations étaient basées sur un système de maintien des cellules sur lames, et en ne tenant pas compte des différentes populations hémocytaires présentes. Ce système a pu entraîner, lors des différentes étapes de lavage, une sélection de certaines populations plus adhérentes.

La relative similitude des phénomènes d'infection des hémocytes de l'huître plate, *O. edulis* et de l'huître creuse, *C. gigas*, par *B. ostreae* a conduit à étudier les phénomènes post-phagocytaires. Pour cela, les capacités cytotoxiques des hémocytes des deux espèces *O. edulis* et *C. gigas* ont été étudiées par la technique de chimioluminescence, après internalisation (Hervio, 1992). Chez les Vertébrés, les cellules phagocytaires stimulées déclenchent un phénomène de « respiratory burst » se traduisant par une forte consommation d'oxygène due à l'activité d'une enzyme membranaire, la NADPH-oxydase. Celle-ci catalyse la conversion d'oxygène en ion superoxyde qui est le précurseur de différents agents oxydants. Ces réactifs ont un fort pouvoir microbicide. La technique de chimioluminescence mesure les radicaux libres de l'oxygène générés lors du « respiratory burst ». Aucun pic d'activité n'est observé lors de la phagocytose du parasite vivant ou tué, par les hémocytes des deux espèces *O. edulis* et *C. gigas*. Ces résultats obtenus, *in vitro*, suggèrent que le parasite est capable d'éviter ou d'inhiber les processus microbicides de ses cellules-hôtes. Plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- Le signal émis à l'internalisation du parasite n'induirait pas de stimulation du "respiratory burst" soit parcequ'il est insuffisant, soit parcequ'il est inexistant,
- Le parasite inhiberait activement le "respiratory burst" par l'intermédiaire de certaines enzymes. Une phosphatase acide a été caractérisée chez *B. ostreae*

(Hervio *et al.*, 1991) et certains auteurs décrivent ce type d'enzyme comme ayant une forte activité inhibitrice de la production de radicaux libres (Gottlieb et Dwyer, 1981 ; Glew *et al.*, 1982)

- Les radicaux libres formés seraient détoxifiés par le parasite au fur et à mesure de leur production. Une activité catalase a également été détectée chez le parasite (Chagot, 1989). Elle pourrait intervenir dans la détoxification des radicaux oxygènes, ce type d'activité étant décrit dans la littérature.

Il semble donc qu'il n'existe pas de différence apparente dans les phénomènes post-phagocytaires observés, entre *C. gigas* et *O. edulis*, laissant suspecter chez l'espèce réfractaire *C. gigas*, l'existence d'une éventuelle barrière de spécificité antérieure à un contact parasite-hémocyte.

Les bases biologiques de ces mécanismes restent inexplorées. En outre, si des travaux préliminaires existent quant aux interactions hémocytes-parasites dans un système de maintien en survie des hémocytes *in vitro*, peu d'études concernant les relations existant, *in vivo*, entre cellules hôtes et parasite du genre *Bonamia* ont été publiées (Hine et Wesley, 1994).

L'ensemble de ces données montre que nous sommes encore loin d'une totale compréhension des mécanismes impliqués dans la défense des huîtres vis-à-vis d'une infection parasitaire intracellulaire. Des travaux sont encore nécessaires pour dégager certaines bases cellulaires permettant d'appréhender ces mécanismes.

Matériel et méthodes

1. LE MATERIEL BIOLOGIQUE

1. 1. Les huîtres plates, *Ostrea edulis*

1.1.1. Les huîtres d'origine naturelle

Dans cette étude, les huîtres plates, *Ostrea edulis*, utilisées comme source de parasites sont :

- soit des animaux âgés de 2-3 ans, naturellement parasités provenant de parcs de la baie de Quiberon (Bretagne sud), où la prévalence de l'infection à *Bonamia ostreae* peut atteindre jusqu'à 50 %,
- soit des animaux âgés de 2-3 ans, originaires du milieu naturel, introduits au laboratoire IFREMER de la Tremblade, infectés expérimentalement et maintenus ensuite en salle de quarantaine. Le protocole de reproduction expérimentale de la maladie est détaillé au paragraphe 2.1.1.

Les animaux utilisés dans les autres expérimentations sont originaires du Bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime), zone endémique pour la bonamiose.

1.1.2. Les huîtres produites en éclosion

Les huîtres sensibles et sélectionnées pour leur résistance à la bonamiose, produites en éclosion, nous ont été fournies par l'équipe de Génétique du Laboratoire IFREMER de la Tremblade. Cette équipe développe depuis plusieurs années un programme de sélection génétique de populations d'huître plate "résistantes" à ce parasite. Deux populations ont été sélectionnées à partir de géniteurs issus du milieu naturel (Baie de Quiberon), l'une depuis 1985, l'autre depuis 1989. Les premiers résultats montrent une amélioration sensible des performances de résistance au cours des générations de sélection ainsi que de bons résultats en terme de croissance (Martin *et al.*, 1993, Naciri Y., 1994).

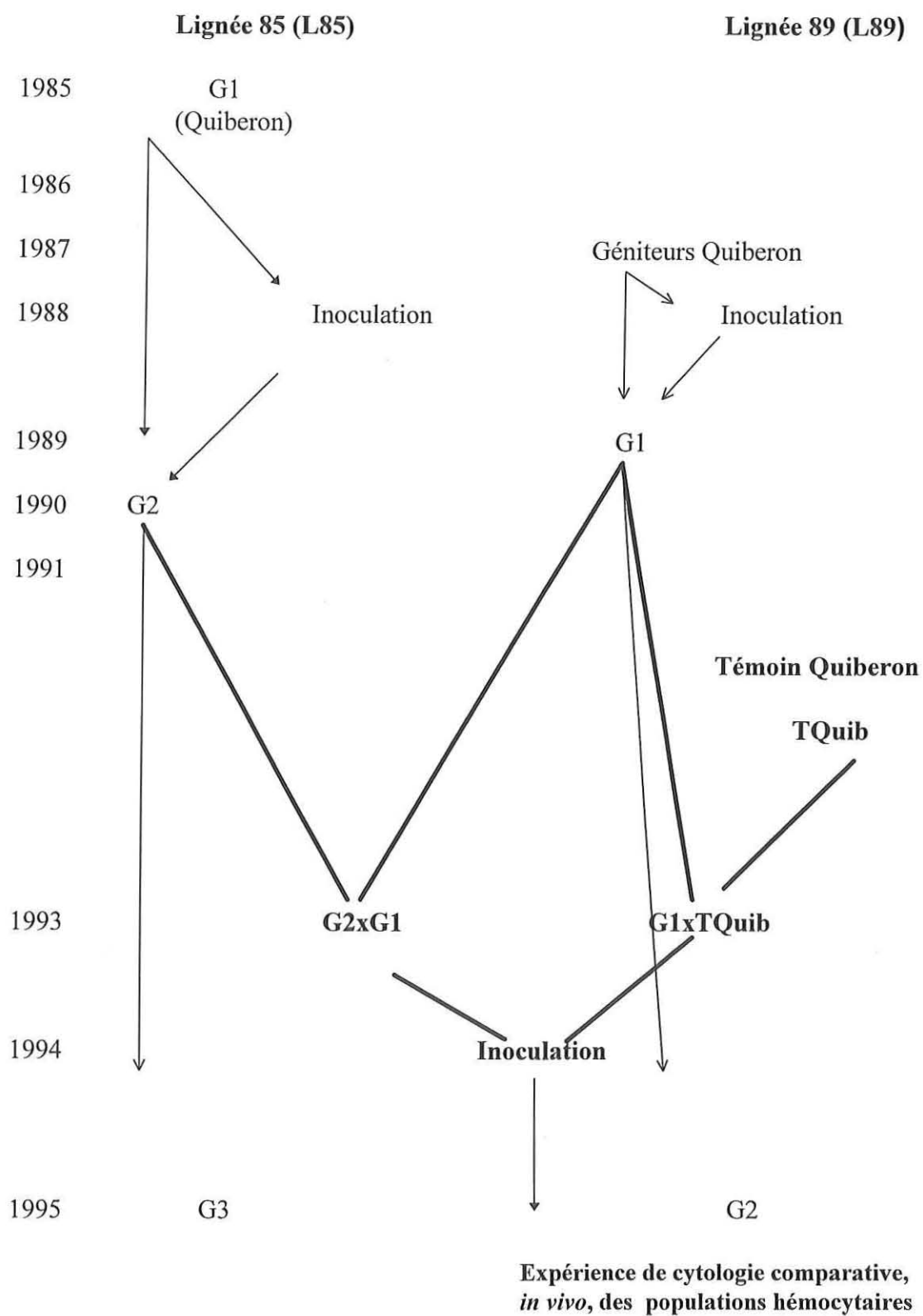


Figure 2 . Historique des lignées participant au programme de sélection génétique de populations d'huître plate, *Ostrea edulis*, "résistantes" au parasite *Bonamia ostreae*

- La population sélectionnée G1xTQuib correspond à un croisement entre des huîtres issues d'une première génération d'une lignée de sélection 1989 (Lignée 89) et des individus collectés dans le milieu naturel (Baie de Quiberon) (Figure 2).
- La population sélectionnée G1xG2 (L89G1xL85G2) correspond à un croisement entre des huîtres issues de la deuxième génération d'une lignée de sélection 1985 (Lignée 85) et la première génération d'une lignée de sélection 1989 (Lignée 89) (Figure 2).
- Les deux populations témoins ont été produites en écloserie à partir de géniteurs du milieu naturel provenant de la baie de Quiberon (Bretagne sud), zone endémique pour la bonamiose (population QUIB) et de Palavas (Méditerranée), zone indemne jusqu'en 1991 (population PAL).

1.2. Les huîtres creuses, *Crassostrea rivularis*

Une centaine d'huîtres creuses chinoises, *Crassostrea rivularis*, âgées de 3 ans ont été importées des Etats-Unis en 1995, et maintenues en salle de quarantaine au laboratoire IFREMER de La Tremblade, dans le cadre d'un programme de réalisation d'un conservatoire de souches. Préalablement et conformément aux recommandations du C.I.E.M. (Conseil International pour l'Exploration de la Mer), avant d'introduire des animaux vivants, une analyse histologique avait été effectuée sur une trentaine d'animaux, de même origine, pour vérifier l'absence d'agent pathogène sur cette espèce.

2. LES METHODES

2.1. Techniques de pathologie expérimentale

2.1.1. Purification du parasite, *Bonamia ostreae*

Les progrès dans l'étude des agents pathogènes observés chez les mollusques bivalves ne peuvent être envisagés sans la maîtrise de techniques de laboratoire

adaptées, tout particulièrement en intégrant le caractère non cultivable de la plupart de ces agents pathogènes. Ainsi l'obtention de parasites purifiés est nécessaire dans le cas de la bonamiose car elle conditionne la bonne réussite des expériences de caractérisation électrophorétique, antigénique et moléculaire du parasite, de même que la possibilité d'induire une pathologie expérimentale au laboratoire.

Les suspensions purifiées du parasite *B. ostreae* sont obtenues en suivant le protocole établi par Mialhe *et al.* (1988), modifié par Hervio *et al.* (1995) (Figure 3).

Des huîtres fortement parasitées sont identifiées par examen cytologique d'empreintes de tissus cardiaque (cf. paragraphe 2.2.1.5.). Le système circulatoire des huîtres étant semi-ouvert, les hémocytes sont disséminés dans les différents organes. De ce fait, le corps entier de l'animal est utilisé pour la purification, à l'exception du muscle adducteur dont la nature fibreuse empêche une homogénéisation correcte des tissus. Les tissus infectés sont lavés avec de l'eau de mer filtrée stérile, additionnée de détergent, Tween 80, à la concentration finale de 1% (EMFST), puis broyés dans de l'EMFST à l'aide d'un homogénéiseur de tissus, Ultra-Turrax, qui permet de dissocier tissus et cellules sans altérer les protozoaires. L'utilisation de broyats tissulaires permet de récupérer les parasites localisés dans les hémocytes. L'homogénéisat est ensuite filtré sur des toiles de porosité décroissante (100, 60 et 20 μm) afin d'éliminer les débris fibreux. La suspension ainsi filtrée est centrifugée (2000 g, 30 min, 8°C). Le culot est repris dans un petit volume d'EMFST, puis à nouveau broyé à l'homogénéiseur. Les parasites et les éléments particuliers présents dans les culots sont séparés par une première centrifugation différentielle (2000 g, 30 min, 8°C) dans une solution de saccharose 20 % (p/p dans de l'EMFST) qui concentre les parasites, mais aussi des cellules non dissociées et des débris cellulaires.

Ces contaminants sont éliminés par une nouvelle centrifugation (2000 g, 30 min, 8°C) sur un gradient discontinu de saccharose (20%-40% p/p dans de l'EMFST). Les parasites sont prélevés à l'interface 20-40% et dilués lentement avec de l'EMFST afin d'éviter un choc osmotique. Ils sont ensuite lavés dans un grand volume d'EMFST, puis remis au culot par centrifugation (2000 g, 30 min, 8 °C).

L'étape suivante de purification repose sur une centrifugation en gradient de densité de Percoll (30 - 40 - 50 - 60 - 70% ; v/v Percoll/EMFST ; 2000 g, 30 min,

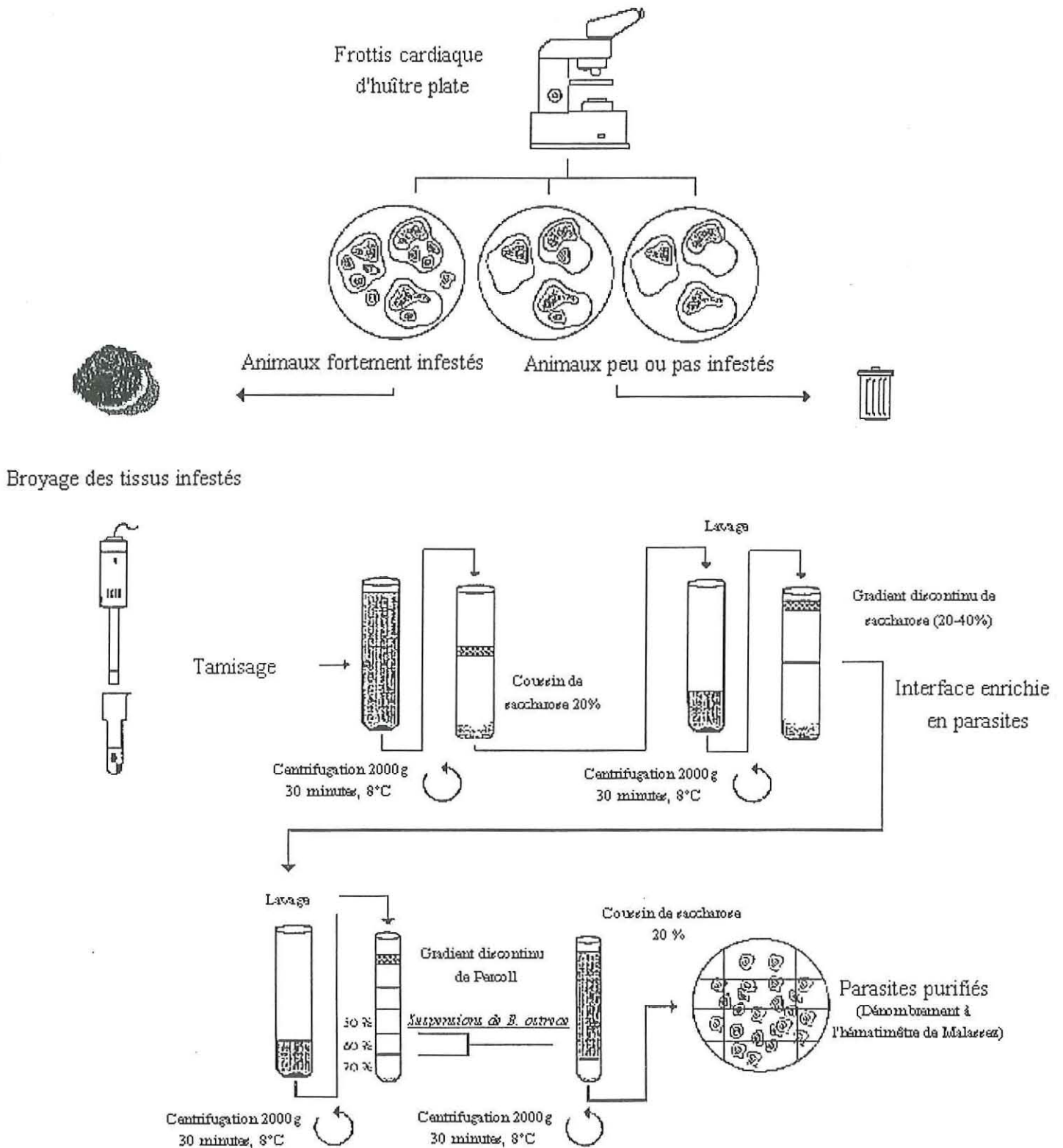


Figure 3. Protocole de purification du parasite *Bonamia ostreae*

8°C). L'osmolarité du percoll est ajustée à celle du milieu marin, c'est à dire 1100 mOsm, par addition de 4.1% de chlorure de sodium. Les parasites purifiés sont localisés aux interfaces 50-60% et 60-70% du gradient. Ils sont prélevés, à l'aide d'une seringue, dilués dans de l'eau de mer filtrée stérile sans Tween (EMFS), puis centrifugés (2000 g, 30 m, 8°C) sur un gradient de saccharose 20% (p/p dans de l'EMFS). Cette dernière étape permet d'éliminer le Percoll et de concentrer les protozoaires. La numération des parasites ainsi purifiés est réalisée à l'hématimètre de Malassez. Les suspensions de parasites, reprises dans 1 ml d'EMFS, sont directement utilisables pour des infections expérimentales.

Différents essais ont été réalisés au cours de ce travail afin d'améliorer les quantités de parasites purifiés obtenues après la purification. Notre objectif n'était pas de remanier le protocole initialement décrit, mais de tenter de l'analyser dans le but de l'optimiser. En effet, les purifications, réalisées jusqu'alors, donnaient des résultats de l'ordre de quelques dizaines de millions de parasites (Hervio, 1992). Ces quantités étaient insuffisantes pour les expériences prévues. Plusieurs paramètres ont été testés :

- nombre d'huîtres à utiliser par expérimentation,
- choix du degré d'infection des huîtres utilisées.

Des huîtres infectées naturellement ou infectées expérimentalement ont été utilisées pour ces expériences. Nous nous sommes cependant limités à l'utilisation de trois à six animaux par purification. En effet, un nombre plus important d'individus nécessite de multiplier de manière considérable les volumes des gradients de saccharose et de Percoll pour obtenir des rendements satisfaisants. La réalisation du protocole de purification s'en trouve alourdie.

2.1.2. Infection expérimentale

Les huîtres sont anesthésiées dans une solution de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) à 5% dans un mélange eau de mer filtrée-eau douce (v/v). Cette solution, après quelques heures de contact, permet l'ouverture des valves sans tronçonner

préalablement la coquille. Cette anesthésie permet d'inoculer la suspension de parasites purifiés directement dans la cavité péricardique des animaux (Hervio *et al.*, 1995). En effet, c'est la structure du système circulatoire la mieux différenciée et la plus facilement repérable macroscopiquement (Figures 4A et B). Après l'inoculation, les animaux sont replacés dans de l'eau de mer, sans chlorure de magnésium. Ils récupèrent complètement après deux ou trois heures d'immersion.

Pour l'expérience de cytologie comparative d'huîtres sélectionnées et témoins, une centaine d'huîtres de chaque groupe : Quiberon (QUIB), Palavas (PAL), G1xTQuib et G1xG2 a subi une inoculation par injection de 100 000 parasites purifiés, sous un volume de 50 μ l d'eau de mer filtrée (0.22 μ m), stérile, dans la cavité péricardique. L'inoculum est injecté à l'aide d'une seringue stérile de 1 ml et d'une aiguille (0.9x40 mm).

Cette inoculation a permis pour chacune des populations de tester les niveaux de résistance. Des animaux non inoculés ont servi de contrôle en indiquant l'état de la population et l'évolution naturelle de la mortalité due au parasite *B. ostreae*.

2.1.3. Maintien des animaux au laboratoire

Les animaux inoculés ont été répartis dans 4 bacs contenant 400 litres d'eau de mer filtrée au laboratoire de la Tremblade. Pendant les sept mois d'expérience, l'oxygénation de l'eau de chaque bac a été assurée par un circuit en surpression. L'eau est renouvelée à raison de 15 minutes toutes les quatre heures. Les huîtres ont été nourries avec un mélange de cinq espèces de microalgues (*Skeletonema costatum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Pavlova lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis sp.*) utilisé en routine au laboratoire de La Tremblade.

En raison de la structure limitée de la salle de quarantaine au laboratoire de La Tremblade, les animaux témoins ont été maintenus, dans des conditions similaires, au laboratoire IFREMER de Bouin.

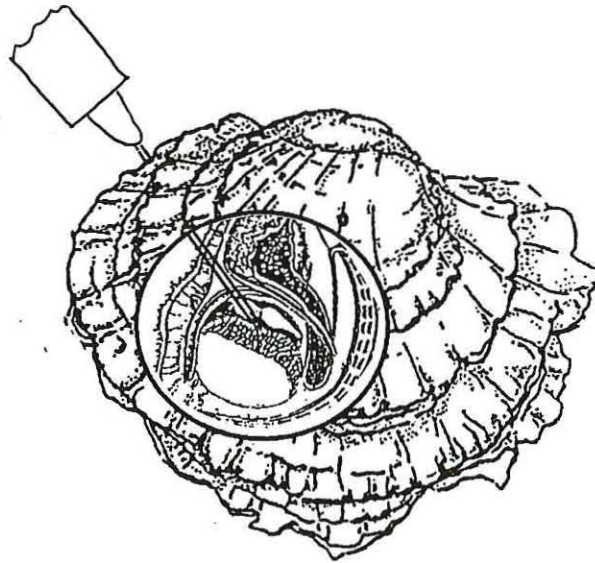


Figure 4A. Schéma représentant l'inoculation de parasites dans la cavité péricardique



Figure 4B. Huître plate, *Ostrea edulis*, ouverte. Noter la cavité péricardique située entre le muscle adducteur et la masse digestive (flèche)

L'état d'infection des animaux morts en cours d'expérience est contrôlé par observation d'empreintes de tissus cardiaques (cf. paragraphe 2.2.1.1 et 2.2.1.5).

2.2. Techniques histologiques et cytologiques

2.2.1. Microscopie photonique

2.2.1.1 Empreintes tissulaires

Des appositions de tissus de branchie et de ventricule cardiaque sont réalisées. Après ouverture de l'huître, le ventricule ou un fragment de branchie est prélevé et essoré sur papier filtre. Une série d'appositions est alors effectuée sur une lame histologique. En fonction des expériences, les préparations sont :

- soit directement colorées à l'aide du kit Hémacolor (Merck), pour observer *la morphologie cellulaire* (cf. paragraphe 2.2.1.1),
- soit fixées par une solution de méthanol ou d'acétone, pendant 10 min, et stockées à - 20°C jusqu'à utilisation, pour *l'immunohistochimie* (cf paragraphe 2.4)
- soit fixées en glutaraldéhyde (en cacodylate 0.4M), pendant 5 min, et stockée à +4°C jusqu'à utilisation, pour *l'enzymologie* (cf. paragraphe 2.3.6).

2.2.1.2. Préparations hémocytaires

• Prélèvement des hémocytes

Après ouverture précautionneuse de la coquille, afin de ne pas léser la membrane péricardique, l'hémolymphe est prélevée directement, à l'aide d'une seringue stérile de 1 ml et d'une aiguille (0.9x40 mm) dans la cavité péricardique de l'animal, sur une solution anti-agrégante d'Alsever (1 vol/3 vol) (glucose : 20.8 g ; citrate de Sodium : 8 g ; EDTA : 3.36 g ; NaCl : 22.3 g ; H₂O : 1000 ml ; pH : 7).

- Numération des hémocytes

Des aliquots des échantillons prélevés servent à effectuer un comptage des hémocytes totaux à l'hématimètre de Malassez.

- Séparation des types hémocytaires

Les hémocytes vivants d'huître plate, prélevés sur solution d'Alsever, sont séparés sur gradients discontinus de saccharose (5, 10, 20 et 30 %), Percoll (10, 30, 50 et 70%) ou de Ficoll (5, 10, 15 et 20%). Les fractions obtenues sont rincées deux fois en solution d'Alsever pour éliminer le Percoll. Une fois recueillies, ces fractions sont analysées, en microscopie photonique, par la méthode de cytocentrifugation.

- Cytocentrifugation

La technique de cytocentrifugation permet de réaliser des préparations avec un nombre déterminé de cellules. 300 000 hémocytes sont déposés sur lame histologique par centrifugation (100 g, 1 min) à l'aide d'une centrifugeuse Universal 16 R (Hettich). En fonction de leur utilisation, les cytocentrifugations d'hémocytes sont soit fixées, soit colorées, comme décrit précédemment pour les empreintes tissulaires (cf. paragraphe 2.2.1.1).

2.2.1.3 Préparations parasitaires

Les parasites purifiés sont obtenus en suivant la procédure décrite au paragraphe 2.1.1.. Après la dernière étape du protocole de purification, les parasites purifiés sont dénombrés à l'hématimètre de Malassez, et des cytocentrifugations sont réalisées avec $15 \cdot 10^6$ parasites par lames. Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites pour les hémocytes. En fonction de leur utilisation, les cytocentrifugations de parasites sont soit fixées, soit colorées comme décrit précédemment pour les empreintes tissulaires (cf. paragraphe 2.2.1.1).

2.2.1.4. Préparations tissulaires

La confection des coupes histologiques nécessite plusieurs étapes : la fixation des tissus, la déshydratation après fixation, l'imprégnation et l'inclusion des échantillons en paraffine.

- Fixation

L'huître est extraite de sa coquille après section du muscle adducteur. L'animal est ensuite coupé suivant le plan saggital de façon à obtenir deux moitiés comprenant un morceau de masse viscérale, une partie des branchies et du manteau. Une moitié est fixée dans une solution de Davidson (Eau de mer : 1200 ml ; alcool à 95° : 1200 ml ; formaldéhyde 40% : 300 ml ; glycérol : 400 ml ; acide acétique : 10 % à rajouter extemporanément), l'autre moitié est fixée dans une solution de Carson (NaH_2PO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$: 23.4 g ; NaOH : 5 g ; H_2O : 900 ml ; formaldéhyde 40% : 100 ml ; pH 7.2). Le liquide de Davidson permet une bonne définition des structures tissulaires et permet également la réalisation d'une gamme étendue de colorations. Le liquide de Carson est moins approprié que le liquide de Davidson pour la préservation de la morphologie cellulaire. Cependant, il permet une bonne conservation de l'ultrastructure et est principalement utilisé pour conserver les échantillons susceptibles d'être analysés ultérieurement en microscopie électronique à transmission. Un troisième fixateur, le liquide de Carnoy peut être utilisé pour des applications en immunohistologie. Ce fixateur conserve les structures antigéniques (alcool absolu 600 ml ; chloroforme 30 ml ; acide acétique 10 ml).

- Déshydratation et imprégnation en paraffine

Après fixation, dans le liquide de Davidson, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol 95° et d'éthanol 100°. La déshydratation se poursuit par deux bains de xylène qui éliminent l'alcool et préparent à l'imprégnation en paraffine liquide (60°C). Ces différentes étapes sont réalisées à l'aide d'un automate à inclusion Tissue-Tek (Miles). L'échantillon est ensuite inclus en bloc de paraffine à l'aide d'une console LKB.

- Confection des coupes

Des coupes de 3 µm d'épaisseur sont réalisées au moyen d'un microtome (LKB). Ces dernières sont prélevées sur une lame de verre à la surface d'un bain d'eau distillée, maintenu à 45°C, puis égouttées avant d'être séchées une nuit à l'étuve à 60°C. Ce séchage à chaud permet d'éliminer l'excès de paraffine et facilite l'adhérence des coupes à la lame.

2.2.1.5. Colorations

- Coloration des préparations cytocentrifugées et des empreintes tissulaires

Les préparations d'hémocytes cytocentrifugés et d'empreintes tissulaires peuvent être colorées aussitôt après réalisation en utilisant le kit Hémacolor (Merck). Cette coloration est une variante de la coloration au May-Grünwald Giemsa. Elle consiste en trois bains successifs de quelques secondes dans une solution de méthanol, dans une solution A, puis une solution B. Après rinçage à l'eau courante, et séchage à l'air, les lames sont montées entre lame et lamelle dans une goutte d'Eukitt.

- Coloration des coupes histologiques

Les coupes histologiques nécessitent d'être déparaffinées, puis réhydratées avant coloration. Dans ce but, les lames sont placées dans des bains successifs de xylène (2x10 min), d'éthanol absolu (2x10 min) qui élimine ce solvant, et d'eau courante (1x15 min). Puis, elles sont colorées à l'hématoxyline/éosine. Cette coloration est retenue en routine au laboratoire, car sa mise en oeuvre est simple et reproductible. Elle représente une bonne coloration pour les recherches topographiques.

La coloration à l'hématoxyline permet de colorer les structures nucléaires ou basophiles en bleu-violet foncé, les ergastoplasmes en bleu, et les cytoplasmes en gris ; les autres structures étant colorées en rose par l'éosine.

Cette coloration consiste à immerger successivement les lames dans :

- Hématoxyline	3 min
- Eau du robinet	5 min

- Eosine (1%)	3 min
- Eau du robinet	30 sec
- Ethanol absolu	3x10 sec
- Xylène	2x1 min

Les préparations sont ensuite montées entre lame et lamelle en résine Eukitt. Les compositions de l'hématoxyline et de l'éosine sont présentées en annexe 1.

2.2.1.6. Détermination du degré d'infection

Les empreintes tissulaires, colorées à l'aide du kit Hémacolor (Merck) sont particulièrement bien adaptées au diagnostic histologique de *Bonamia ostreae*, car elles sont représentatives de l'infection (Hervio, 1992) et permettent une visualisation aisée des parasites. Les parasites libres et intracellulaires sont facilement identifiables au microscope photonique à l'immersion (x1000). Le niveau d'infection est codé en quatre catégories :

- **la classe 0** concerne les cas pour lesquels aucun parasite n'est observé après 5 minutes d'examen microscopique,
- **la classe +** correspond à une détection de moins d'une dizaine de parasites par champs observés,
- **la classe ++** regroupe les cas d'infection permettant d'observer entre 10 et 100 parasites par champs observés,
- **la classe +++** concerne les infections avancées pour lesquelles des parasites sont présents dans pratiquement tous les hémocytes.

2.2.1.7. Identification cytologique et comptage des différents types cellulaires

La reconnaissance et le comptage des types hémocytaires sont réalisés par observation en microscopie photonique de préparations cyto centrifugées et colorées à

l'aide du kit Hémacolor (Merck). Ces paramètres sont déterminés après observation d'un minimum de 100 cellules par animal examiné.

Pour l'expérience de cytologie comparative, *in vivo*, les analyses, sept mois après l'infection expérimentale, ont porté sur 365 animaux des populations sensibles Quiberon (QUIB), Palavas (PAL) et sélectionnées G1xTQuib et G1xG2 : 245 ayant survécu à l'inoculation et 120 animaux témoins (non inoculés). Une analyse statistique des pourcentages de chaque type cellulaire a été réalisée avec un risque $\alpha = 5\%$.

Pour l'étude de cytologie comparative réalisée en microplaques, *in vitro*, le pourcentage des types hématocytaires est réalisé quotidiennement par comptage des cellules présentes dans quatre puits. Une analyse statistique des pourcentages a été réalisée avec un risque $\alpha = 5\%$.

2.2.2. Microscopie électronique à transmission

2.2.2.1. Préparation des hémocytes

Les hémocytes sont fixés en les diluant (v/v), au moment du prélèvement, dans la solution de fixation : glutaraldéhyde 3 % en cacodylate (0.4 M) dont l'osmolarité est ajustée à 1100 mOsm avec du chlorure de sodium. Après lavage en tampon cacodylate (0.2 M, pH 7.2 ; 2x10 min) et centrifugation (200 g, 10 min, 4°C), les cellules sont post-fixées au tétraoxyde d'osmium à 1% en tampon cacodylate (0.2M ; pH 7.2), pendant 1 h, à 4°C. Des lavages des hémocytes en tampon cacodylate (2x10 min) précèdent leur inclusion dans de l'agarose à 1% (Low Melting Point, Sigma). Cette inclusion a pour but de limiter la perte des cellules au cours des étapes de déshydratation. Après centrifugation (200 g, 10 min, 4°C), le bloc d'agarose contenant les cellules est successivement déshydraté dans des bains d'éthanol 70°C (1x10 min), d'éthanol 95°C (2x10 min), d'éthanol 100°C (3x20 min). La déshydratation est achevée par deux bains de 15 minutes en oxyde de propylène, qui éliminent l'alcool. Ce solvant prépare également l'imprégnation en résine Epon. Le bloc d'agarose contenant les hémocytes est imprégné progressivement dans un premier bain d'une

heure dans un mélange Epon/oxyde de propylène (v/v), puis dans un deuxième bain d'une heure en Epon seul. L'inclusion du bloc d'agarose est réalisée dans des moules remplis de résine et polymérisée pendant 48 heures à 60°C.

La composition des solutions est présentée en annexe 2.

2.2.2.2. Préparation des tissus

La procédure décrite au paragraphe 2.2.2.1. s'applique également aux tissus (branchies, coeur), excepté l'inclusion dans l'agarose. En effet, la taille des pièces fixées ne nécessite pas de réaliser cette étape.

Si les échantillons ont été préalablement fixés et conservés dans le liquide de Carson, il est nécessaire de redécouper des pièces d'environ 1 mm³ et de les rincer par trois ou quatre bains de 24 heures en tampon cacodylate (0.2M, pH 7.2) à froid (4°C) avant de les fixer à nouveau en glutaraldéhyde 3%. La procédure suivie est ensuite la même que celle décrite au paragraphe 2.2.2.1.

2.2.2.3. Préparation des parasites purifiés

Les suspensions parasitaires sont soit fixées en glutaraldéhyde pour la morphologie, soit fixées en paraformaldéhyde-glutaraldéhyde pour l'immunologie.

- La préparation des suspensions parasitaires après *fixation en glutaraldéhyde* suit le protocole décrit pour la préparation des hémocytes (cf. paragraphe 2.2.2.1.).

- Pour *la fixation en paraformaldéhyde-glutaraldéhyde*, après purification, les suspensions parasitaires sont lavées (3 x 10 min) en eau de mer filtrée stérile, avant d'être fixées dans un mélange de paraformaldéhyde 4% et de glutaraldéhyde 0.5% (en cacodylate 0.4M), pendant une nuit à 4°C. Ce fixateur est utilisé afin de mieux préserver les structures antigéniques. La post-fixation au tétroxyde d'osmium est supprimée. Après trois lavages en tampon cacodylate (0.2M, pH7.2), les échantillons sont déshydratés par des bains d'alcool croissant (70° : 10 min ; 95° : 2 x 10 min ; 100° ; 3 x 20 min). Chaque étape est suivie d'une centrifugation (200 g, 10 min). Une

résine d'inclusion plus hydrophile et plus perméable est retenue pour l'inclusion : la résine LR-white qui polymérise à froid.

2.2.2.4. Coupes semi et ultra-fines

Après polymérisation de la résine (48h à 60°C), des coupes semi-fines (1µm), puis ultra-fines (60 à 90 nm) sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome LKB.

Les coupes semi-fines sont déposées sur des lames histologiques, puis sont colorées à chaud (90-100°C) par une solution de bleu de toluidine 1% en solution de borate de sodium (Na₂B₄O₇ 1%; pH 11). L'excès de colorant est éliminé par rinçage à l'eau distillée. Après séchage à l'air, les lames sont montées avec une goutte de résine Eukitt, et observées au microscope photonique.

Les coupes ultra-fines sont déposées sur des grilles de cuivre, puis séchées à l'air. Elles sont contrastées par une solution d'acétate d'uranyle, puis par une solution de citrate de plomb. La préparation des réactifs ainsi que le protocole de contraste sont détaillés en annexe 3.

L'observation des grilles est réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL 1200EX, à 80kV.

2.3. Techniques biochimiques

2.3.1. Préparation des échantillons

L'obtention de quantités importantes de parasites purifiés a permis d'envisager la caractérisation électrophorétique du parasite. Une mise au point d'un protocole de lyse a été nécessaire afin d'obtenir des concentrations optimales pour les protéines du parasite.

Des travaux ont été réalisés afin de définir les conditions permettant d'obtenir une forte concentration des protéines et, de déterminer le volume de tampon de lyse le plus adapté. En particulier, différents traitements physiques (ultrasons, congélations successives) ont été testés, afin de définir les conditions permettant une meilleure

dissociation des échantillons. Plusieurs traitements, avant l'addition du tampon de lyse, ont été réalisés :

- des essais de deux congélations successives à - 80°C ou - 170°C,
- des essais de sonication (400W / 10 secondes),

Différents temps de contact avec le tampon de lyse ont été expérimentés (30 min, 45 min , 1 heure et 12 heures).

L'ajout de différents agents antiprotéases (PMSF, EDTA, Aprotinine) a été testé dans le tampon de lyse.

Les parasites sont dissociés dans 30 µl de tampon de lyse pour 10⁶ parasites (Annexe 4). Après rajout du tampon de lyse, les suspensions parasitaires sont maintenues sur glace, pendant 45 min. Les échantillons sont vortexés plusieurs fois au cours de ce traitement.

Des volumes de 10 à 100 µl de lysat parasitaire sont utilisés pour quantifier les protéines totales, le reste étant stocké à - 20°C jusqu'à utilisation.

2.3.2. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines est effectué soit selon la méthode modifiée de Lowry *et al.* (1951), soit à partir d'un kit de dosage en microplaque de 96 puits (Pierce).

•Méthode modifiée de Lowry *et al.* (1951)

Le dosage des protéines est réalisé à partir de 50 µl ou 100 µl du lysat de parasites. Les solutions A et B (Annexe 5) ainsi qu'une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 1 mg/ml sont préparées. Une courbe étalon est alors réalisée selon le protocole décrit ci-après :

Tube n°	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Eau distillée (µl)	400	195	193	190	185	180	170	150	100
BSA (µg/µl)	0	5	7	10	15	20	30	50	100
Solution A (ml)	2	1	1	1	1	1	1	1	1

Parallèlement, les échantillons de 50 ou 100 µl, à doser, sont préparés :

Echantillon		
Eau distillée (µl)	150	100
Lysat parasitaire (µl)	50	100
Solution A (ml)	1	1

L'ensemble des tubes est incubé 10 min, à température ambiante. La solution B est alors additionnée à raison de 2 ml dans le tube témoin n° 0 et 1 ml pour les autres tubes. Une nouvelle incubation de 30 min, à température ambiante, précède la lecture de la densité optique de chaque tube à 750 nm, en cuve en verre. Une courbe étalon, correspondant aux valeurs de densité optique obtenues en fonction de la concentration en BSA, est ensuite réalisée et la concentration en protéines de l'échantillon en est déduite.

• Kit de dosage (Pierce)

Ce kit utilise l'acide bicinchoninique (BCA). L'interaction entre deux molécules de BCA avec l'ion Cu⁺⁺ se traduit par une réaction colorimétrique pourpre soluble dans l'eau. Cette réaction peut être quantifiée par une lecture de la densité optique de l'absorbance à 562 nm. L'avantage de ce kit est qu'il ne nécessite que de petites quantités de lysats parasitaires pour effectuer le dosage (5 et 10µl).

Le standard protéique, utilisé dans le kit est une solution de BSA (1mg/ml). La courbe standard, effectuée pour chaque dosage, est réalisée comme suit :

Tube n°	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Eau distillée (µl)	100	95	93	90	85	80	70	50	0
BSA (µg/µl)	0	5	7	10	15	20	30	50	100
Solution du kit(µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

De même, les échantillons sont préparés :

Echantillon		
Eau distillée (µl)	95	90
Lysat parasitaire (µl)	5	10
Solution du kit (µl)	100	100

2.3.3. Electrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)

La mise au point d'un protocole de lyse étant réalisée, il a été entrepris de caractériser les protéines constitutives du parasite *Bonamia ostreae* par électrophorèse, en SDS-PAGE, en conditions dénaturantes et réductrices. C'est une technique en milieu dissociant, dans lequel les charges électriques des protéines sont masquées par un détergent anionique, le dodecyl sulfate de sodium (SDS). Les molécules migrent alors uniquement en fonction de leur masse moléculaire. Pour améliorer la résolution, un gradient d'acrylamide 9-17.5 % a été utilisé pour la séparation (Annexe 6).

Deux types de gel sont utilisés : des grands gels (16 cm x 16 cm) et des minigels (9 cm x 9 cm).

• Séparation des protéines sur « grands gels »

Le protocole dérive de la méthode originale de Laemmli (1970). Après polymérisation du gel de séparation, pendant une heure, à température ambiante, ce dernier est surmonté d'un gel de concentration à 5.2 % (Annexe 6) qui polymérise en 20 min.

Les lysats parasitaires sont dilués au demi dans du tampon de dépôt dénaturant (présence de β -mercaptoéthanol ; annexe 6) et chauffés à 100°C, au bain marie, pendant 3 min. Une nouvelle centrifugation (3000 g, 10 min) permet de récupérer le surnageant protéique.

Les échantillons refroidis sur glace sont déposés à raison de 1 à 2 mg de protéines totales par puits. Une concentration de 2.67 mg de protéines totales par puits est utilisée pour la détection ultérieure des protéines par immunotransfert. Des marqueurs de masses moléculaires sont utilisés selon les recommandations du fournisseur. Ils sont déposés en référence pour établir un étalonnage reliant la mobilité relative des protéines au logarithme de leur masse moléculaire. La migration se déroule, en tampon de migration (Annexe 6), dans une cuve à électrophorèse réfrigérée, pendant approximativement 6 h, à 30 mA par gel et une tension de 500 V.

• Séparation des protéines sur minigel

Dans certains cas, la séparation électrophorétique des protéines est effectuée à l'aide d'un système de minigel (Biorad). Le protocole est le même que précédemment. L'électrophorèse se déroule, pendant 45 min, sous 25 mA et une tension de 500 V. L'intérêt de ce système est qu'il permet de réaliser des dépôts de concentration compris entre 5 et 10 μ g par puits du fait de la taille réduite des gels (9 cm x 9 cm).

• Colorations des gels

Après migration, les gels sont démoulés, et les spectres électrophorétiques peuvent être visualisés après une coloration au bleu de Coomassie ou une coloration à l'argent.

- Pour la coloration au *bleu de Coomassie*, le gel après démoulage est directement immergé dans une solution de bleu à 0.25% dans un mélange d'éthanol 40% et d'acide acétique 10%. L'excès de colorant est éliminé par plusieurs bains successifs d'un mélange d'éthanol, d'acide acétique et d'eau distillée (2 / 1 / 7).

- Pour la *coloration à l'argent*, après démoulage, les protéines sont fixées par un mélange d'éthanol 40% et d'acide acétique 10%, pendant une nuit, sous agitation douce. Il est ensuite nécessaire de fixer à nouveau le gel pendant 13 min, dans une solution fixante contenant du glutaraldéhyde (Annexe 7), préchauffée à 50°C, avant de l'incuber deux fois 8 min, dans 200 ml d'une solution à 10% d'éthanol et 5% d'acide acétique à 50°C. Il est rincé dans deux bains de 400 ml d'eau distillée préchauffée à 50°C, pendant 4 min. La coloration avec une solution de nitrate d'argent à 0.4% (préparée extemporanément) s'effectue à 37°C pendant 13 min, sous agitation, suivie de deux rinçages de 30 sec à l'eau distillée (500 ml), à température ambiante. Puis, la révélation est réalisée dans 200 ml d'une solution de révélation (Annexe 7), à température ambiante, à l'obscurité : un bain de 30 sec, suivi d'un bain de 4 à 6 min. Le bruit de fond est réduit par deux bains de 4 min dans une solution de "background reducer" (Annexe 7) avant de stopper la réaction dans une solution de glycérol à 10%.

Après coloration les gels sont observés au négatoscope ou analysés à l'aide du logiciel Electro (Alcatel).

2.3.4. Transfert électrophorétique

Deux types de membranes sont utilisées : les membranes de nitrate de cellulose (Millipore : leur capacité d'adsorption est comprise entre 25 et 120 µg de protéines par cm²), et les membranes de nylon modifié (Immobilon : la capacité de ce type de membrane est très supérieure aux précédentes et est d'environ 500 µg de protéines par cm²).

Les protéines séparées par électrophorèse en gel SDS-PAGE sont soumises à un transfert électrique destiné à réaliser des empreintes sur feuille de nitrate de cellulose ou de nylon. Les transferts électrophorétiques sont effectués à l'aide d'une unité Multiphor II Novablot (LKB). Neuf feuilles de papier filtre, imbibées de tampon de transfert (Annexe 8) sont déposées sur la plaque de graphite inférieure, reliée à l'anode, en évitant de piéger des bulles d'air. La membrane de nitrate de cellulose ou de nylon, imbibée de tampon est ensuite déposée, suivie du gel (sans la zone de concentration), puis de neuf feuilles de papier filtre imbibées de tampon.

L'ensemble est recouvert par la deuxième plaque de graphite, reliée à la cathode. Le transfert est réalisé pendant une heure sous un ampérage correspondant à 0.8 mA/cm². Après transfert, les feuilles de nitrate de cellulose ou d'Immobilon, séchées à température ambiante, sont conservées à 4°C dans une pochette plastique scellée.

Pour vérifier l'efficacité du transfert sur membrane, les protéines peuvent être colorées au rouge Ponceau pendant 10 min. Après plusieurs rinçages en eau distillée, la membrane est séchée et stockée dans une pochette plastique scellée à +4°C jusqu'à son utilisation. Le gel peut également être coloré au bleu de Coomassie. L'absence de bandes confirme la réussite du transfert.

Après le transfert, les membranes peuvent être colorées au nitrate d'argent pour permettre de préciser la masse moléculaire des protéines ultérieurement marquées en western blotting. Les membranes sont lavées 5 min à l'eau distillée, puis colorée 10 min, sous agitation, dans une solution de coloration (Annexe 9) et finalement rincées dans plusieurs bains d'eau distillée.

2.3.5. Révélation de glycoprotéines

Une recherche de glycoprotéines a été effectuée après séparation électrophorétique, en conditions dénaturantes et réductrices, et transfert sur membrane de nitrocellulose et de nylon modifié. Par ailleurs, les glycoprotéines ont été recherchées directement sur gel de polyacrylamide, et sur parasites purifiés.

2.3.5.1. Sur membranes de nitrocellulose ou de nylon

La recherche des glycoprotéines sur membranes de transfert a été réalisée à l'aide de la Concanavaleine A (ConA) isolée de *Canavalia ensiformis*. Cette lectine reconnaît spécifiquement les résidus D-mannose et D-glucose. Par ailleurs, elle possède une grande affinité pour la peroxydase, ce qui permet d'utiliser cette dernière comme révélateur en présence d'un de ses substrats spécifiques.

Après transfert des protéines, la membrane est saturée en tampon Tris contenant 5% de Tween 20, pendant deux heures à 47°C. Après un lavage rapide en tampon Tris, elle est incubée avec la Concanavaline A (Con A : 500 µg/ml en tampon Tris) pendant 30 min. Après trois lavages en tampon Tris, la membrane est incubée avec la peroxydase (250 mg/ml en tampon Tris), pendant 30 min. Enfin, l'activité catalytique de la peroxydase est révélée en utilisant la diaminobenzidine comme substrat (DAB : 0.05% en tampon Tris + 0.3 % d'H₂O₂). Les différentes étapes sont réalisées à température ambiante, sous agitation douce. Lorsque la coloration est intense, il est possible d'arrêter la réaction par un bain d'acide sulfurique dilué (3 gouttes dans 100 ml d'H₂O), pendant trois minutes.

2.3.5.2. Sur parasites purifiés

La mise au point d'un protocole adapté aux suspensions parasitaires a été nécessaire. Toutes les dilutions sont effectuées en eau de mer filtrée stérile pour conserver l'osmolarité du milieu marin. D'autre part, les temps d'incubation ont été écourtés pour préserver les parasites.

Après la purification, la suspension parasitaire est rincée dans trois bains d'eau de mer filtrée stérile (EMFS : 3x10 min). Après centrifugation (1000 g, 10 min), la Con A (0.05 mg/ml dans EMFS) est ajoutée à la suspension, sous agitation douce, pendant 15 min. Trois lavages sont effectués dans de l'EMFS. La peroxydase (0.05 mg/ml dans de l'EMFS) est incubée pendant 15 min, sous agitation douce. Deux lavages sont réalisés en EMFS (2x5 min), avant la fixation en glutaraldéhyde 3% en cacodylate (0.4M), 15 min. Après trois rincages, en tampon cacodylate (0.2M, pH 7.2), l'activité de la peroxydase est révélée par une solution de diaminobenzidine (0.5 mg/ml en EMFS + 2 gouttes d'H₂O₂) pendant 15 min. La suspension parasitaire, après trois lavages en tampon cacodylate, est post-fixée par l'acide osmique 1% (en tampon cacodylate). Les méthodes de déshydratation et d'inclusion sont identiques à celles des échantillons fixés classiquement pour la microscopie électronique à transmission (cf. paragraphe 2.2.2.1.).

2.3.5.3. Sur hémocytes totaux

Le protocole est identique à celui décrit pour les parasites purifiés (cf. paragraphe 2.3.5.2.).

2.3.5.4. En gel SDS-PAGE

La révélation des glycoprotéines peut être effectuée, directement sur gel SDS-PAGE, après oxydation par l'acide périodique. Cet agent rompt les liaisons entre deux carbones de certains groupes chimiques (groupe glycol-1-2, hydroxy-1 amino -2, hydroxy-alkylamino-2, hydroxy-1 ceto-2) en faisant apparaître des aldéhydes. Ces aldéhydes peuvent être ensuite visualisés par le réactif de Schiff qui forme avec eux un produit de condensation de couleur pourpre.

Une deuxième réaction a été réalisée, qui utilise une coloration à l'argent (Dubray et Bezard, 1982). Le principe est le même, cependant la sensibilité est meilleure.

2.3.6. Recherche d'activités enzymatiques

2.3.6.1. A l'aide du système API ZYM

Les contenus enzymatiques de populations hémocytaires totales, de populations d'hémocytes séparés, d'hémocytes provenant d'animaux sains et d'animaux parasités ont été déterminés à l'aide du test API ZYM (Biomérieux). Cette microméthode semi-quantitative permet d'étudier rapidement et simultanément dix neuf activités enzymatiques. Ce système consiste en une galerie de 20 microcupules comportant une trame fibreuse inerte contenant les substrats qui permet, à partir de faibles quantités d'échantillon, la détection qualitative et semi-quantitative des 19 activités enzymatiques.

L'hémolymphe est prélevée directement dans la cavité péricardique et le nombre de cellules est évalué à l'aide d'un hématimètre de Malassez. Les cellules sont ensuite centrifugées (200 g, 10 min), puis remises en suspension en eau distillée afin d'obtenir une concentration finale de 5.10^6 cellules/ml. La suspension est ensuite traitée aux ultrasons (Labsonic, 100 W, 10 sec). Chaque cupule d'une galerie est remplie avec 65 μ l de cette suspension. Après une incubation de 4 h à 37°C, les activités enzymatiques sont révélées à l'aide des réactifs fournis (ZYM A et ZYM B). L'intensité des réactions colorimétriques en relation avec la quantité d'enzymes présentes est estimée visuellement à l'aide de l'échelle de lecture fournie dans le kit.

2.3.6.2 En microscopie photonique

Quatre activités enzymatiques (α -Naphthyl butyrate estérase, β -Glucuronidase, Naphthol AS-D chloroacétate estérase et α -Naphthyl acétate estérase) ont été recherchées en utilisant des kits commercialisés par Sigma (réf. 181B, 181C, 91C et 91A). Ces recherches ont été effectuées soit sur empreintes de tissus cardiaque réalisées à partir d'animaux sains et parasités, soit sur préparations cytocentrifugées d'hémocytes sains et parasités, soit sur préparations cytocentrifugées de parasites purifiés (cf. paragraphes 2.2.1.1 et 2.2.1.2.). Quelques modifications ont toutefois été apportées aux kits, notamment la fixation et les temps d'incubation. Les préparations ont été fixées en glutaraldéhyde 3% en cacodylate (0.4M) pendant 10 min. Les durées d'incubation ont été augmentées et sont respectivement pour α -Naphthyl butyrate estérase, β -Glucuronidase, Naphthol AS-D et α -Naphthyl acétate estérase, de 2 h, 18 h, 2 h et 2 h. Les procédures utilisées suivent ensuite les recommandations du fournisseur.

2.3.6.3. En microscopie électronique

✓ Glycérophosphatase

La fixation primaire est pratiquée à l'aide du fixateur utilisé pour l'étude de la morphologie (glutaraldéhyde 3% en cacodylate 0.4M). Après lavage en eau de mer

filtrée stérile, les cellules sont incubées dans les milieux réactionnels de révélation et témoin.

Milieu de révélation : Solution A.....10 vol

Solution B..... 1 vol

Le mélange est chauffée à 37°C pendant une nuit et filtré avant utilisation.

Solution A : Tampon acétate de sodium-acide acétique 0.05M, pH5.....100 ml
NaCl..... 3.20 g
Nitrate de plomb.....0.12 g

Solution B : NaCl 3%.....100 ml
 β -glycérophosphatase de sodium.....3.00 g

Le milieu témoin est le même que le milieu de révélation auquel la β -glycérophosphatase de sodium n'a pas été aditionnée.

Les culots cellulaires sont incubés à 37°C pendant 1h30, puis sont rincés dans les bains suivants pendant 5 min :

①: Tampon acétate de sodium-acide acétique ; ② : acide acétique 3% ; ③: tampon acétate de sodium-acide acétique. Les cellules sont alors post-fixées à l'acide osmique, les inclusions en Epon étant pratiquées comme précédemment (cf. paragraphe 2.2.1.). Les coupes ultra-fines sont observées sans contraste.

✓ *Cytidine monophosphate (Hervio et al., 1991)*

Les culots hémocytaires sont préparés comme précédemment, puis incubés dans le milieu de Novikoff et dans le milieu témoin.

Milieu de Novikoff: Cytidine 5'-monophosphate.....25 mg
H₂O.....12 ml
Nitrate de Plomb 1%.....3 ml
Tampon acétate de sodium 0.05M.....10 ml

L'osmolarité est ajustée avec du chlorure de sodium. Le milieu témoin est le même que le milieu de Novikoff auquel la cytidine 5'-monophosphatase n'a pas été additionnée.

Les culots sont incubés 1h30 à 37°C, dans les milieux à pH 2.7, puis lavés avec le tampon acétate de sodium 0.05 M. Ils sont ensuite post-fixés, déshydratés et inclus classiquement (cf paragraphe 2.2.2.1.). Les grilles sont observées sans contraste.

✓ *Thiamine pyrophosphatase (Robinson-Karnvosky, 1983)*

Les culots d'hémocytes sont préparés comme précédemment décrit, puis incubés dans les milieux de révélation et témoin.

<u>Milieu de révélation</u> : Thiamine pyrophosphatase.....	34 mg
Manganese chloride.....	20 mg
Cerium chloride.....	25 mg
Tampon Tris maléate 0.1M, pH 7.2.....	100 ml

L'osmolarité est ajustée avec du chlorure de sodium. Le milieu témoin est le même que le milieu de révélation auquel la thiamine pyrophosphatase n'a pas été additionnée.

Les culots hémocytaires sont incubés 1h à 37°C, puis sont rincés deux fois 10 min en tampon Tris-maléate 0.1 M, et une fois en tampon cacodylate (0.2M, pH 7.2). Ils sont ensuite post-fixés, déshydratés et inclus classiquement (cf. paragraphe 2.2.2.1.). Les grilles sont observées sans contraste.

2.4. Techniques immunologiques

La caractérisation antigénique du parasite a été réalisée à l'aide d'anticorps polyclonaux et monoclonaux. Différentes techniques ont été utilisées pour analyser et définir la spécificité de ces réactifs : immunotransfert, immunohistochimie et marquage à l'or colloïdal.

2.4.1. Anticorps monoclonaux

Les deux anticorps monoclonaux spécifiques de *B. ostreae*, 15C2 et 20B2, utilisés dans ce travail ont été préparés par Rogier *et al.*, (1991).

2.4.2. Production d'anticorps polyclonaux

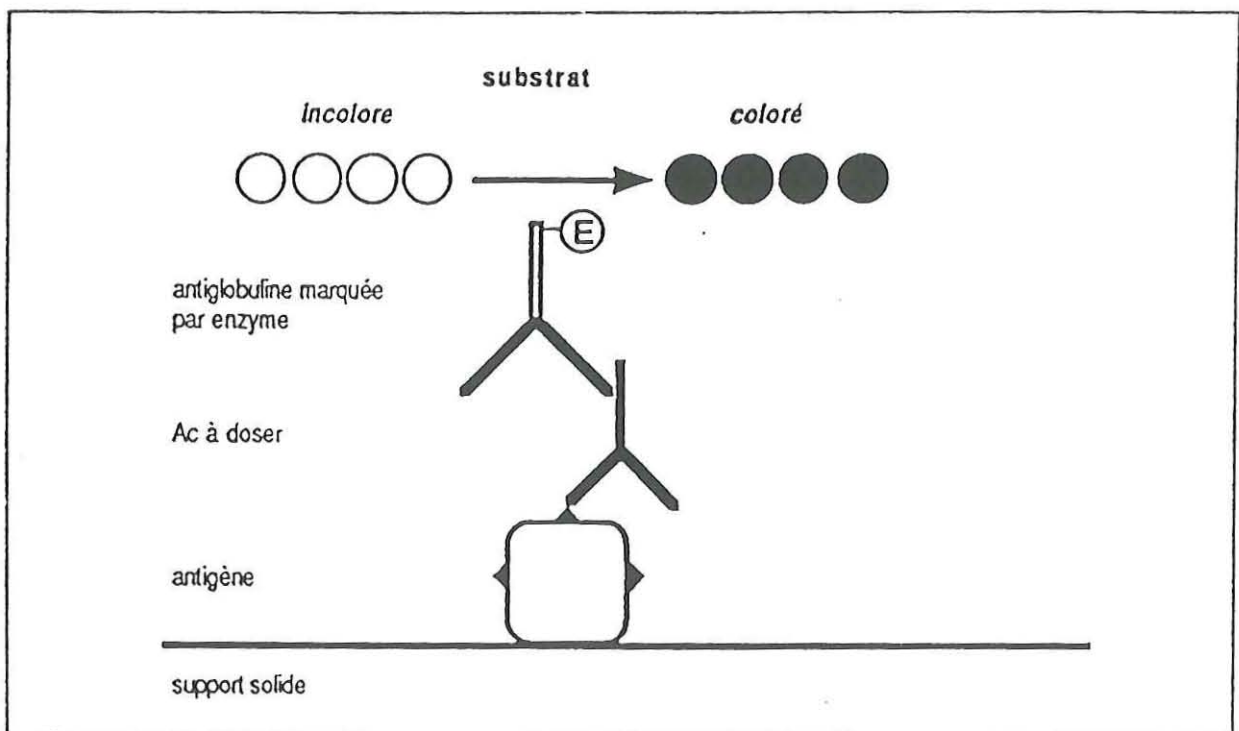
Des souris femelles OF1 reçoivent une injection intrapéritonéale de protéines séparées sur minigel SDS-PAGE. Un seul puit est aménagé dans le minigel de concentration. 300 µg (correspondant à $600 \cdot 10^6$ parasites purifiés) sont déposés dans ce puit. Après coloration au bleu de Coomassie, les bandes sélectionnées sont découpées, puis broyées dans un tube de Dounce avec 100µl de NaCl 9‰. Ces broyats sont ensuite dilués au 1/5ème en Adjuvant Complet de Freund, avant d'être injectés par voie intrapéritonéale. Quatre injections de rappel identiques sont effectuées à environ quinze jours d'intervalle. A l'issue de ces injections, les ascites induites par ce protocole d'immunisation sont prélevées, aliquotées, puis stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.4.3. Immunofluorescence indirecte

2.4.3.1. Sur coupes histologiques

L'immunoréactivité des anticorps polyclonaux et monoclonaux, vis-à-vis du parasite *B. ostreae*, a été testée sur coupes paraffine d'huîtres plates fortement infectées fixées au Davidson, au Carson, ou au Carnoy. Les ascites obtenues ont été testées à différentes dilutions, 1/50ème, 1/100ème et 1/500ème.

Pour ces études, des coupes paraffine de 10 µm d'épaisseur sont utilisées. Après le déparaffinage et la déshydratation (cf. paragraphe 2.2.1.3.), les coupes sont réhydratées dans deux bains de tampon phosphate (PBS : annexe 10) durant 10 min sous agitation. Toutes les étapes suivantes sont réalisées en atmosphère humide, et



Principe du dosage immuno-enzymatique indirecte

sont suivies par des rinçages en PBS (3x10 min), sous agitation. Une étape facultative de démasquage des antigènes peut être effectuée. Elle consiste à incuber les coupes en mélange PBS/Trypsine 0.25% (Gibco 1:250), pendant 5 à 15 min, à température ambiante, ou à rajouter à chaque étape 0.1mg/ml de saponine. Pour éviter la fixation non spécifique des réactifs sur les coupes, celles-ci sont saturées 1 heure (5 % de Régilait en PBS). Les solutions d'anticorps primaires utilisées correspondent soit à des surnageants de culture (pour les anticorps monoclonaux), soit à des ascites (pour les anticorps polyclonaux). 200 µl des solutions d'anticorps, aux dilutions choisies (en PBS - 1 % de Régilait), sont déposés sur les coupes, puis incubés pendant une heure, à température ambiante. Suit l'incubation avec l'anticorps marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (anticorps anti-IgG (H+L) de souris - Diagnostics Pasteur), diluée au 1/400ème dans une solution de PBS contenant 1% de bleu d'Evans. Ce dernier, qui colore en rouge les structures non marquées par les anticorps fluorescents, élimine la fluorescence endogène. Au terme d'une incubation d'une heure, à température ambiante, le montage est réalisé entre lame et lamelle en présence d'une goutte de tampon glycérimé (Diagnostics Pasteur). Les coupes sont observées au microscope à épifluorescence.

2.4.3.2. Sur empreintes tissulaires

Le protocole utilisé est comparable à celui rapporté au paragraphe 2.4.3.1.. Les frottis de tissus cardiaque fixés par le méthanol ou par l'acétone (cf. paragraphe 2.2.1.1.), après un passage rapide en tampon PBS, sont incubés avec les anticorps, aux dilutions choisies (1/50ème, 1/100ème et 1/500ème), 30 min, en chambre humide. Les préparations sont ensuite rincées trois fois en tampon PBS (3x10 min). L'anticorps secondaire anti-IgG (H+L) de souris, couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine est dilué au 1/400ème en tampon PBS contenant 1% de bleu d'Evans. Après incubation en chambre humide (30 min), les préparations sont à nouveau lavées avant d'être montées dans du tampon glycérimé et examinées au microscope à épifluorescence.

2.4.3.4. Sur parasites cytocentrifugés

Des préparations de 15.10^6 parasites sont préparées comme décrit au paragraphe 2.2.1.2.. Le protocole utilisé est identique à celui précédemment décrit pour les empreintes tissulaires (cf. paragraphe 2.4.3.3.).

2.4.4. Immunoperoxydase indirecte

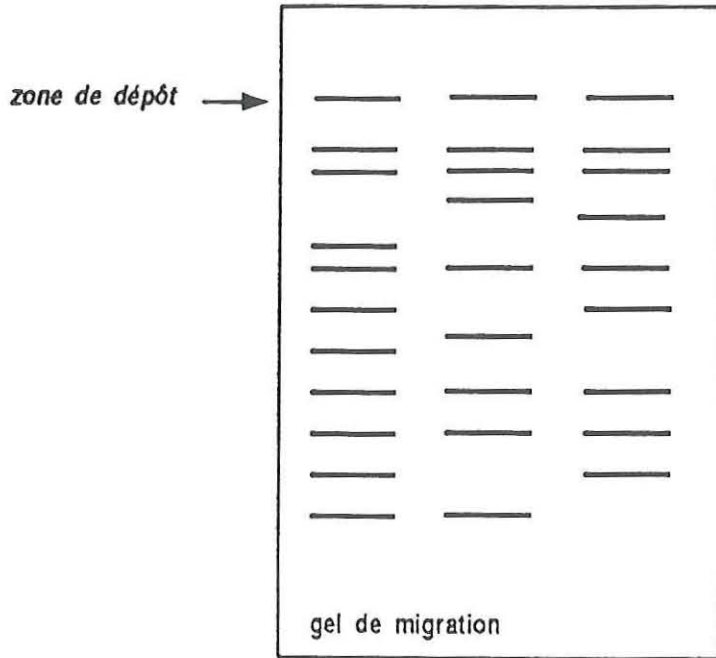
2.4.4.1. Sur coupes histologiques

Le protocole utilisé est comparable à celui décrit au paragraphe 2.4.3.1.. Une étape supplémentaire après le déparaffinage et l'hydratation en PBS est cependant nécessaire afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Elle correspond à l'immersion des lames 30 min dans un bain de méthanol contenant 3% d' H_2O_2 . Après incubation avec l'anticorps secondaire anti IgG (H+L) de souris marqué à la peroxydase (Diagnostics Pasteur), la révélation de l'activité peroxydasique s'effectue par immersion de 10 min dans un bain de PBS contenant 0.06% de 3 3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride et 0.03% d' H_2O_2 . Les coupes sont ensuite contre-colorées au bleu de Unna (1 min). Après un rinçage rapide en eau acétifiée (1 goutte d'acide acétique dans 100 ml d'eau distillée), elles sont déshydratées par l'éthanol 100° avant d'être montées entre lame et lamelle dans une goutte d'Eukitt.

2.4.5. Immunomarquage à l'or colloïdal

La localisation ultrastructurale des épitopes reconnus par les anticorps polyclonaux a été déterminée par une technique de marquage à l'or colloïdal. Cette technique a permis d'effectuer le marquage directement sur des coupes ultra-fines de parasites purifiés. Deux techniques de préparations des parasites ont été testées : une technique classique utilisée pour la morphologie qui consiste en une fixation en glutaraldéhyde, une post fixation à l'acide osmique, et une inclusion en Epon, et une

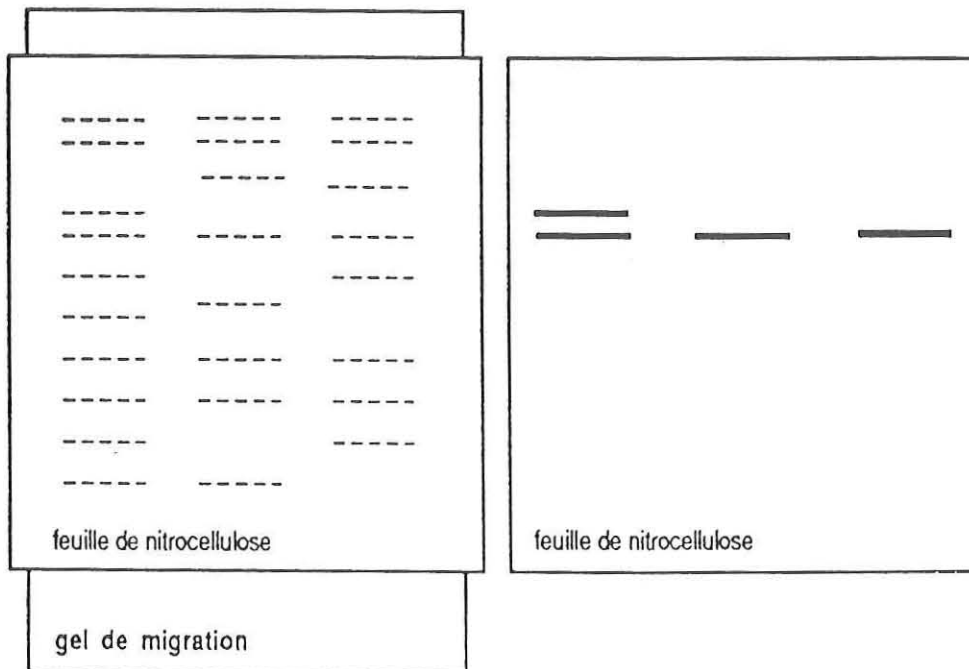
1er temps : électrophorèse en gel de polyacrylamide + SDS



+

2e temps : transfert sur nitrocellulose

3e temps : révélation immunoenzymatique



Principe de la technique de western blotting

technique moins destructrice pour les antigènes qui comporte une fixation en paraformaldéhyde et inclusion dans une résine plus hydrophile, le LR White (cf. paragraphe 2.2.2.2).

Un traitement préalable des coupes par une solution de métapériodate de sodium (4%) est nécessaire pour faciliter le démasquage des antigènes en les rendant plus accessibles. Après un lavage en eau distillée (1x5 min), les grilles sont incubées avec du PBS contenant du régilait (5%) pendant 20 min afin d'éviter la fixation non spécifique des réactifs sur les coupes. Elles sont ensuite lavées en tampon PBS avant d'être déposées sur des gouttes d'ascite diluée au 1/10ème (1h, à température ambiante). Un nouveau lavage précède l'incubation avec des anticorps anti-IgG (H+L) de souris, couplés avec des billes d'or de 15 nm (dilués 1/25ème en tampon PBS) pendant 1 h. Les grilles sont lavées en tampon PBS puis en eau distillée et sont finalement séchées à l'air. Elles sont ensuite examinées sans contraste.

2.4.6. Immunodétection sur membranes de nitrate de cellulose et de nylon

L'identification d'une ou de plusieurs protéines transférées sur membranes de nitrate de cellulose et de nylon peut être réalisée en utilisant des anticorps spécifiques. La quantité de réactifs nécessaire est faible. La sensibilité de cette technique est telle qu'elle permet de détecter quelques nanogrammes de protéines séparées par électrophorèse.

La membrane de nitrate de cellulose ou de nylon, après le transfert, est découpée en bandelettes, la largeur d'une bandelette correspondant à une piste ou à une demi-piste de migration. Les bandelettes doivent être préalablement saturées, pour éviter toutes fixations non-spécifiques, par une solution de PBS contenant 5% de Tween 20 et 5% de BSA, pendant une heure, sous agitation douce. Les anticorps primaires dilués au 1/10ème et au 1/100ème en PBS-Tween sont ajoutés et incubés pendant 1h. Les bandelettes sont ensuite lavées en tampon PBS-Tween (3x10 min) sous agitation, avant l'incubation avec l'anticorps anti-IgG (H+L) de souris marqué à

la peroxydase (Diagnostics-Pasteur). Au terme de trois lavages en PBS-Tween, l'activité peroxydasique est révélée comme précédemment décrite (cf. paragraphe 2.4.4.1.). Les bandelettes sont rincées abondamment à l'eau distillée et sont conservées à l'abri de la lumière.

2.5. Techniques de culture cellulaire

Les essais entrepris sont passés par plusieurs étapes successives :

✓ En premier lieu il était nécessaire d'adapter les méthodes à mettre en oeuvre, pour la culture de cellules de bivalves marins :

- Conditions d'asepsie des prélèvements
- Techniques de lavage des hémocytes
- Choix du support de culture (lames, microplaques...)

Pour ce faire, nous avons utilisé des milieux de culture utilisés au laboratoire (Le Deuff *et al.*, 1995 ; Renault *et al.* 1995), des milieux de base ou des milieux synthétiques (Annexes 11).

✓ A partir des résultats obtenus, différents essais ont été effectués afin d'améliorer la qualité des cultures (survie, multiplication ou aspect du tapis cellulaire) en additionnant soit du sérum foetal de veau, soit de l'hémolymphe d'huître.

2.5.1. Prélèvement des hémocytes

La surface externe de la coquille des huîtres est brossée sous l'eau courante, puis est décontaminée par un bain d'alcool absolu. Les huîtres sont ensuite séchées sous une hôte à flux laminaire. Pour la mise en culture des 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. Les huîtres sont délicatement ouvertes par section du muscle adducteur en faisant attention de ne pas

léser la membrane péricardique. Une fois ouverte, les huîtres sont rincées avec de l'alcool à 70°. Il est ensuite possible de ponctionner l'hémolymphe directement dans la cavité péricardique (seringue de 1 ml stérile, aiguille 0.9x40mm). 500 µl à 1000 µl d'hémolymphe sont ainsi ponctionnés, par animal, sur une solution antiagrégante d'Alserver stérile (1 vol/3 vol), contenant une préparation d'antibiotiques (Annexe 12). Les seringues et les aiguilles sont changées entre chaque animal pour éviter tout problème de contamination.

Après recueil de la totalité des hémolymphe, une centrifugation est réalisée pour mettre les hémocytes au culot (1000g, 10 min, 8°C). Le mélange hémolymphe/Alserver est éliminé par deux lavages successifs en grand volume d'eau de mer filtrée stérile, additionnée d'antibiotiques (Annexe 12). Un volume de 5 ml est laissé au fond des tubes pour limiter la perte des hémocytes. Le traitement permet de réduire au maximum la contamination bactérienne des hémocytes.

2.5.2. Mise en culture

Un protocole de lavage permettant de restreindre le nombre des contaminations en bactéries a été mis au point. Il consiste en une série de lavages du culot hémocytaire, en grand volume, à des vitesses décroissantes en solution d'Alserver stérile additionnée d'antibiotiques (Annexe 12). Ceci permet d'éliminer au maximum des contaminants par effet de dilution et effet des antibiotiques. Sont réalisés successivement :

- 2 lavages, après un temps de contact de 15 min sur glace, suivis chacun d'une centrifugation à 1000 g, pendant 15 min, à 8°C

- 2 lavages suivis chacun d'une centrifugation à 800 g, pendant 30 min, à 8°C

- 2 lavages suivis d'une centrifugation de 400 g, pendant 45 min, à 8°C.

La numération des hémocytes ainsi traités est effectuée à l'hématimètre de Malassez.

Après la numération, les cellules sont mises en culture dans le milieu choisi (Annexe 11). Les primocultures s'effectuent en microplaques de 96 puits, à des

densités de dépôt comprises entre $5 \cdot 10^5$ et 10^6 cellules par puits. Le volume réactionnel par puits est de 200 μ l.

Six expérimentations ont été réalisées en prélevant individuellement l'hémolymphe par ponction intrapéricardique. Chaque expérience a été effectuée à partir de 36 huîtres. 216 huîtres, provenant d'une zone où la bonamiose est endémique, ont ainsi été ponctionnées. Le degré d'infection de chaque animal a été vérifié par l'observation d'empreintes de tissus cardiaque. Les hémolymphe provenant des animaux diagnostiqués sains et des animaux diagnostiqués parasités sont regroupés séparément (cf. paragraphe 2.2.1.5.).

2.5.3. Suivi des primocultures

Le nombre de cellules par puits est déterminée sur cellule de Malassez, quotidiennement. Trois puits sont comptés par paramètres testés (milieux, densité de dépôt, ou statut d'infection des hémocytes). Parallèlement, le taux de mortalité est évalué par la méthode d'exclusion au bleu Trypan (2% en EMF).

Une répartition des types cellulaires est également réalisée par observation de préparations cyto centrifugées colorées à l'aide du kit Hémacolor (Merck) (cf. paragraphe 2.2.1.6). Un pourcentage des différents types cellulaires est calculé, en fonction du statut des populations hémocytaires, "saines" ou "parasitées" et en fonction du temps de culture (cf. paragraphe 2.2.1.7.).

2.6. Techniques de biologie moléculaire

2.6.1. Extraction de l'ADN

Après la purification, le culot de parasite ($120 \cdot 10^7$ parasites) est repris dans 1200 μ l de tampon de lyse (10mM EDTA, 10mM Tris à pH 7.6, 100mM NaCl, 0.2% SDS). La suspension parasitaire est ensuite incubée après l'adjonction de protéinase K (0.1mg/ml) pendant une nuit à 37°C. Les acides nucléiques sont extraits en ajoutant un volume égal de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Le mélange est

homogénéisé pendant quelques secondes par inversion répétée du tube. Après séparation des phases par une centrifugation (10000g, 10 min, 4°C), la phase aqueuse surnageante contenant les acides nucléiques est récupérée. Les acides nucléiques sont alors précipités après ajout de 1/10ème de volume d'acétate de sodium (3M) et de deux volumes d'éthanol absolu. Après centrifugation (10000g, 10 min, 4°C), les culots sont séchés et resuspendus en eau bidistillée. Les quantités d'ADN sont évaluées sur gel d'agarose 0.8%.

2.6.2. Amplification génique enzymatique

Une première approche a été basée sur des essais d'amplification de gènes très conservés. Parmi les gènes dont les séquences sont bien conservées, le gène codant pour l'ARN 18S nous a paru intéressant. La caractérisation des parasites a été basée sur l'amplification par PCR (Polymerase chain reaction) de ce gène, utilisant des amorces universelles dessinées par Medlin *et al.* (1988) (Annexe 12).

Une deuxième approche a consisté à tester par PCR des amorces spécifiques d'un parasite de l'huître *Saccostrea commercialis* (Adlard et Lester, 1995). Ce parasite *Mikrocytos roughleyi* est taxonomiquement proche du genre *Bonamia* (Annexe 13).

2.6.2.1 Petite sous-unité de l'ARN ribosomale (18s)

L'amplification en PCR du gène codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (18S) a été réalisée avec les amorces complémentaires des régions conservées de l'extrémité 5' du 18S (5'-CCGAATTCGTCGACAACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') et de l'extrémité 3' du 18S (5'-CCCGGGATCCAAGCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3') à partir de l'ADN extrait du parasite purifié (cf. paragraphe 2.6.1). La matrice est amplifiée en suivant les conditions décrites par Medlin *et al.* (1988) : *1er cycle* : dénaturation 94°C, 4min, *2ème au 30ème cycle* : dénaturation 94°C, 1 min ; hybridation 55°C, 1 min, élongation 72°C, 1 min. Un dernier cycle d'élongation à 72°C achève la réaction d'amplification. Le produit de PCR est visualisé sur gel d'agarose 1% par dépôt de 10 µl de produit de réaction.

2.6.2.2. Intertranscriptionnel de *Mikrocytos roughleyi*

Les amorces Ra2 et ITS2.2 spécifiques du parasite *Mikrocytos roughleyi* (Adlard et Lester, 1995) ont été utilisées afin d'amplifier une portion de l'intertranscriptionnel 2 de l'opéron des gènes rNA. Les matrices sont amplifiées avec l'amorce complémentaire de l'extrémité 3' de la petite sous-unité (RA2) (5'-GTCCCTGCCCTTTGTACACA-3') et de l'extrémité 5' de la grande sous-unité ITS2 (5'-CCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGC-3'). La matrice est amplifiée en suivant les conditions décrites par Adlard et Lester (1995) : *1er cycle* : dénaturation 94°C, 4min, *2ème au 30ème cycle* : dénaturation 94°C, 1 min ; hybridation 55°C, 1 min, élongation 72°C, 1 min. Un dernier cycle d'élongation à 72°C achève la réaction d'amplification. Le produit de PCR est visualisé sur gel d'agarose 1% par dépôt de 10 µl de produit de réaction. La spécificité de la réaction est vérifiée par l'absence d'amplification d'ADN d'huître plate, *Ostrea edulis*, de moule, *Mytilus edulis*, et d'un parasite, *Marteilia refringens*.

2.6.3. Restriction enzymatique des fragments amplifiés

La recherche de polymorphisme sur profils de restriction est faite sur les produits d'amplification de l'intertranscriptionnel. Les enzymes utilisées sont des sites à 4 pb (TaqI, Sau3a, HhaI et MseI). Les conditions de réactions sont les suivantes : 7µl de produit de PCR ; 2 µl de tampon d'enzymes ; 1µl de l'enzyme, dans un volume réactionnel de 20µl. Les digestions sont réalisées pendant une heure à 37°C. Les produits de digestion sont ensuite visualisés sur gel d'agarose à 1%.

2.7. Cytométrie de flux

Les suspensions hémocytaires sont analysées par un cytomètre de flux Fasca (Becton Dickinson). Les prélèvements d'hémocytes sont réalisés comme il est décrit au paragraphe 2.2.1.2.. 10 animaux de chacune des populations sensibles Palavas (PAL), Quiberon (QUIB), et sélectionnées G1xTQuib et G1xG2 ont été analysés. 10 000 évènements, correspondant au comptage de 10 000 hémocytes par individu sont

ainsi examinés. Un graphique en trois dimensions est effectué pour chaque huître étudiée, en fonction de la taille de la cellule, de l'organisation architecturale, de la granulosité, du rapport nucléo-cytoplasmique, mais aussi de l'indice de réfraction de la cellule.

Résultats - Chapitre I

Contribution à la caractérisation
du parasite *Bonamia ostreae*

1. OPTIMISATION DU PROTOCOLE DE PURIFICATION

Pour l'ensemble des essais réalisés dans le cadre de ce travail, une soixantaine de purifications du parasite *Bonamia ostreae* ont été effectuées. Quelques unes figurent dans le tableau 1 pour illustrer les rendements : nombre de parasites obtenus par huître ayant servi à la purification.

Les purifications effectuées ont permis d'obtenir des quantités comprises entre 30.10^6 et 10^9 parasites, le rendement de purification étant compris entre $6,6.10^6$ et 335.10^6 parasites par huître (Tableau 2). Les essais réalisés au début de ce travail utilisaient essentiellement des huîtres infectées naturellement. Les expériences ont révélé des rendements médiocres ne dépassant pas quelques dizaines de millions de parasites. En outre, l'utilisation d'un grand nombre d'individus pour une purification entraîne une diminution du rendement obtenu.

Par contre, l'utilisation d'huîtres expérimentalement infectées s'est traduite par une augmentation des quantités de parasites obtenus par huître (Tableau 2).

L'intégrité ultrastructurale des parasites a été confirmée en microscopie électronique à transmission, et atteste de l'homogénéité des suspensions parasitaires de différentes purifications. (Figures 5 et 6). La réussite des différentes expériences de reproduction expérimentale de la maladie effectuées pendant ce travail confirment en outre la conservation du pouvoir infectieux des parasites à l'issue de la purification.

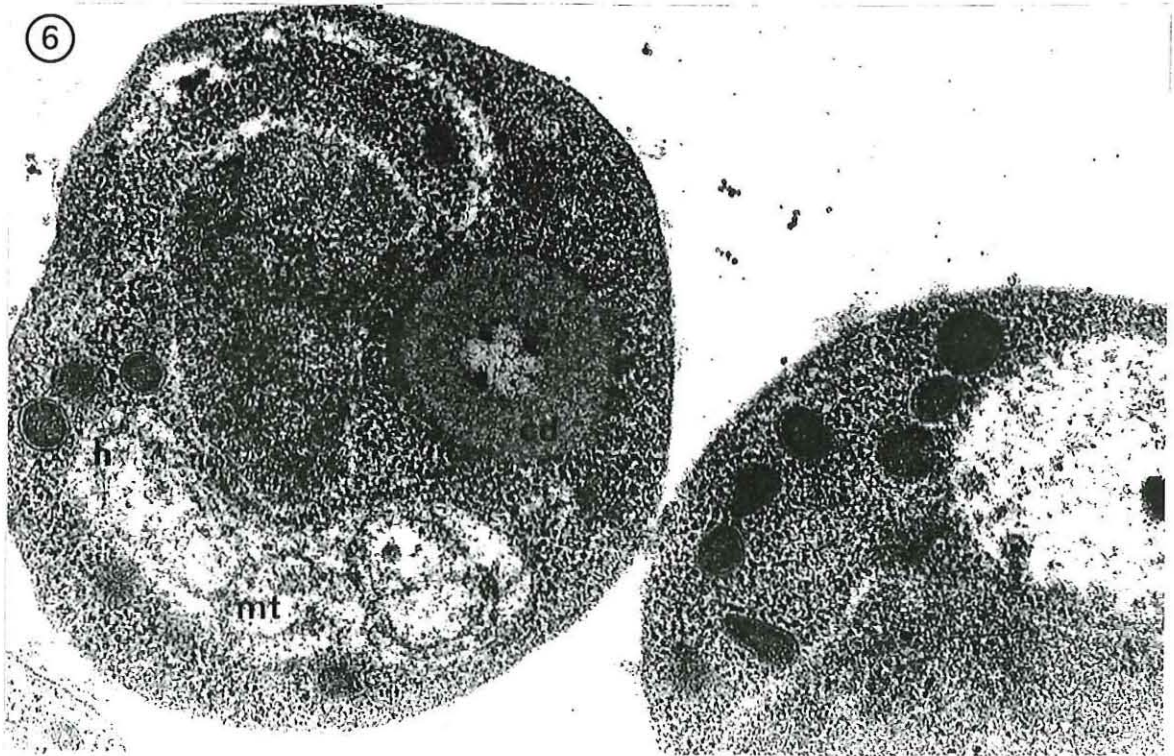
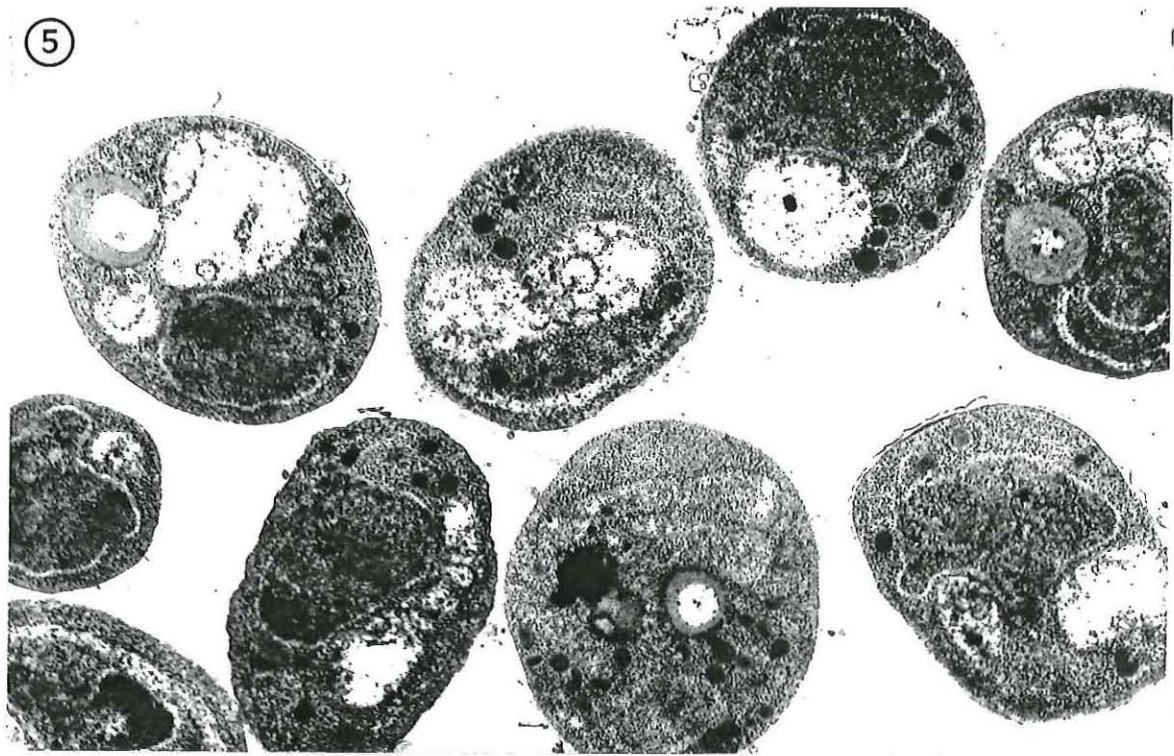
2. CARACTERISATION DES PROTEINES CONSTITUTIVES MAJEURES DU PARASITE *BONAMIA OSTREAE*

2.1. Lyse cellulaire du parasite purifié et extraction des protéines

Les résultats présentés dans le tableau 3 montrent que la quantité de protéines obtenue dans les lysats de *B. ostreae* varie entre $7.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ et $49.6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Nb d'huîtres parasitées utilisées par expérience	Origine des huîtres	Nb total de parasite x 10 ⁶	Rendement : moyenne de parasite /huître x 10 ⁶
2(++)	naturelles	43	21.4
1(+++) 1(++)	''	66	33
2(++)	''	20	10
3(++)	''	26	8.6
4(+++)	''	55	13
3(+++)	''	20	6.6
4(+++)	''	94	23.5
2(++)	''	36	18
4(+++)	''	174	43.5
3(+++)	''	215	71
3(+++) 1(++)	inoculées	500	167
1(+++) 3(++)	''	300	100
2(+++) 3(++)	''	560	112
4(+++)	''	550	137.5
4(++)	''	230	76
2(+++) 1(++)	''	670	335
3(+++) 2(++)	''	260	86
3(+++)	naturelles	227	7.5
3(+++)	''	246	82
2(++)	''	130	65
4(+++)	''	284	71
5(+++)	inoculées	476	95.2
6(+++)	''	300	50
4(+++)	''	734	183.5
6(+++)	''	250	62.5
5(+++)	''	300	75
3(++)	naturelles	176	88
3(+++) 2(++)	''	210	42
4(+++)	inoculées	930	232
4(+++)	''	1280	320
4(+++)	''	1000	200
4(+++)	''	1200	300
5(+++)	''	404	80.8
4(+++)	''	632	158
3(+++)	''	534	178
4(+++)	''	438	110
2(+++)	''	468	234
2(+++)	''	298	149

Tableau 2. Quantité de parasites *B. ostreae* obtenus après purification en fonction du nombre et du statut d'infection des huîtres utilisées : (++) huîtres moyennement infectées, (+++) huîtres très infectées.

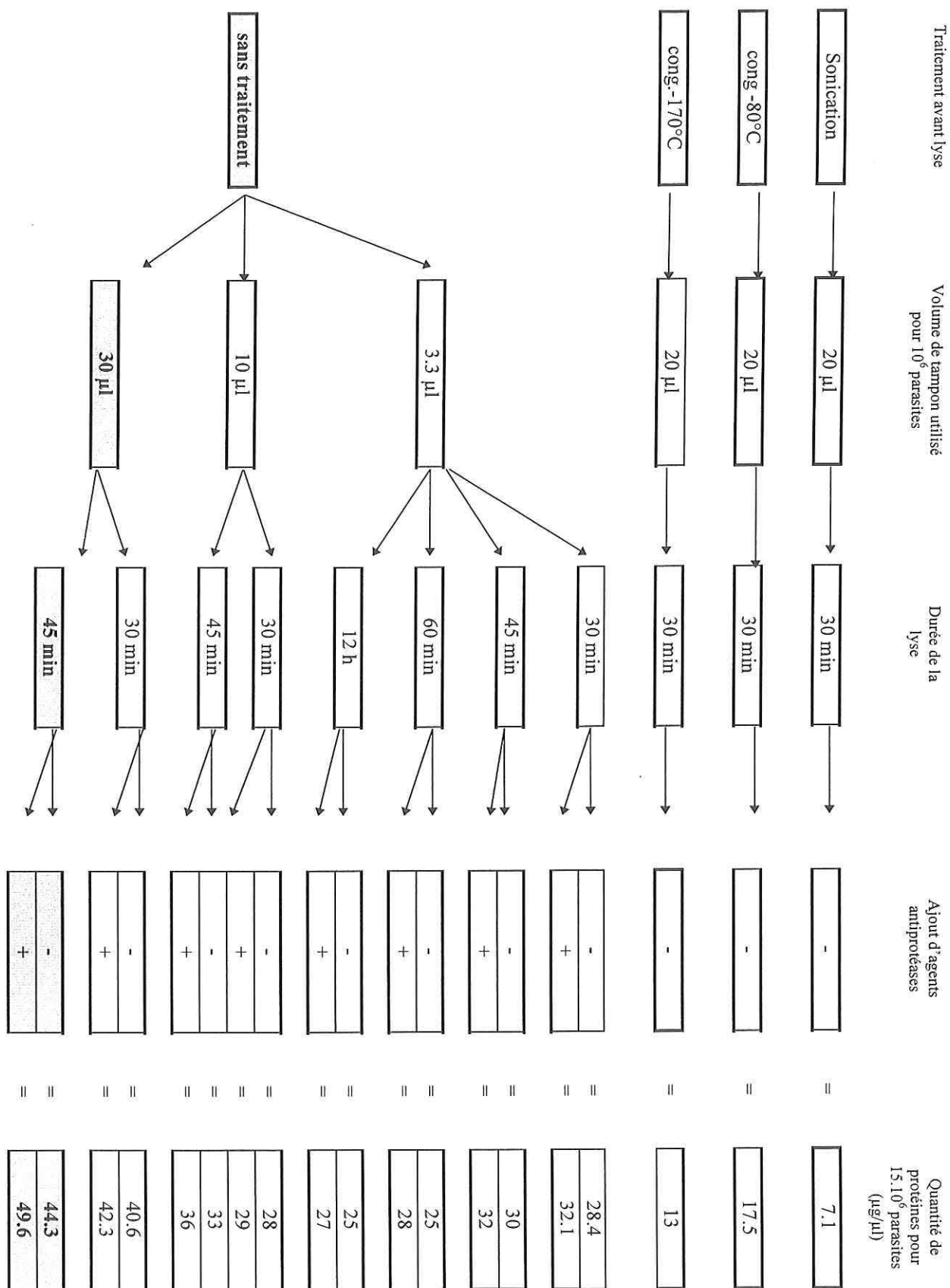


Clichés en microscopie électronique à transmission du parasite, *Bonamia ostreae*

Figure 5. Culot de parasites après purification. Les suspensions parasitaires sont riches et homogènes (x20 000).

Figure 6. Analyse de l'intégrité ultrastructurale des parasites purifiés à fort grossissement (x 60 000). n : noyau ; cd : corps dense ; h : haplosporosome ; mt : mitochondrie

Tableau 3. Quantités de protéines pour 15.10^6 parasite *B. ostreae*, en fonction des différents traitements de lyse



Ces variations sont liées aux divers essais réalisés avant l'addition du tampon de lyse : la congélation, la sonication, l'ajout d'agents antiprotéases, le volume de tampon de lyse ajouté, et la durée de la lyse.

La congélation à - 80 °C ou - 170 °C, avant la lyse, semble avoir un effet plutôt négatif (respectivement 17.5 µg et 13 µg pour $15 \cdot 10^6$ parasites purifiés), la sonication, un effet nettement négatif, (7.1 µg pour $15 \cdot 10^6$ parasites purifiés) sur la concentration protéique.

L'ajout de différents agents antiprotéases, le phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF) et l'aprotinine ne semble pas associé à une augmentation nette de la quantité en protéines des lysats de parasites purifiés.

Concernant le volume de tampon de lyse à utiliser, des essais ont été réalisés pour augmenter la concentration en protéines et donc permettre d'en déposer une plus grande quantité dans les puits du gel d'électrophorèse. Plusieurs essais de réduction du volume de tampon de lyse (3.3, 10, 20 et 30µl pour 10^6 parasites) ont été effectués. Plus le volume de tampon de lyse ajouté est faible, plus la concentration finale augmente. Cependant, le rendement pour $15 \cdot 10^6$ parasites diminue considérablement (tableau 3). Afin d'éliminer cette dilution, les lysats protéiques sont concentrés, après la lyse, par une précipitation en acétone.

La durée de la lyse modifie la concentration protéique finale. Cependant au delà de 45 min, la concentration finale ne semble plus s'accroître et atteint un plateau.

Suite aux résultats obtenus, le protocole suivant a donc été choisi :

- addition de 30 µl de tampon de lyse (+ agents antiprotéases) pour 10^6 parasites purifiés,
- incubation sur glace pendant 45 minutes,
- concentration des protéines, après la lyse, par précipitation en acétone, 12 heures à - 20°C (6 volumes d'acétone pour 1 volume de lysat),

- reprise du culot protéique, après centrifugation, dans 50 µl d'eau distillée. Congélation des échantillons aliquotés à - 20 °C.

2.2. Caractérisation électrophorétique du parasite *B. ostreae*

Pour les gels colorés au bleu de Coomassie, il a été possible de distinguer une quinzaine de polypeptides de masses moléculaires comprises entre 20 et 60 kDa (Figure 7). Cette coloration a été remplacée par celle au nitrate d'argent qui offre une grande sensibilité. Après cette coloration, les profils électrophorétiques présentent un grand nombre de bandes, une trentaine, de masses moléculaires comprises entre 14 kDa et 94 kDa (Figure 8).

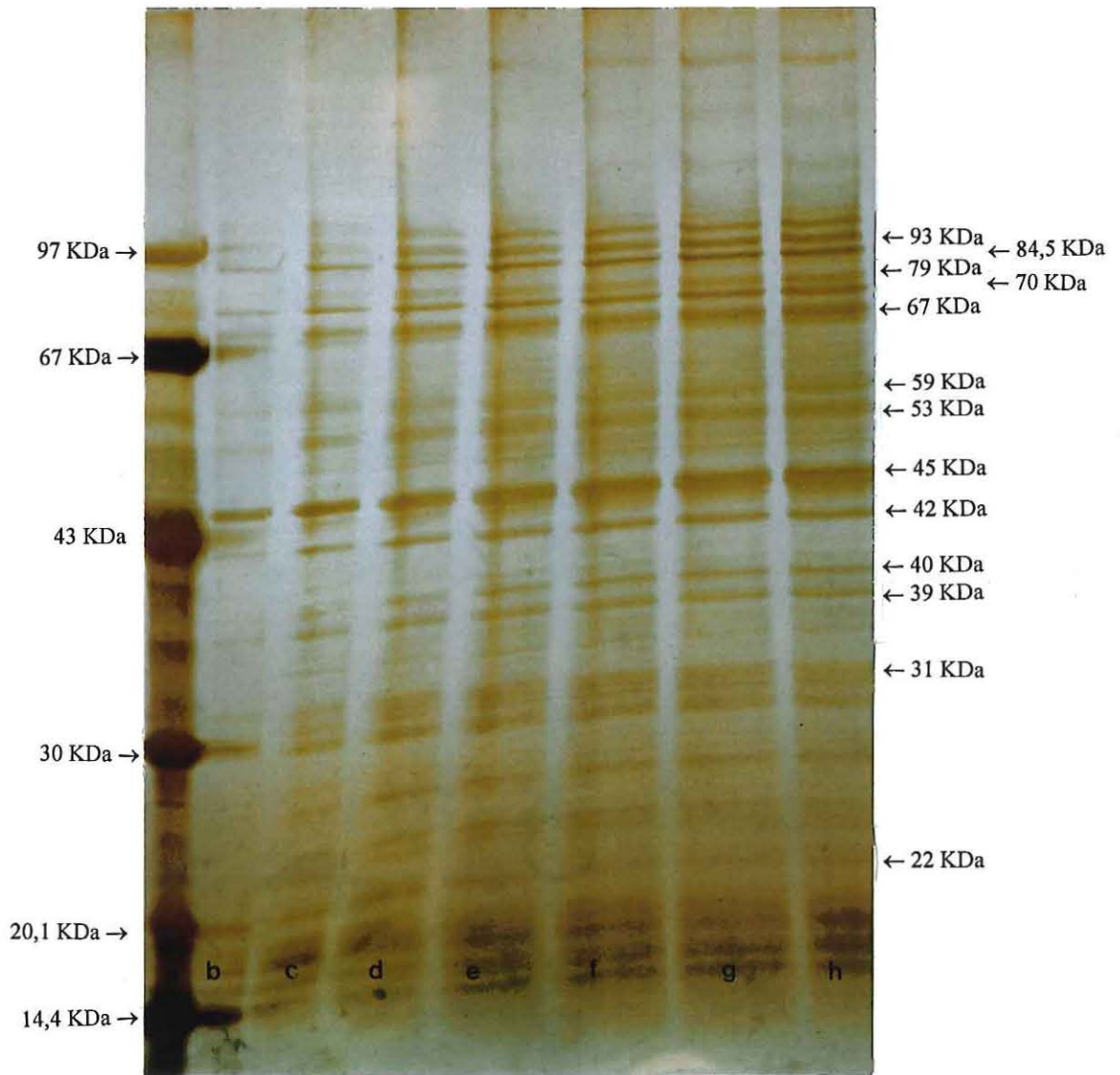
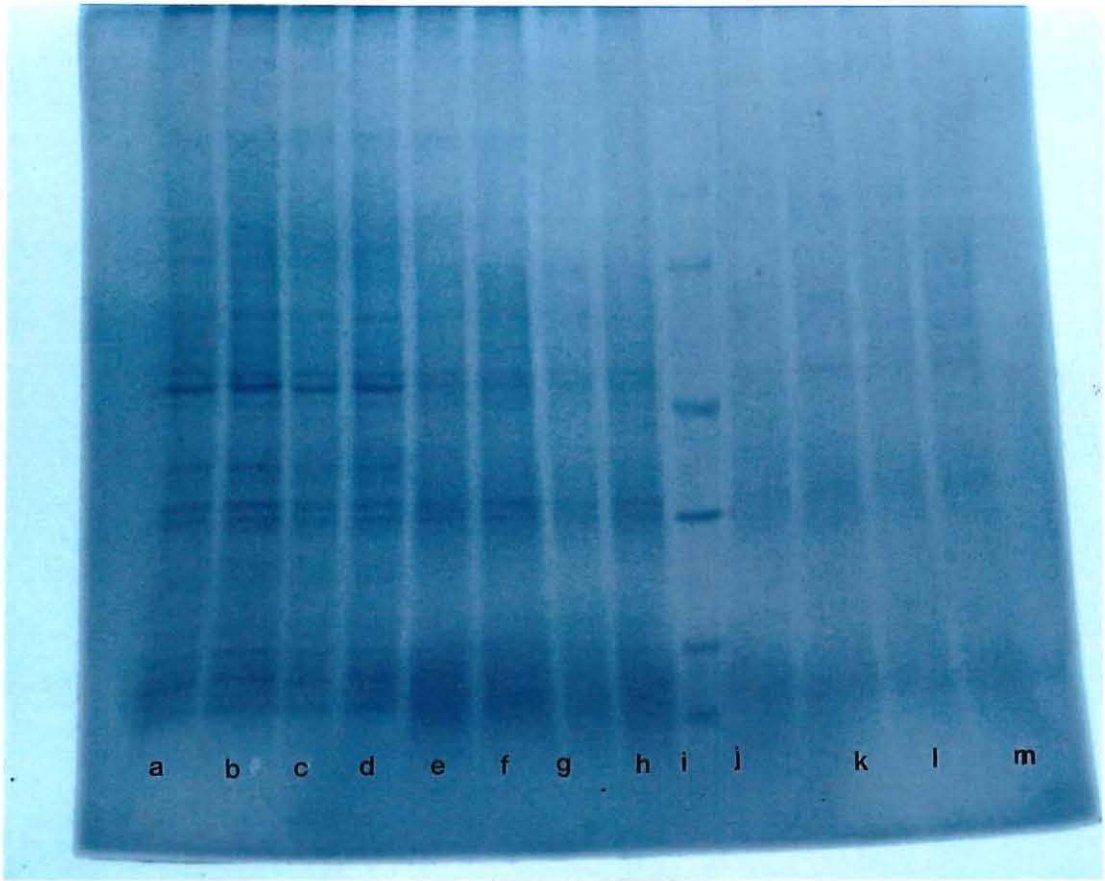
L'analyse comparée des profils d'un échantillon de *B. ostreae* purifié, lysé avec un tampon contenant des agents antiprotéases, et d'un même échantillon traité avec le même tampon, en absence de ces agents, montre quelques différences. Après coloration à l'argent, le profil général des spectres, et le nombre de bandes observées sont pratiquement identiques. Cependant, deux bandes nettes supplémentaires, de masses moléculaires 93 kDa et 84.5 kDa, sont visibles dans la zone des hautes masses moléculaires pour les spectres électrophorétiques de l'échantillon traité par le tampon de lyse additionné d'agents antiprotéases (Figure 9).

La seconde étape de caractérisation des protéines de *B. ostreae* a confirmé la similitude des profils obtenus, en SDS-PAGE, en conditions dénaturantes et réductrices, pour divers lysats de parasites correspondant à différentes purifications. La comparaison au négatoscope de différents lysats correspondant à différentes purifications a permis de montrer pour chacun des profils obtenus, le même nombre de bandes et les mêmes masses moléculaires. En outre, l'analyse des spectres électrophorétiques colorés au nitrate d'argent, à l'aide du logiciel Electro (Alcatel), a permis de confirmer la similitude des profils.

Profils électrophorétiques en SDS-PAGE, en conditions dénaturantes et réductrices, d'un lysat de parasites, Bonamia ostrea, purifiés, lysés en présence d'agents antiprotéases.

Figure 7. Gel coloré au bleu de Coomassie (pistes, a, b, c, et d : dépôts de 2.67 mg ; pistes e, f, g, et h : dépôts de 2.36 mg ; pistes i : kit de masses moléculaires (LWM) ; pistes j, k, l et m : dépôts de 1.56 mg)

Figure 8. Gel coloré au nitrate d'argent (pistes a : kit de masses moléculaires (LWM) ; pistes b : dépôt de 0.5 mg ; piste c : dépôt de 1 mg ; piste d : dépôt de 1.5 mg ; piste e : dépôt de 2 mg ; piste f : dépôt de 2.5 mg ; piste g : dépôt de 3 mg ; piste h : dépôt de 3.25 mg)



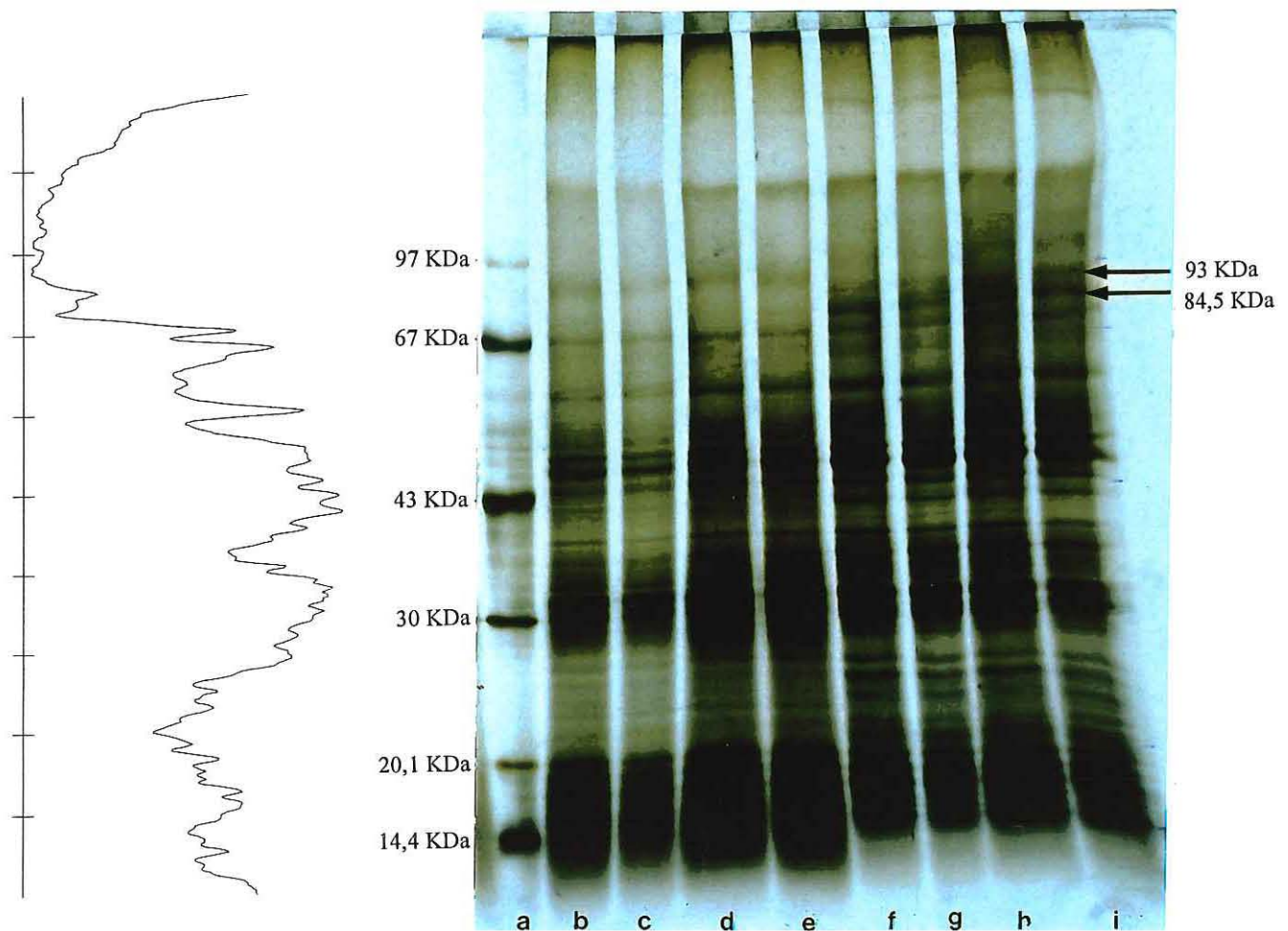


Figure 9. Profils électrophorétiques (SDS-PAGE) de lysats du parasite *Bonamia ostreae*, en conditions dénaturantes et réductrices colorés au nitrate d'argent. Analyse de la piste i à l'aide du logiciel Electro (Alcatel)

Piste a : kit de masses moléculaires (LWM)

Echantillon traité en absence d'agents antiproéases : pistes b et c : dépôts de 1.56 mg ; pistes d et e : dépôts de 2.36 mg

Echantillon traité en présence d'agents antiproéases : pistes f et g : dépôts de 1.76 mg ; pistes h et i : dépôts de 2.67 mg.

2.3. Caractérisation des glycosylations du parasite *B. ostreae*

2.3.1. Sur membranes après transfert

La révélation par la technique ConA/peroxydase/Diaminobenzidine a permis de révéler, sur membrane de nitrocellulose, la présence de résidus glycosylés (Figure 10, piste 2) sur trois bandes de masses moléculaires 53, 45 et 42 kDa.

Sur membrane de nylon, il est possible de noter la présence de marquage sur une quinzaine de bandes, avec huit bandes plus fortement marquées de masses moléculaires 59, 53, 45, 42, 39, 35, 31 et 25 kDa (Figure 10, piste 4). Ces résultats indiquent la présence de glycosylations sur plusieurs polypeptides du parasite *B. ostreae* (résidus D-mannose et D-glucose sur lesquels se fixe la ConA).

2.3.2. En gel SDS-PAGE

La méthode au nitrate d'argent apporte une meilleure sensibilité que la méthode au réactif de Schiff. Il a été mis en évidence un marquage discret des glycosylations de certaines bandes de masses moléculaires 45, 42 et 29 kDa (Figure 12). Ces bandes de masses moléculaires 45 et 42 kDa correspondent aux bandes fortement marquées, révélées sur membrane de nitrocellulose et d'Immobilon par la Concanavaleine A.

2.3.3. Sur suspensions parasitaires purifiées

L'utilisation de la Concanavaleine A a permis de révéler un marquage intense de la périphérie des parasites (Figure 13A). Un marquage plus diffus, irrégulier, est noté parfois en périphérie du parasite (Figure 13B). Ces marquages correspondent à la présence de résidus D-mannose et D-glucose à la périphérie du parasite. Une absence de réactivité est constatée sur les parasites incubés sans Concanavaleine A (Figure 13C).



Figure 10.

Pistes 1 et 2 : membrane de transfert de nitrocellulose (2.67 mg/piste). **1.** Coloration au nitrate d'argent ; **2.** Marquage des glycoprotéines après révélation par la Concanavaleine A.

Pistes 3 et 4 : membrane de transfert Immobilon (2.67 mg/piste). **3.** Coloration au nitrate d'argent ; **4.** Marquage des glycoprotéines après révélation par la Concanavaleine A;

Pistes 5 et 6 : Immunotransfert sur membrane Immobilon. **5.** Marquage par l'anticorps monoclonal 20B2 au 1/10ème ; **6.** Marquage par l'anticorps monoclonal 15C2 au 1/10ème.



Figure 11.

Pistes 1, 2 et 3 : membrane de transfert de nitrocellulose (1 mg/piste). **1.** Kit de masses moléculaires (LWM) colorée au nitrate d'argent ; **2.** Coloration des protéines transférées au nitrate d'argent ; **3.** Marquage par l'ascite n°5 au 1/10ème ; **4.** Marquage par l'anticorps monoclonal anti-actine (clone AC-40)

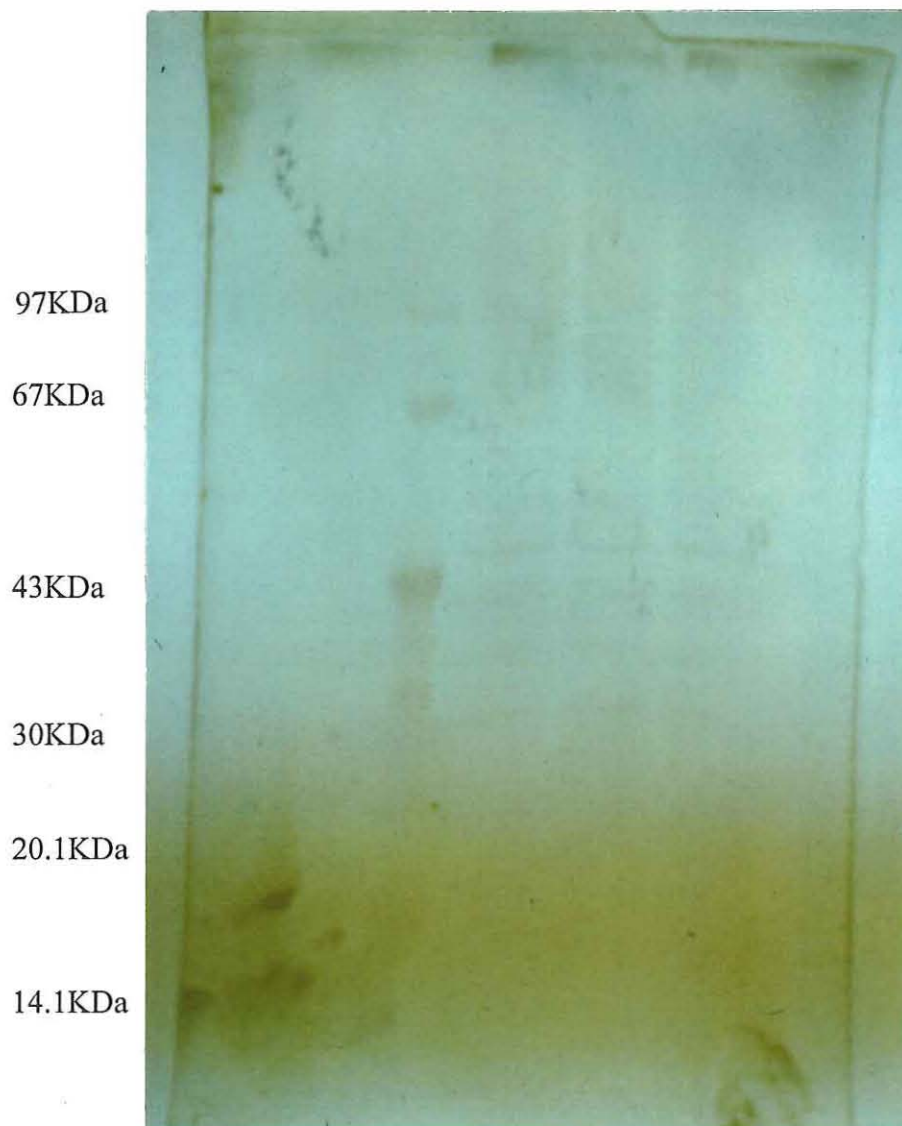
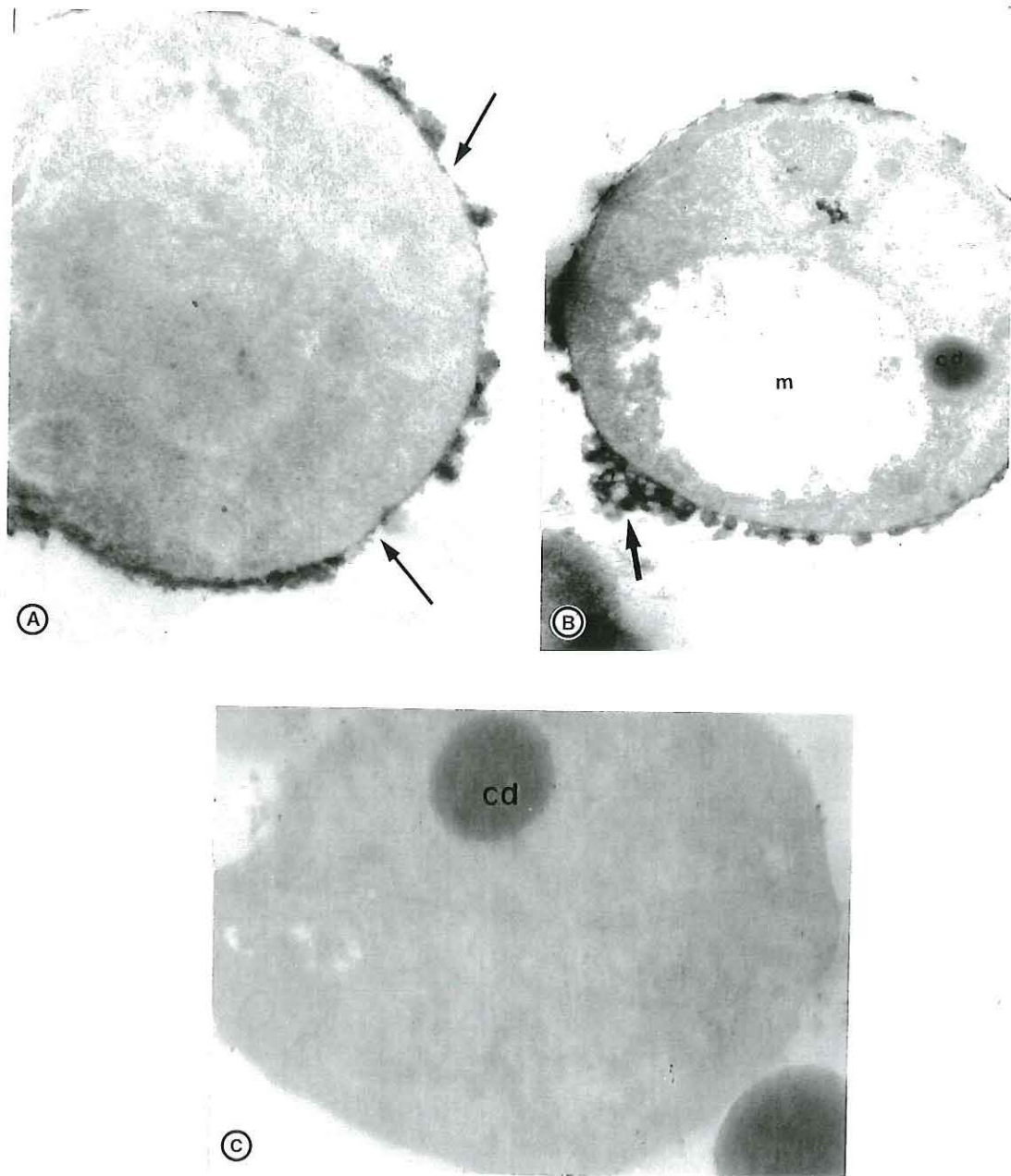


Figure 12. Recherche des glycoprotéines directement sur gel SDS-PAGE, en conditions dénaturantes et réductrices, après oxydation par l'acide périodique et coloration au nitrate d'argent



Clichés en microscopie électronique à transmission de parasites Bonamia ostreae (x 60 000)

Marquage des glycoprotéines par la technique utilisant la Concanavaleine A

Figure 13 A. Marquage à la périphérie du parasite (flèches)

Figure 13 B. Marquage diffus à la périphérie du parasite. m : mitochondrie ; cd : corps dense

Figure 13 C. Echantillon témoin. Il n'est pas mis en évidence de marquage. cd : corps dense

3. CARACTERISATION ANTIGENIQUE DES PROTEINES CONSTITUTIVES DE *BONAMIA OSTREAE*

3.1. Préparation d'anticorps polyclonaux spécifiques de fractions protéiques parasitaires

Des anticorps polyclonaux sont préparés en immunisant des souris OF1, par quatre injections intrapéritonéales de protéines séparées sur gel SDS-PAGE. Les masses moléculaires des protéines majoritaires ayant servi à l'immunisation figurent dans le tableau suivant :

Número des bandes	masses moléculaires
1	93 kDa
2	84.5 kDa
3	79 kDa
4 (regroupe un ensemble de bandes)	comprises entre 60 et 53 kDa
5	44 kDa
6	22 kDa

Tableau 3 : Récapitulatif des masses moléculaires des bandes ayant servi à l'immunisation

Six ascites ont été obtenues avec le protocole d'immunisation utilisé.

3.2. Marquage en immunohistochimie

3.2.1. Profil d'immunofluorescence indirecte des anticorps polyclonaux

L'ascite n°5 (correspondant à l'immunisation avec la bande de 44 kDa) a permis de révéler un marquage en immunofluorescence indirecte (IFI) des parasites. Une fluorescence nette est visible en périphérie des cellules parasitaires (Figure 14A). Ce marquage a été obtenu sur tissus fixés au Carnoy, aux dilutions 1/50ème et

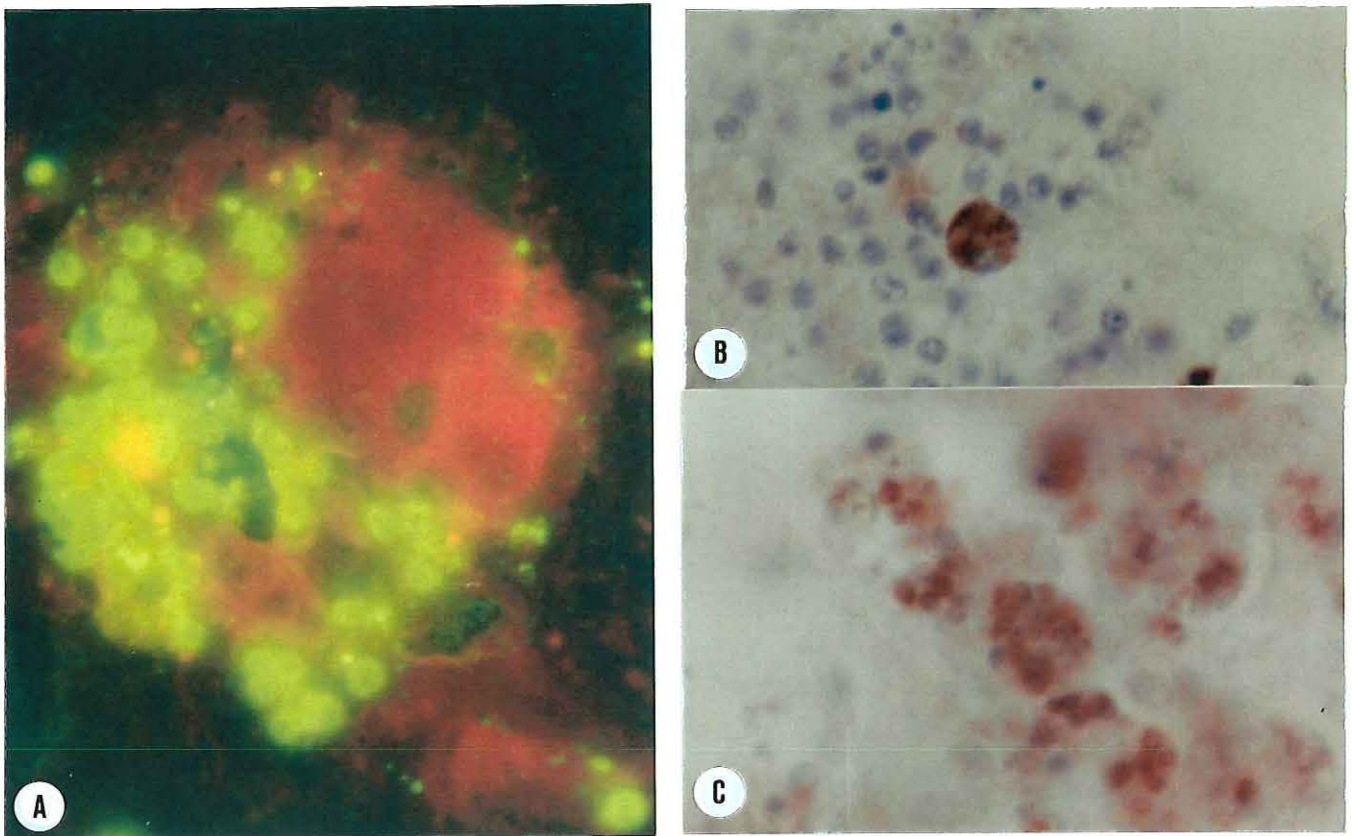


Figure 14 . Immunoréactivité de l'ascite n°5, sur coupes paraffine de tissus infectés par le parasite *Bonamia ostreae* (1/50ème) **A**. Profil d'immunofluorescence (x1000). Noter la fluorescence verte des parasites. **B**. Marquage en immunoperoxydase (x600). Le marquage est visualisé par une coloration marron au niveau des parasites intracellulaires. **C**. Même marquage à plus fort grossissement (x1000)

1/100ème. Il n'a pas été possible d'observer de marquage, avec cette ascite, lorsque les tissus sont fixés soit en Carson, soit en Davidson.

Les cinq autres ascites n'ont pas permis de mettre en évidence de marquage avec la technique d'immunofluorescence indirecte. Le traitement des coupes, avant marquage, avec la trypsine et la saponine n'a pas permis d'obtenir de marquage.

3.2.2. Profil d'immunoperoxydase indirecte des anticorps polyclonaux

Les marquages obtenus sont comparables à ceux observés en IFI. Ils sont intenses et homogènes pour l'ascite n°5 et permettent une localisation du marquage au niveau de la membrane cytoplasmique des parasites (Figures 14B et C).

Une absence de réactivité de l'ascite n°5 est notée sur les coupes de tissus fixés soit en Carson, soit en Davidson.

Pour les autres ascites, quel que soit le fixateur utilisé, et quelles que soient les dilutions, aucun marquage des parasites n'est obtenu. En outre, le traitement des coupes avant marquage par la trypsine et la saponine ne modifie pas cette absence de réactivité.

3.2.3. Profils d'immunofluorescence indirecte des anticorps monoclonaux

• Anticorps monoclonal 15C2

Cet anticorps a été testé, au 1/100ème sur parasites purifiés cyto-centrifugés (fixés en acétone ou en méthanol). Un marquage intracellulaire des parasites a été mis en évidence sur les préparations fixées en acétone (Figure 15A).

Sur empreintes de tissus cardiaques infectés (fixés acétone), l'anticorps monoclonal 15C2 dilué au 1/100ème a révélé un marquage fluorescent intense des cellules de *B. ostreae* (Figure 15B).

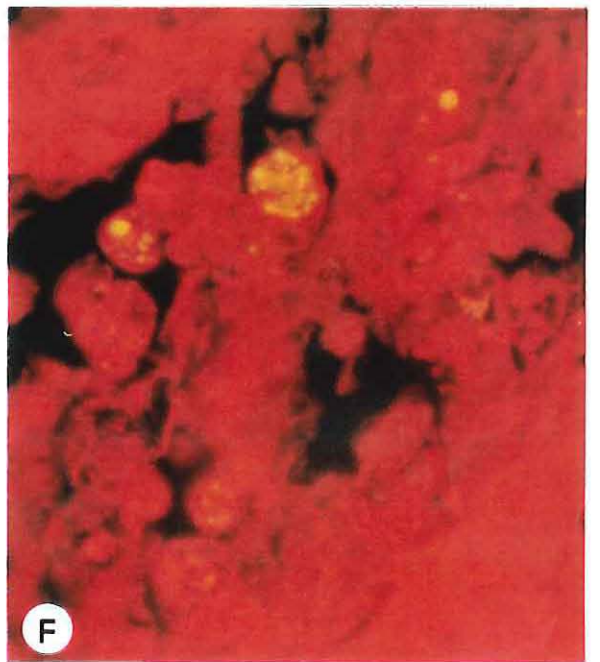
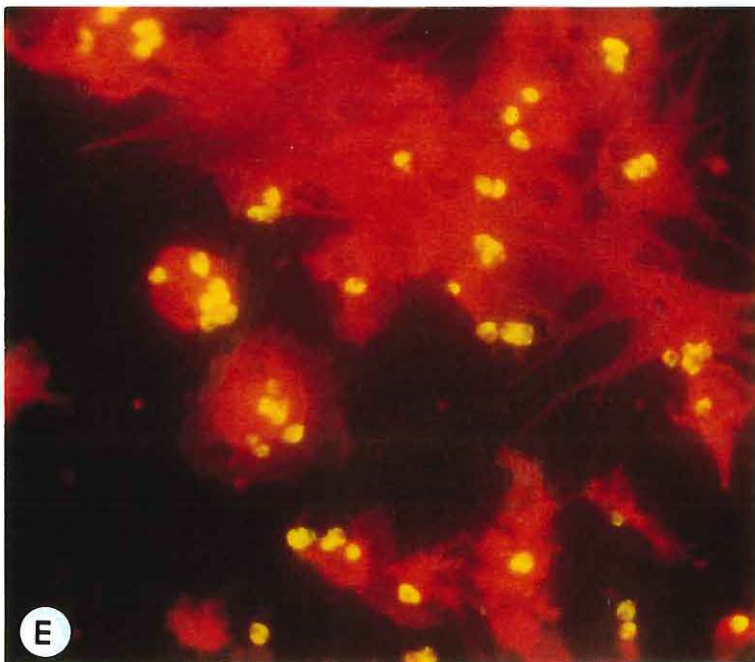
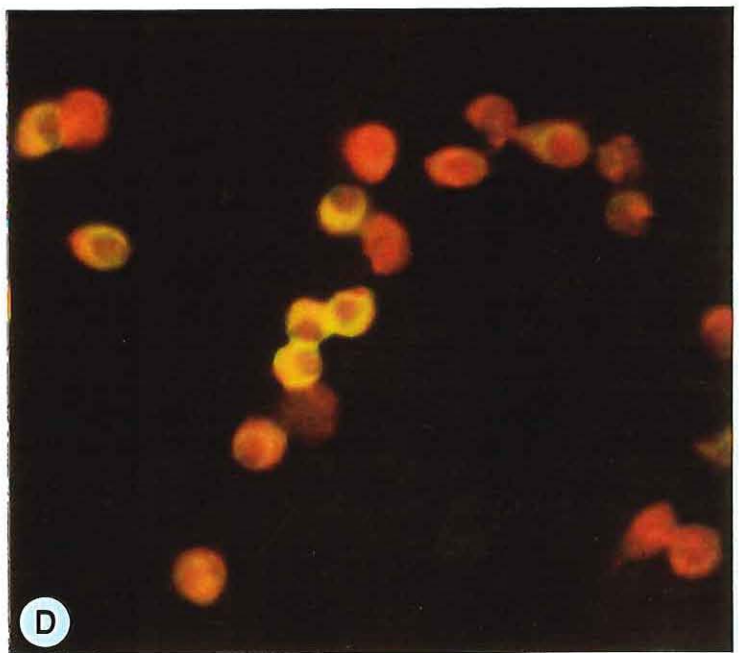
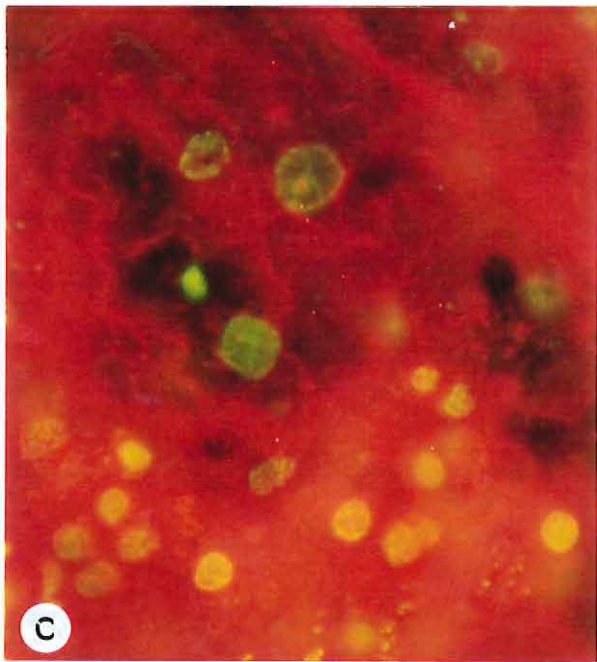
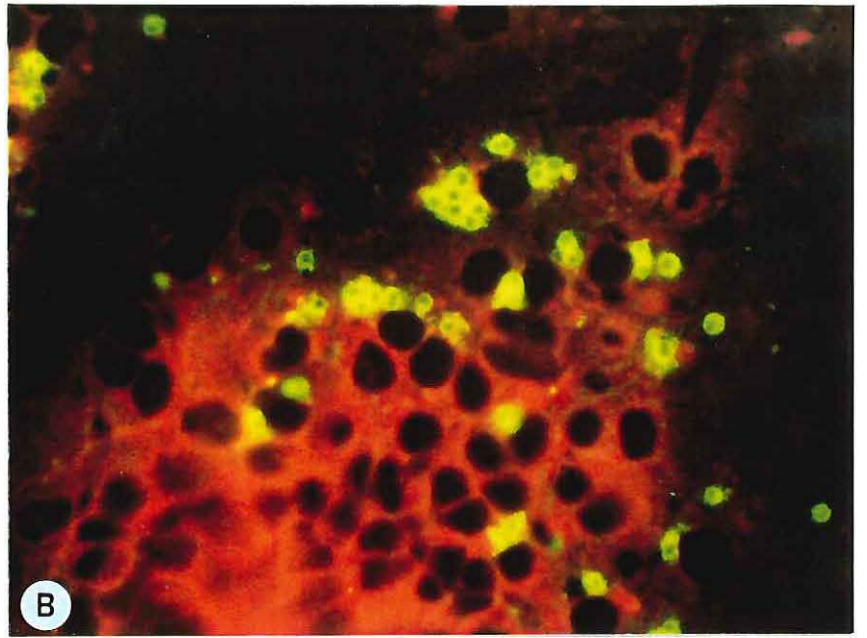
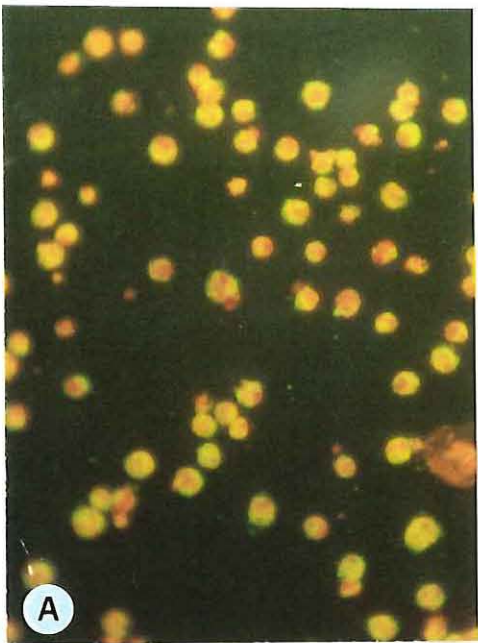
Figures 15. Profils d'immunofluorescence des anticorps monoclonaux spécifiques du parasite Bonamia ostreae

Anticorps monoclonal 15C2 (1/100ème)

A. Marquage des parasites purifiés, cytocentrifugés et fixés en acétone(x1000). **B.** Marquage sur empreintes de tissu cardiaque fortement infecté, fixés en acétone(x1000). **C.** Marquage sur coupes paraffine de tissus fortement parasités, fixés en Davidson (x1000).

Anticorps monoclonal 20B2 (1/100ème)

D. Marquage sur parasites purifiés, cytocentrifugés et fixés en acétone (x1500). **E.** Marquage sur empreintes de tissu cardiaque fortement infecté, fixés en acétone (x1000). **F.** Marquage sur coupes paraffine de tissus fortement parasités, fixés en Davidson (x1000).



Sur coupes paraffine d'huître fortement infectée, l'anticorps monoclonal 15C2 (dilué au 1/100ème) a révélé un marquage des noyaux cellulaires de l'huître plate (Figure 15C). Il est possible de noter que la plupart des noyaux des huîtres ont montré une fluorescence très fine au niveau de la membrane nucléaire et des amas de chromatine. Les parasites *B. ostreae* ne sont pas marqués.

• Anticorps monoclonal 20B2

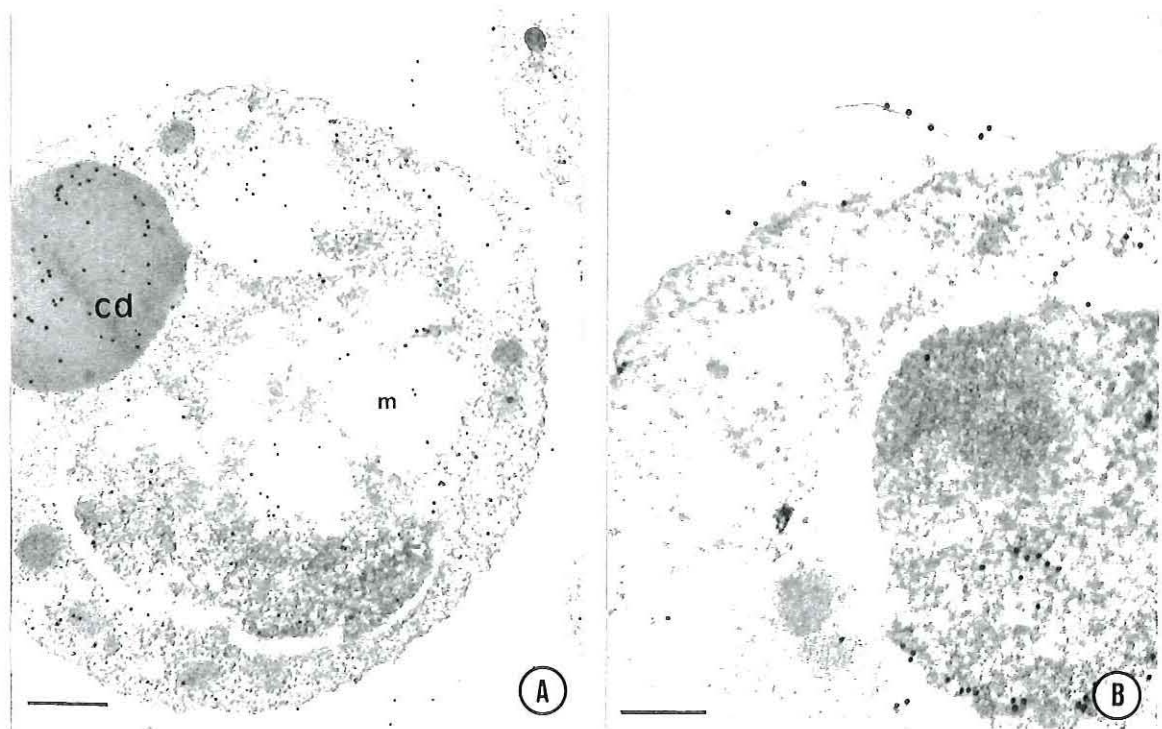
Sur préparations de parasites cyto centrifugés, fixés en acétone, la fluorescence obtenue est faible et irrégulière. Elle est inégalement répartie à la surface des parasites. En outre, tous les parasites ne sont pas marqués (Figure 15D).

Sur appositions de tissus cardiaques, il a été possible d'observer de nombreux parasites marqués (Figure 15E). Le marquage intense est situé en périphérie des parasites.

Les coupes histologiques d'huître infectée, testées avec l'anticorps monoclonal 20B2, dilué au 1/100ème, ont montré un marquage ténu et irrégulier de certains parasites. Quelques hémocytes ont présenté dans leur cytoplasme des petites plages sphériques légèrement fluorescentes. Cependant, ces corpuscules de taille identique à *Bonamia ostreae*, sont apparus amorphes à l'observation en lumière normale. En outre, cet anticorps a marqué nettement certaines sécrétions cellulaires (Figure 15F).

3.3. Localisation ultrastructurale des épitopes

L'ascite n°5 a été utilisée pour la localisation ultrastructurale des épitopes parasitaires. Il a été possible de discerner de nombreuses billes d'or au niveau de la membrane cytoplasmique et dans le cytoplasme du parasite. Un marquage important de certains organites parasitaires, notamment du corps dense et des mitochondries est observé (Figures 16A et B).



Figures 16. Clichés en microscopie électronique à transmission de parasites *Bonamia ostreae*, purifiés. Profil d'immunomarquage à l'or colloïdal obtenu avec l'ascite n°5 (1/10ème). **A.** Marquage du corps dense (cd) du parasite et des mitochondries (m) (barre=200 nm). **B.** Marquage de la membrane parasitaire (barre=50nm)

3.4. Détection d'antigènes après transfert des protéines par la technique de "western blotting"

3.4.1. A l'aide des anticorps polyclonaux

L'ascite n°5 (préparée avec la protéine de masse moléculaire de 44 kDa) a donné un marquage de deux bandes de masses moléculaires respectives : 53 et 59 kDa (Figure 11, piste 3), à la dilution de 1/10ème.

Un marquage discret est encore visible à la dilution de 1/100ème.

Cette bande majoritaire de masse de 44 kDa pouvait correspondre à de l'actine. Pour vérifier cette hypothèse, il a été testé un anticorps monoclonal anti-actine au 1/10ème (Sigma, clone AC-40) en immunotransfert. Une bande nette à 42 kDa a été révélée (Figure 11, piste 4). Cette bande ne correspond pas à la protéine qui a servi à l'immunisation des souris, de masse 44 kDa.

3.4.2. A l'aide des anticorps monoclonaux

L'anticorps monoclonal 15 C2 a permis de révéler au moins une dizaine de bandes, avec quatre bandes plus fortement marquées de masse moléculaire de 53, 45, 39 et 29kDa (Figure 10, piste 6), à la dilution 1/100ème. L'utilisation d'une dilution plus faible (1/200ème) ne permet pas d'obtenir un signal.

L'anticorps monoclonal 20 B2 a marqué faiblement une protéine qui semble être de masse moléculaire de 44 kDa (Figure 10, piste 5).

4 COMPARAISON DE *BONAMIA OSTREAE* AVEC UN PARASITE OBSERVE CHEZ *CRASSOSTREA RIVULARIS*

4.1. Description histologique et cytologique d'un parasite intracellulaire de *Crassostrea rivularis*

4.1.1. Etude histologique

Les analyses effectuées ont révélé, en microscopie optique, des inflammations au niveau du tissu conjonctif de la masse digestive et des filaments branchiaux. Ces lésions sont caractérisées par la présence, en grand nombre, d'hémocytes qui renferment de petites cellules sphéroïdes. Ces formes sont interprétées comme étant des parasites protozoaires. Les formes les plus communes de ce parasite sont représentées par des cellules de 2 à 3 μm de diamètre caractérisées par un cytoplasme basophile (Figures 17 A et B).

4.1.2. Purification du parasite

Le protocole de purification de *Bonamia ostreae* (cf. matériel et méthode 2.1.1) a été appliqué avec succès à la purification du parasite de *Crassostrea rivularis* et nous a permis d'obtenir des suspensions parasitaires riches. A partir d'un seul animal fortement infecté pour chacun des trois essais, nous avons obtenu respectivement $72 \cdot 10^6$, $89 \cdot 10^6$ et $112 \cdot 10^6$ parasites. La suspension de $72 \cdot 10^6$ parasites purifiés a été fixée en glutaraldéhyde (3% en tampon cacodylate 0.4M) et a fait l'objet d'analyses en microscopie électronique à transmission.

4.1.3. Examen ultrastructural de la suspension de parasites purifiés

Les parasites sont de forme arrondie, leur taille varie entre 2 et 3 μm (Figures 20A et B). Ils présentent un cytoplasme dense, riche en grains interprétables comme

Figure 17. Cliché en microscopie photonique de coupes de tissus conjonctifs de *C. rivularis*, infectés par le parasite, colorées à l'hémotoxyline-éosine (x1000). **A.** Cellule contenant un grand nombre de parasites (flèche). **B.** Infiltration du tissu conjonctif par des cellules fortement infectées.

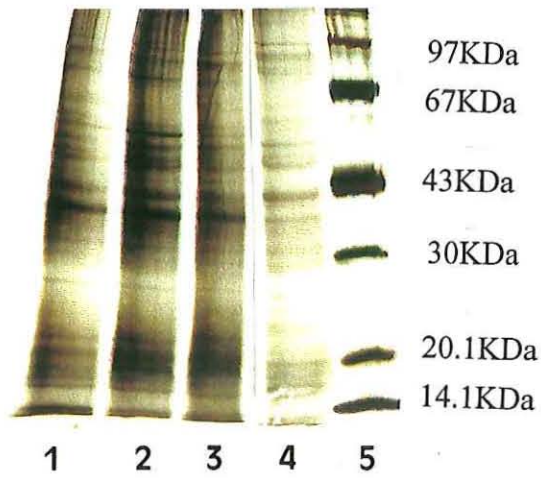
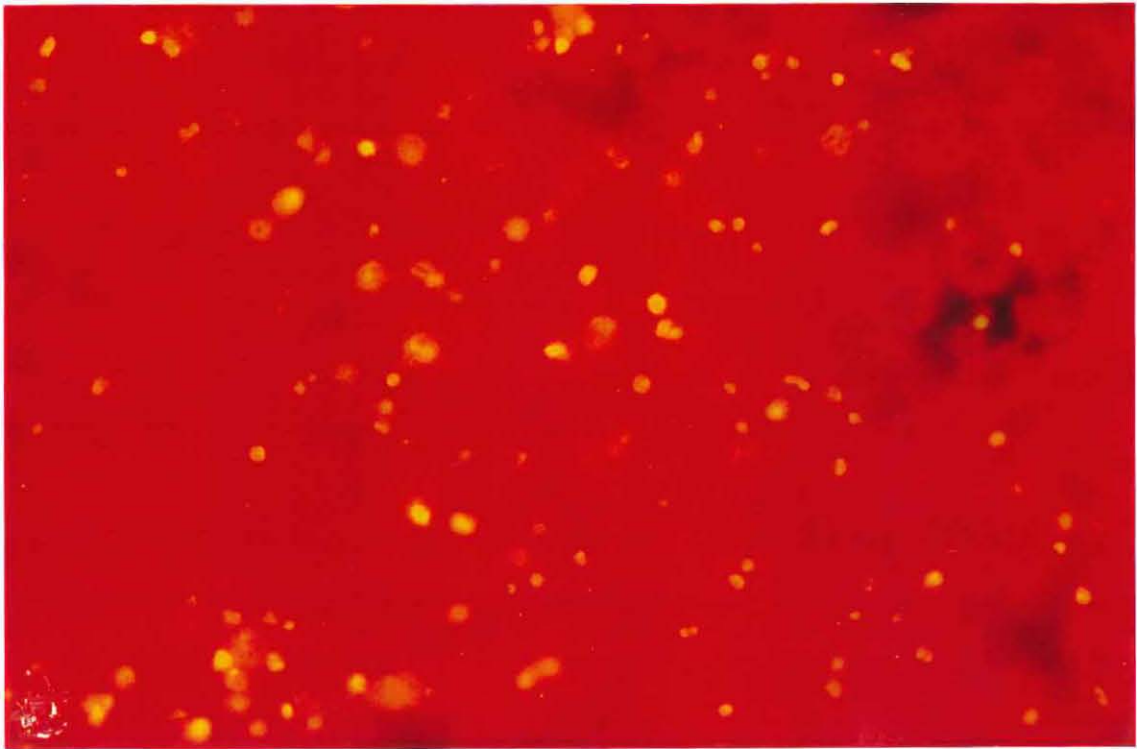
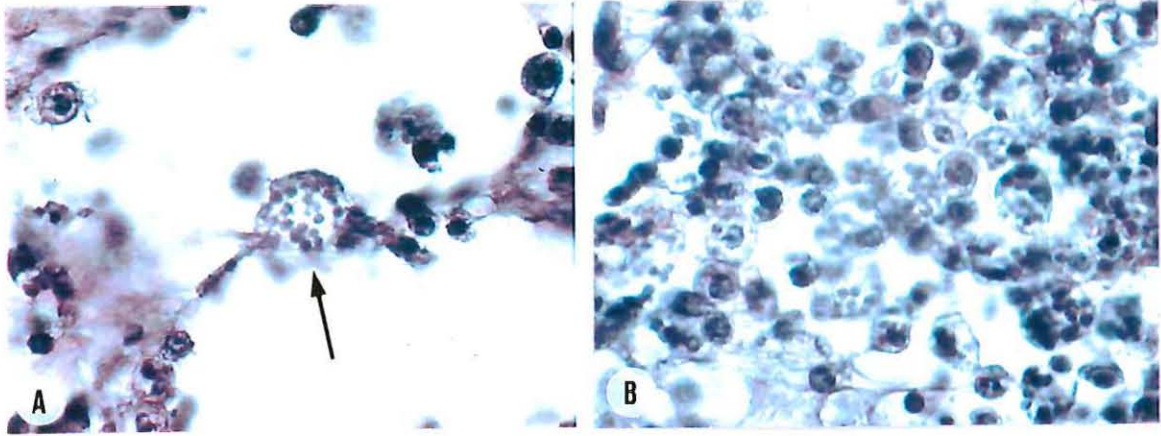
Figure 18. Cliché en microscopie photonique (x1000). Profil d'immunofluorescence de l'ascite n°5 (1/50ème) spécifique du parasite *Bonamia ostreae*, sur coupes paraffine de *C. rivularis* infectée par un parasite du genre *Bonamia*. Noter la fluorescence jaune des parasites.

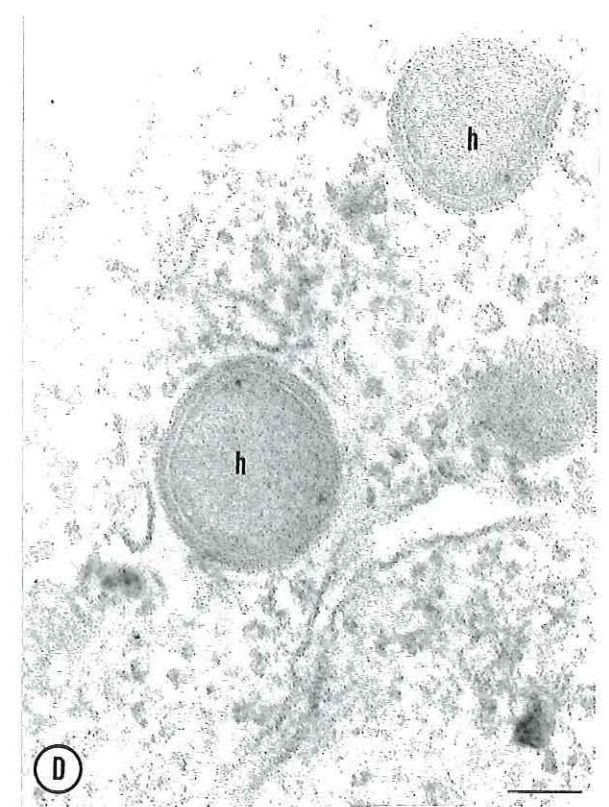
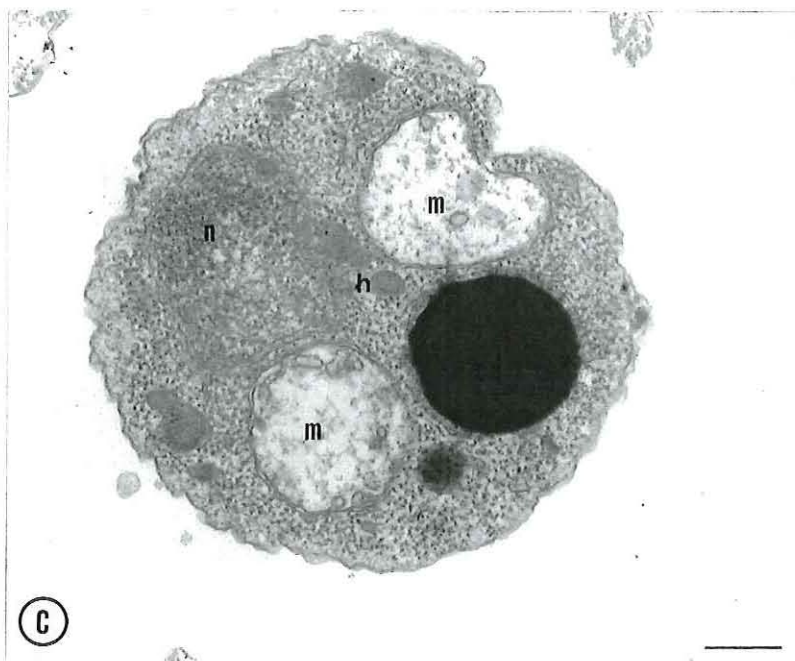
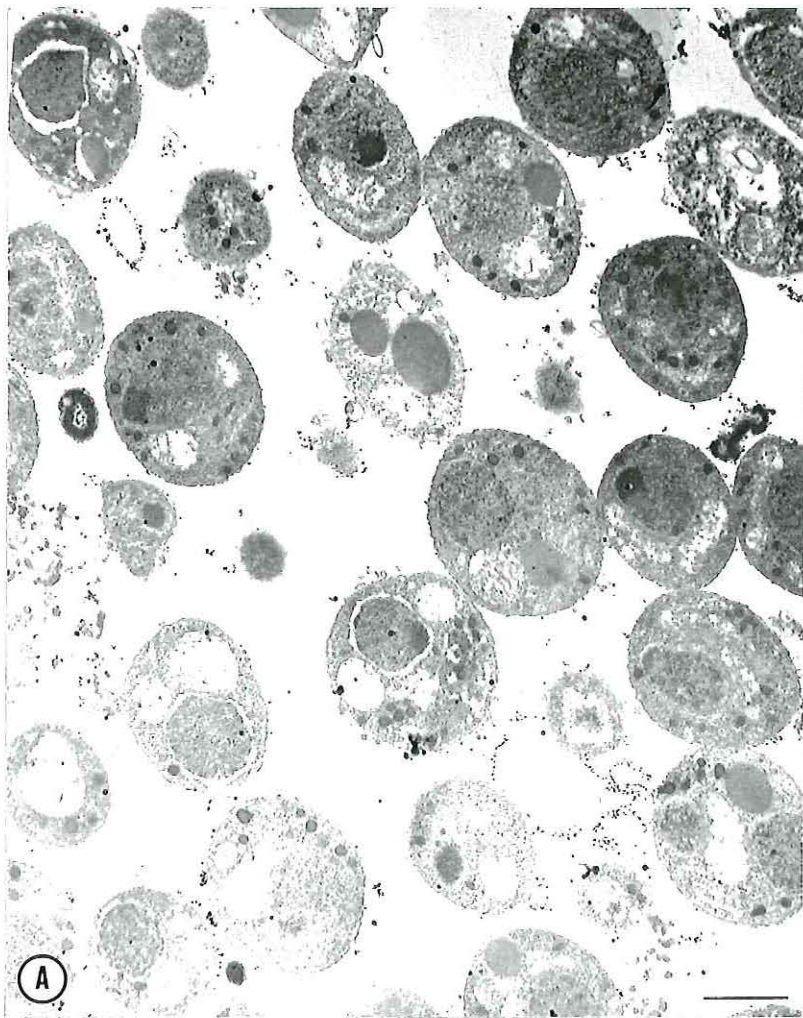
Figure 19. Profils électrophorétiques en SDS-PAGE, en conditions dénaturantes et réductrices, colorés au nitrate d'argent.

Piste 1. Lysat de parasites *Bonamia ostreae* (dépot de 10µg)

Pistes 2,3 et 4. Lysat du parasites de *C. rivularis* (dépôts de 10, 7 et 5 µg)

Piste 5. Kit de masses moléculaires (LWM)





Figures 20. Cliché en microscopie électronique à transmission du parasite de *C. rivularis*. **A.** Coupe ultrafine de parasites purifiés avec le protocole décrit pour le parasite *B. ostreae* (barre=1 μ m). **B.** Cellule naturellement infectée contenant 5 parasites (*) (barre=1 μ m). **C.** Parasite ; m : mitochondries ; cd : corps dense ; h : haplosporosome ; n : noyau (barre=500nm). **D.** Détail des haplosporosomes (h)(barre=200nm).

des ribosomes. Le noyau, limité par deux membranes unitaires, est constitué de matériel granuleux opaque aux électrons. La présence d'un nucléole est parfois notée (Figure 20A). Ces cellules renferment, par ailleurs, une ou deux mitochondries de grande taille, à matrice claire, dont le diamètre varie entre 0.5 et 1.8 μ (Figure 20C). A l'intérieur, les replis membranaires en forme de crêtes sont peu nombreux. Les cellules comportent aussi, réparties à la périphérie, des particules denses de 130 à 170 nm de diamètre, qui semblent être des haplosporosomes (Figure 20D). Enfin, suivant le plan de section, un corps dense sans structure apparente peut être observé (Figure 20C).

4.2. Comparaison antigénique du parasite de *Crassostrea rivularis* et de *Bonamia ostreae*

L'observation des coupes histologiques de tissus infectés fixés en liquide de Carnoy permet de révéler un marquage intense des parasites de *Crassostrea rivularis* en immunofluorescence indirecte, avec l'ascite n°5 (Figure 18). Le marquage obtenu correspond à un marquage périphérique du parasite de *Crassostrea rivularis*. Le profil du marquage est identique à celui obtenu avec le parasite *B. ostreae*.

4.3. Comparaison des profils électrophorétiques du parasite de *Crassostrea rivularis* et de *Bonamia ostreae*

Le profil électrophorétique, après coloration à l'argent, de suspensions lysées du parasite observé chez *C. rivularis* a permis de mettre en évidence une trentaine de bandes de masses moléculaires comprises entre 14 et 94 kDa (Figure 17).

L'analyse comparée des profils électrophorétiques du parasite *B. ostreae* et de ce parasite sont similaires. Ils présentent avec la résolution de cette technique de coloration à l'argent le même nombre de bandes, de masses moléculaires identiques (Figure 17).

4.4. Comparaison à l'aide d'outils de biologie moléculaire

4.4.1. Amplification génique enzymatique

L'amplification avec les amorces spécifiques de *Mikrocytos roughleyi* a permis, à partir de l'ADN de *Bonamia ostreae* et du parasite de *Crassostrea rivularis*, d'obtenir un fragment de 680 pb, ce qui correspond à la taille attendue (Figure 21). Aucune amplification n'a été obtenue à partir d'ADN d'huître plate, *Ostrea edulis*, d'huître creuse *Crassostrea rivularis*, et d'ADN de *Marteilia refringens*, un autre protozoaire parasite de l'huître plate.

4.4.2. Comparaison des profils de restriction

Les enzymes, Taq 1 et HhaI coupent les fragments amplifiés de l'ADN de *Bonamia ostreae* et de l'ADN du parasite de *C. rivularis*.

Par contre, les enzymes Sau3a et MseI ne permettent pas de couper ces fragments amplifiés.

Les profils de restriction sont identiques pour les deux parasites, et ne mettent pas en évidence de polymorphisme interspécifique.

5. DISCUSSION

5.1. Purification du parasite *Bonamia ostreae*

L'étude d'un agent pathogène chez les bivalves marins et, plus particulièrement, sa caractérisation électrophorétique, antigénique ou moléculaire passe par une étape incontournable de purification de l'agent pathogène lui-même. Dans le cadre d'un programme d'étude de la bonamiose, un protocole de purification

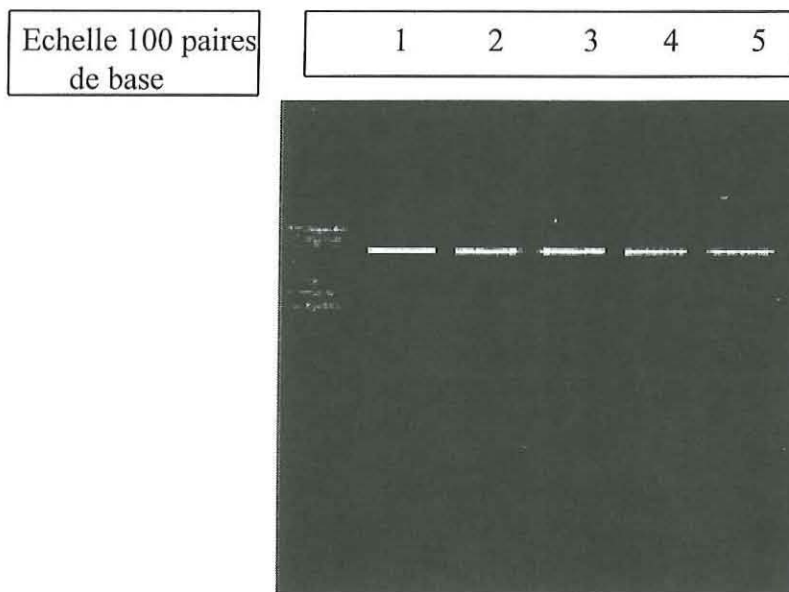


Figure 21. Visualisation des fragments amplifiés par PCR. Pistes 1, 2 et 3 : échantillons d'ADN de *Bonamia ostreae*. Pistes 4 et 5 : échantillons d'ADN du parasite de *C. rivularis*

du parasite *Bonamia ostreae* a été mis au point par Mialhe *et al.* (1988), puis a été standardisé par Hervio *et al.* (1995). Cependant au début de ce travail, il était nécessaire de résoudre les problèmes liés à l'obtention de quantités limitées de parasites purifiés et à l'approvisionnement aléatoire en matériel biologique infecté.

Jusqu'à présent les rendements de purification n'exédaient pas quelques centaines de millions de parasites pour 6 à 8 huîtres (Hervio, 1992). Ceci avait pour conséquence de limiter considérablement la possibilité d'utiliser des parasites purifiés pour des expériences *in vitro* et *in vivo*. Il était ainsi important d'améliorer le protocole de purification.

Les cas de très fortes infections sont assez irréguliers dans le milieu naturel, ce qui limite et complique la planification des expérimentations. Or, l'obtention régulière de grandes quantités de parasites purifiés est vite apparue essentielle. Aussi, afin de s'affranchir de l'approvisionnement en huîtres parasitées naturellement, et d'alléger la recherche d'animaux positifs, des stocks d'huîtres infectées expérimentalement ont été constitués et entretenus chaque année, depuis 1992, au laboratoire. Le contrôle de la mortalité est réalisée quotidiennement. Le degré d'infection des animaux morts est évalué par observation microscopique d'empreintes de tissus cardiaque. Les huîtres fortement infectées servent pour la purification.

L'utilisation de ces animaux morts, expérimentalement infectés, présente plusieurs avantages, et a permis :

- de disposer d'animaux parasités de façon régulière, de septembre (de l'année n) à mai (de l'année n+1). Un rythme d'inoculation mensuel permet d'obtenir des animaux infectés de façon décalée.

- d'alléger les étapes de sélection d'animaux servant à la purification. En effet, pour les animaux provenant du milieu naturel, il était nécessaire de trier les huîtres un jour donné. L'analyse de 100 à 200 animaux était nécessaire pour obtenir 3 à 4 huîtres fortement infectées. L'étape de purification était alors effectuée le lendemain.

du parasite *Bonamia ostreae* a été mis au point par Mialhe *et al.* (1988), puis a été standardisé par Hervio *et al.* (1995). Cependant au début de ce travail, il était nécessaire de résoudre les problèmes liés à l'obtention de quantités limitées de parasites purifiés et à l'approvisionnement aléatoire en matériel biologique infecté.

Jusqu'à présent les rendements de purification n'exédaient pas quelques centaines de millions de parasites pour 6 à 8 huîtres (Hervio, 1992). Ceci avait pour conséquence de limiter considérablement la possibilité d'utiliser des parasites purifiés pour des expériences *in vitro* et *in vivo*. Il était ainsi important d'améliorer le protocole de purification.

Les cas de très fortes infections sont assez irréguliers dans le milieu naturel, ce qui limite et complique la planification des expérimentations. Or, l'obtention régulière de grandes quantités de parasites purifiés est vite apparue essentielle. Aussi, afin de s'affranchir de l'approvisionnement en huîtres parasitées naturellement, et d'alléger la recherche d'animaux positifs, des stocks d'huîtres infectées expérimentalement ont été constitués et entretenus chaque année, depuis 1992, au laboratoire. Le contrôle de la mortalité est réalisée quotidiennement. Le degré d'infection des animaux morts est évalué par observation microscopique d'empreintes de tissus cardiaque. Les huîtres fortement infectées servent pour la purification.

L'utilisation de ces animaux morts, expérimentalement infectés, présente plusieurs avantages, et a permis :

- de disposer d'animaux parasités de façon régulière, de septembre (de l'année n) à mai (de l'année n+1). Un rythme d'inoculation mensuel permet d'obtenir des animaux infectés de façon décalée.

d'alléger les étapes de sélection d'animaux servant à la purification. En effet, pour les animaux provenant du milieu naturel, il était nécessaire de trier les huîtres un jour donné. L'analyse de 100 à 200 animaux était nécessaire pour obtenir 3 à 4 huîtres fortement infectées. L'étape de purification était alors effectuée le lendemain.

Pour l'ensemble des essais réalisés dans le cadre de ce travail, une soixantaine de purifications de *Bonamia ostreae* a été effectuée. Les résultats obtenus ont permis de faire ressortir que :

- l'utilisation d'huîtres infectées expérimentalement augmente considérablement le nombre de parasites obtenus par purification,
- la sélection de quelques huîtres fortement infectées est préférable à l'utilisation d'un plus grand nombre d'individus moyennement parasités,
- l'utilisation d'un grand nombre d'animaux entraîne une augmentation des volumes des gradients de saccharose et de Percoll. Ceci a pour conséquence d'alourdir le protocole de purification et de limiter les rendements.

Le fait de ne pas pouvoir disposer de grandes quantités de parasite purifié limitait considérablement son étude. Jusqu'alors les travaux effectués ont concerné essentiellement sa caractérisation structurale, en microscopie électronique (Comps *et al.*, 1980 ; Pichot *et al.*, 1980 ; Chagot, 1989).

5.2. Caractérisation des protéines majoritaires du parasite *B. ostreae*

Nos premiers essais de caractérisation électrophorétique se sont soldés par l'obtention d'un spectre discret, malgré la coloration au nitrate d'argent. Dans ces conditions, se posait le problème de l'optimisation du protocole de lyse des parasites purifiés. En effet, la concentration du lysat en protéines représentait un obstacle important, les volumes des puits de dépôt ne permettant pas de déposer des quantités suffisantes de protéines pour pouvoir visualiser un spectre correct après électrophorèse. Le facteur de dilution, apporté par le volume de tampon de lyse utilisé, a été éliminé en précipitant les protéines par l'acétone, donc en les concentrant après la lyse.

L'utilisation d'agents anti-protéases (PMSF, EDTA, Aprotinine) ne permet pas d'augmenter considérablement la quantité de protéines par lysat. Cependant, il semble que l'obtention de deux bandes supplémentaires de masses moléculaires élevées, observables après migration électrophorétique, indique que la présence d'agents antiprotéases, dans le tampon de lyse, peut améliorer la conservation de certains polypeptides.

La comparaison des spectres électrophorétiques obtenus à partir de divers lysats de protéines, n'a pas permis de mettre en évidence de différence, avec la limite de résolution de la technique de coloration à l'argent. Sur cette base, les échantillons provenant de différentes purifications ont pu être regroupés, ce qui a permis l'obtention d'une quantité importante de lysat parasitaire.

Il s'agit de la première mise en évidence du spectre électrophorétique du parasite *B. ostreae*. Ces données sont en désaccord avec celles citées par Hervio (1992) qui a rapporté que la concentration des protéines constitutives majeures du parasite *B. ostreae* devait être trop faible pour permettre d'obtenir, avec cette technique classique d'électrophorèse et dans la limite de résolution de la coloration au nitrate d'argent, la caractérisation électrophorétique de ce parasite. Elle suggérait que la concentration de protéines constitutives de *B. ostreae* devait être inférieure à 0.5 ng pour environ 2.10^5 parasites. Les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis régulièrement d'obtenir 8µg pour 2.10^5 parasites (soit 16000 fois plus). Il semble que ces différences viennent du fait que cet auteur a utilisé directement un tampon de dépôt d'échantillon (pour gel SDS-PAGE) pour la lyse des parasites purifiés et l'extraction des protéines. Dans ce cas, le tampon de dépôt ne semble donc pas adapté pour obtenir une concentration importante de protéines parasitaires.

5.3. Caractérisation des glycoprotéines de *B. ostreae*

La présence de glycoprotéines parasitaires est discrète et pourrait s'expliquer par un pourcentage faible de résidus glycosylés sur les polypeptides du parasite.

La recherche effectuée directement sur gel par la technique de Dubray et Bezard (1983) est intéressante malgré un marquage de fond aspécifique important. En effet, cette recherche apporte une information supplémentaire qualitative, car elle renseigne sur les résidus glycosylés autres que les résidus D-mannose et D-glucose révélés par l'utilisation de la Concanavaleine A.

Sur les parasites purifiés, la mise en évidence de résidus D-mannose et D-glucose est difficile d'interprétation. Hervio (1992) rapporte que lors de la purification, il peut rester en périphérie du parasite quelques débris de la vacuole parasitophore. Dans cette hypothèse, il est possible que le marquage obtenu corresponde soit à des résidus glycosylés portés par la membrane de la vacuole parasitophore, soit à des résidus glycosylés situés sur la membrane du parasite. Ces résultats peuvent suggérer leur rôle dans les processus de reconnaissance du parasite par les hémocytes. Ces données s'accordent avec celles rapportées par Chen et Bayne (1994), qui ont montré l'importance des glycosylations dans les communications hémocytes-cible et inter-hémocytes chez la moule *Mytilus californianus*. En outre, la présence de ces résidus à la surface du parasite laisse supposer l'intervention de facteurs solubles de l'hémolymphe ou de récepteurs à la surface des hémocytes, qui pourraient intervenir dans les phénomènes de phagocytose du parasite *Bonamia ostreae*.

Ces données complètent celles rapportées par Chagot (1989) qui émettait l'hypothèse de l'existence de récepteurs de type lectine à la surface du parasite *B. ostreae*. Ce type de récepteur a été mis en évidence sur les promastigotes de *Leishmania mexicana*. D'autre part, de nombreuses espèces bactériennes comportent des lectines qui interagissent avec des structures membranaires sur les phagocytes et provoquent une "lectinophagocytose" (Ofek et Sharon, 1988). Il semble donc que l'entrée du parasite *B. ostreae* dans les hémocytes puisse mettre en jeu ce type de récepteur. Des expériences complémentaires utilisant différentes lectines devront être cependant réalisées pour permettre de confirmer l'existence éventuelle de telles structures membranaires.

Dans l'optique de choix d'une protéine cible pour le diagnostic, la connaissance des glycosylations est importante. Les résidus glycosylés sont en général différents pour des espèces éloignées phylogéniquement (Lis et Sharon, 1986). Des anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques de ce type peuvent donner lieu à des réactions croisées avec d'autres protéines parasitaires ou cellulaires.

Cette hypothèse peut expliquer les résultats obtenus en immunotransfert avec l'anticorps monoclonal 15C2. En effet, la comparaison entre le profil des polypeptides glycosylés et le profil des bandes révélées en western blotting, par l'anticorps 15C2, montre une correspondance qui pourrait confirmer l'hypothèse d'une reconnaissance d'un épitope de type glycosylé par l'anticorps monoclonal 15C2. Toutefois, un anticorps parfaitement monospécifique peut « reconnaître » plusieurs bandes, du fait de l'existence de produits de dégradation de la protéine étudiée (Laurière, 1985).

Néanmoins, des anticorps dirigés contre des glycoprotéines membranaires peuvent représenter d'excellents réactifs pour des recherches plus fondamentales dans l'étude des mécanismes d'interaction entre le parasite et ses cellules hôtes (Renwrautz *et al.*, 1985 ; Chagot *et al.*, 1992), et dans l'étude de récepteurs cellulaires.

Nos résultats pourront être confirmés par une digestion à l'endoglycosidase F avant électrophorèse. Elle démontre la nature glycosylée des protéines après transfert par la disparition des marquages sur membrane.

5.4. Caractérisation antigénique de *B. ostreae*

Boulo *et al.* (1989) rapportent que les immunisations pour l'obtention des anticorps monoclonaux 15C2 et 20B2 ont été réalisées avec des parasites purifiés vivants. La sélection de ces anticorps monoclonaux a été effectuée par la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) sur empreintes de tissus cardiaque d'animaux fortement infectés, fixées en acétone. Le choix de cette technique pour le criblage des anticorps monoclonaux a sans doute conduit à la sélection d'anticorps dont la réactivité est meilleure vis-à-vis d'antigènes natifs. Ces données peuvent expliquer les

résultats obtenus, avec les techniques d'immunohistochimie ou de western blotting. Ces techniques peuvent en effet altérer, dénaturer, ou modifier l'accessibilité des antigènes, qui, de ce fait, ne sont plus reconnus par les anticorps monoclonaux.

Pour confirmer cette hypothèse, il nous a semblé intéressant de tester différents traitements en immunohistochimie afin de perméabiliser les membranes cellulaires avant marquage. Nous avons utilisé la trypsine, une enzyme protéolytique qui, même sur tissus fixés, digère les ciments intercellulaires et les protéines intégrées aux membranes cytoplasmiques, et la saponine, un détergent qui agit au niveau du cholestérol membranaire. Aucune amélioration ni intensification du marquage n'ont été notées et ce, malgré l'utilisation de ces traitements.

Hervio (1992) rapporte une forte représentation de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 20B2 (environ 800 000 épitopes par parasite *Bonamia ostreae*). La destruction et/ou la dénaturation des sites antigéniques semblent plus probables pour expliquer la faiblesse du marquage.

Pour l'immunisation, le choix des fractions protéiques a été dicté par le fait qu'il s'agissait de protéines majoritaires relativement bien représentées chez *Bonamia ostreae*. En outre, la disponibilité de lysats parasitaires "poolés" nous a permis la préparation, en ascite, de six anticorps spécifiques de fractions séparées en SDS-PAGE. Cette méthode sophistiquée de préparation de suspensions immunogènes peut permettre d'obtenir des réactifs spécifiques de constituants particuliers du parasite *B. ostreae*. Cependant, les anticorps polyclonaux ainsi préparés n'ont pas tous donné de résultats satisfaisants. Une interprétation possible est que les quantités de peptides utilisés pour l'immunisation soient insuffisantes pour que celle-ci soit correcte. Une variante de cette technique a déjà été décrite pour la production d'anticorps polyclonaux. Elle consiste en une injection de protéines purifiées par électrophorèse après transfert sur membrane de nitrocellulose (Diano *et al.*, 1987).

Les résultats obtenus avec l'ascite n°5 sont difficiles à interpréter en western blotting. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. La première est que le polypeptide, (de masse moléculaire de 44 kDa) soit un produit de dégradation des bandes reconnues. Dans ce cas, le marquage pourrait correspondre aux bandes non dégradées. Cependant, cette hypothèse reste incertaine dans la mesure où le polypeptide qui a servi à l'immunisation n'est pas marqué. Une autre hypothèse est que ce polypeptide étant glycosylé, il y ait dans l'ascite des anticorps dirigés contre un motif glycosylé. En effet, les motifs glycosylés sont immunogènes. Les glycosylations n'étant exprimées que de manière relativement faible sur le polypeptide de masse moléculaire 44kDa, il n'y a pas de marquage observable en western blotting. Par contre, les polypeptides de masses moléculaires 59 et 53kDa, plus fortement glycosylés, ont pu être révélés par cette ascite.

Cette ascite n°5 donne un marquage membranaire intéressant en immunohistochimie indirecte. Aussi un marquage à l'or colloïdal a été réalisé sur préparation de parasites purifiés afin d'affiner la localisation. La localisation des épitopes indiquent que les antigènes reconnus ne sont pas uniquement intégrés ou associés à la membrane cytoplasmique, comme le laissaient suspecter les images de marquage en immunoperoxydase. D'autres essais devront être réalisés pour confirmer ou infirmer la localisation extramembranaire du marquage.

La caractérisation antigénique a apporté des informations sur le parasite lui-même, et sur la spécificité des anticorps existants ou préparés au cours de cette étude. Il a ainsi été possible de définir de manière plus précise la spécificité d'anticorps monoclonaux disponibles contre le parasite *Bonamia ostreae* (Rogier *et al.*, 1991), en utilisant différentes méthodes immunologiques. En particulier, l'anticorps 20B2, qui a été utilisé à des fins de diagnostic (Boulo *et al.*, 1989 a ; Zabalata and Barber, 1996), n'avait été validé qu'en immunofluorescence indirecte sur empreintes tissulaires fixées en acétone. Zabalata et Barber (1996) rapportent les résultats d'une étude épidémiologique comparant deux méthodes de diagnostic pour la bonamiose : la

technique histologique et la technique d'IFI sur empreintes tissulaires. Un taux d'infection de 5% (13/291) a été obtenu par l'observation de coupes histologiques, alors que l'utilisation de l'anticorps monoclonal 20B2, en IFI, n'a pas permis d'observer de marquage confirmant la présence de parasite. L'anticorps monoclonal 15C2 a permis de confirmer 75% des résultats obtenus par la technique histologique. Ces résultats confirment la sensibilité limitée des anticorps 20B2 et 15C2 observée au cours des différents tests utilisés dans cette étude.

Ces données soulignent l'intérêt de multiplier les approches techniques pour valider la spécificité d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux. En effet, bien que la technique d'immunofluorescence permette de définir un profil général de marquage en fluorescence, il est difficile de l'associer à la localisation précise des épitopes parasitaires. La localisation des antigènes nécessite d'autres méthodes (Immunoperoxydase, Immunomarquage à l'or colloïdal). Cette méthode d'immunofluorescence indirecte a cependant été largement retenue pour le choix d'outils immunologiques pour le diagnostic d'agents infectieux chez les invertébrés marins (Le Gall, 1991; Noël, 1992).

5.5. Comparaison du parasite *B. ostreae* avec un autre protozoaire

Outre leur intérêt dans la caractérisation du parasite *B. ostreae*, les méthodes et les réactifs mis au point au cours de ce travail ont été appliqués, d'un point de vue phylogénique, à la description et à la caractérisation d'un parasite nouveau intracellulaire des hémocytes de l'huître creuse chinoise, *Crassostrea rivularis*. Il a été ainsi possible de purifier ce parasite, et après examen ultrastructural de la suspension de parasites purifiés, les résultats obtenus semblent indiquer que ce protozoaire puisse être rapproché du genre *Bonamia*. En effet, l'ultrastructure et la localisation de ce parasite sont comparables à celles de l'espèce *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980 ; Comps *et al.*, 1980).

De plus, l'utilisation de l'ascite n°5 a permis de révéler, en IFI, sur coupes de tissus infectés, un profil de marquage identique à celui obtenu pour le parasite *Bonamia ostreae*. Cette seule comparaison ne suffit pas à conclure que ce parasite peut être considéré comme étant le parasite *B. ostreae*. Il pourrait exister des antigènes communs à ces deux parasites proches sans pour autant que ce soit les mêmes.

La technique de PCR a permis d'obtenir, pour le parasite *B. ostreae* et le parasite de *C. rivularis*, un fragment des zones hypervariables codant pour le gène rRNA (Adlard et Lester, 1995). Cependant, aucun polymorphisme n'a été obtenu sur la base de la comparaison des profils de restriction des produits d'amplification. Le profil identique ne permet pas de conclure à une différence entre ces deux parasites. Cependant, cette approche a été prolongée par l'étude du gène codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (18S). Le séquençage en cours des fragments obtenus pour le parasite *Bonamia ostreae*, nous permettra de préciser les relations entre ces deux parasites.

Les différentes comparaisons réalisées, électrophorétique, antigénique ou moléculaire n'ont pas permis de mettre en évidence de différence entre ces deux parasites. Il s'agit de la première description d'un parasite du genre *Bonamia* sur une huître de l'espèce *Crassostrea*.

Il n'est pas possible d'éliminer l'hypothèse d'une contamination des animaux par l'eau introduite et distribuée en salle de quarantaine, d'autant que le système de pompage est en accès direct avec le milieu extérieur (zone endémique pour la bonamiose). Des infections à *B. ostreae* ont déjà été décrites sur des huîtres non indigènes *Ostrea chilensis*, *Ostrea angasi* introduites en France pour tester leur capacité d'acclimatation (Grizel *et al.*, 1983 ; Bougrier *et al.* 1986). Cependant ces espèces introduites étaient élevées dans le milieu naturel.

Il s'agit donc de la première mise en évidence de la sensibilité d'une huître du genre *Crassostrea* à un parasite du genre *Bonamia*. Jusqu'à présent, il était établi une stricte spécificité des parasites du genre *Bonamia* pour les huîtres du genre *Ostrea* et du genre *Mikrocytos* pour le genre *Crassostrea* ; le genre *Crassostrea* étant considéré

comme réfractaire à *B. ostreae* (Renault *et al.*, 1995). Deux espèces, *Bonamia ostreae* et *Bonamia sp.* sont actuellement connues respectivement chez *O. edulis* et *Tiostrongia chilensis*. Chez les *Crassostrea*, les deux parasites protozoaires décrits sont *Mikrocytos mackini* chez *C. gigas* et *Mikrocytos roughleyi* chez *Saccostrea commercialis* (Farley *et al.*, 1988). Ces deux parasites spécifiques des huîtres du genre *Crassostrea* constituent un risque majeur pour la conchyliculture mondiale en raison de l'importance de *Crassostrea gigas*. En effet, il peut être supposé que mis en contact avec des cheptels indemnes ces parasites pourraient provoquer, comme le parasite *B. ostreae*, une maladie à caractère endémique. Les genres *Bonamia* et *Mikrocytos* sont proches mais aucune relation antigénique n'a pu être mise en évidence avec les réactifs préparés (résultats non montrés).

Afin de confirmer cette sensibilité, une expérience d'infection expérimentale a été entreprise. Une inoculation de suspension de parasites purifiés de *C. rivularis* a été réalisée sur des huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, et des huîtres plates, *Ostrea edulis*, en suivant le protocole décrit pour le parasite *Bonamia ostreae*. Les animaux sont tous morts en cours d'expérimentation sans qu'il ait été possible de mettre en évidence d'infection due à ce parasite. D'autres expériences devront être à nouveau réalisées.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension du "système immunitaire" des mollusques bivalves. De ce point de vue, des recherches sur les huîtres *C. rivularis* pourraient permettre de caractériser les constituants de leur système de défense et de définir les bases immunologiques de la sensibilité à la bonamiose. Des travaux développés de façon comparative entre les hémocytes de *C. gigas* et les hémocytes de *C. rivularis* pourraient correspondre à une voie d'approche prometteuse conduisant à la compréhension des mécanismes de résistance à la bonamiose.

Résultats - Chapitre II

Caractérisation des cellules effectrices de
l'immunité chez l'huître plate,

Ostrea edulis

1. CARACTERISATION DES CELLULES EFFECTRICES DE L'IMMUNITE

1.1. Etude morphologique des hémocytes

La solution d'Alsever, à pH 7, permet de bloquer efficacement l'aggrégation des cellules. L'hémolymphe est diluée au 1/3 dans la solution simultanément à son prélèvement. Des observations au microscope inversé des suspensions ainsi obtenues ont montré des hémocytes intacts, non dégranulés et sans activité aggrégante.

La technique d'empreintes tissulaires ne permet pas de définir précisément les types cellulaires présents (Figure 23A).

Après cytocentrifugation et coloration des lames à l'aide du Kit Hémacolor (Merck), trois types hémocytaires sont distingués : les hémocytes granuleux, les grandes cellules agranuleuses et les petits hyalinocytes.

- *Les hémocytes granuleux* se caractérisent par l'aspect très hétérogène de leur cytoplasme qui contient des granulations en nombre et de forme variables. De taille relativement homogène (environ 10 μm), ils ont un rapport nucléo-cytoplasmique faible (Figure 23B).

- *Les grandes cellules agranuleuses* possèdent un cytoplasme d'aspect homogène, gris rosé après coloration au kit Hémacolor, qui peut contenir quelques vacuoles claires. Leur taille varie entre 10 et 15 μm . Elles ont un rapport nucléo-cytoplasmique faible (Figure 23C).

- *Les petits hyalinocytes* se distinguent des autres cellules par un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Ils possèdent un cytoplasme basophile réduit à une mince auréole autour du noyau. Quelques cellules présentent de courts prolongements cytoplasmiques (Figure 23D).

Clichés en microscopie photonique (x1000)

Figure 23A : Empreinte de tissu cardiaque, colorée à l'Hemacolor (Merck)

Figure 23B : Cytocentrifugation d'hémocytes totaux, colorée à l'Hémacolor. Granulocytes (flèches)

Figure 23C : Cytocentrifugation d'hémocytes totaux, colorée à l'Hémacolor. Grande cellule agranuleuse (flèche)

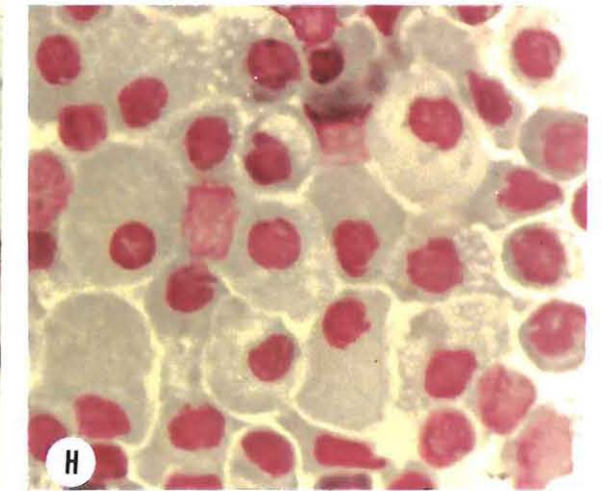
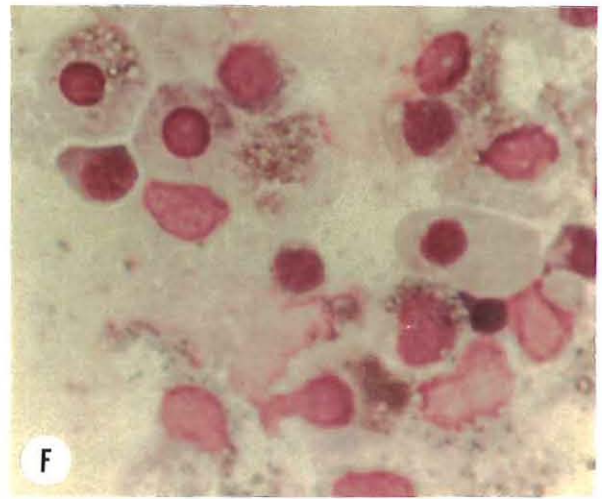
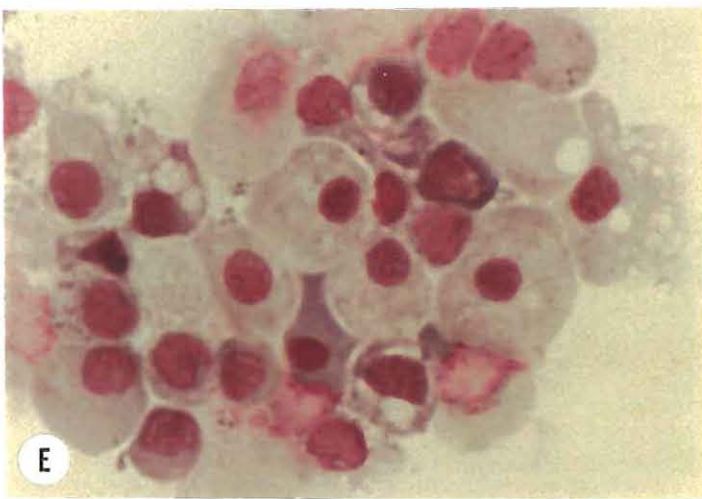
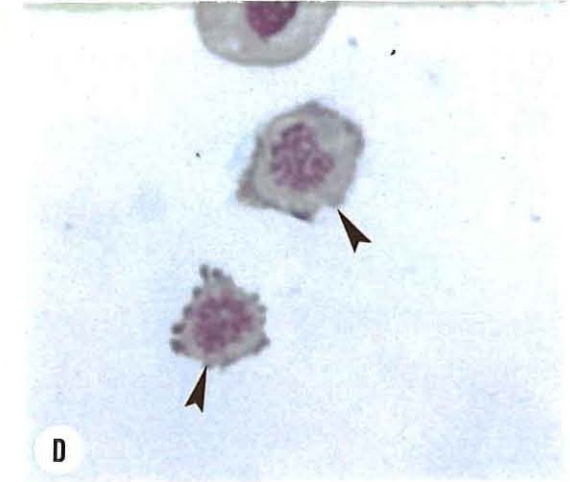
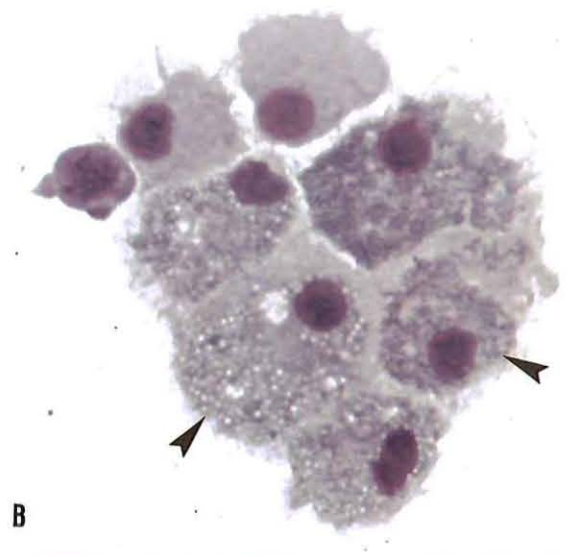
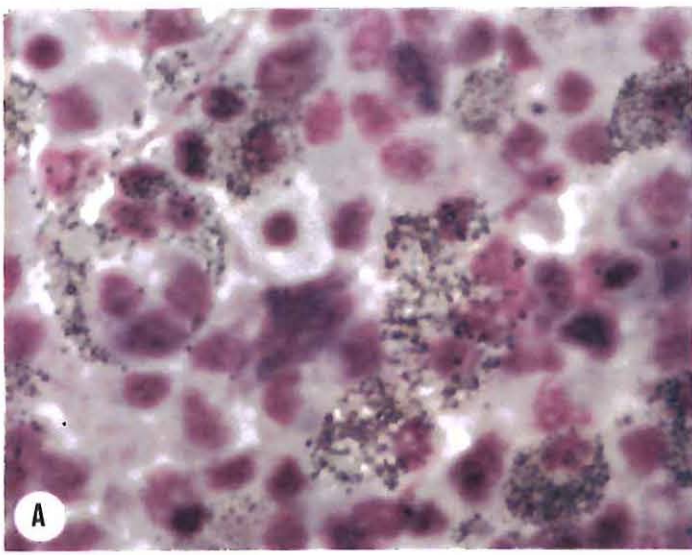
Figure 23D : Cytocentrifugation d'hémocytes totaux, colorée à l'Hémacolor. Petits hyalinocytes (flèches)

Figure 23E : Cytocentrifugation d'hémocytes séparés sur gradient de Percoll. Fraction 10-30% contenant des grandes cellules agranuleuses et des petits hyalinocytes

Figure 23F : Cytocentrifugation d'hémocytes séparés sur gradient de Percoll. Fraction 30-50% contenant une population hétérogène de cellules

Figure 23G : Cytocentrifugation d'hémocytes séparés sur gradient de Percoll. Fraction 60-70% contenant une population homogène de cellules granuleuses

Figure 23H : Cytocentrifugation d'hémocytes séparés sur gradient de Ficoll. Fraction 10-15% contenant la population homogène de grandes cellules agranuleuses



1.2. Séparation des populations hémycytaires

1.2.1. Séparation sur gradient discontinu de saccharose

Sur gradient de saccharose, après récupération des trois interfaces 5-10%, 10-20% et 20-30%, il n'a pas été possible d'obtenir de fractions riches en cellules. Les différents essais réalisés se sont tous soldés par un résultat négatif.

1.2.2. Séparation sur gradient discontinu de Percoll puis de Ficoll

Sur gradient discontinu de Percoll, trois populations cellulaires ont été obtenues, sur la base de leur densité, aux interfaces 10-30%, 30-50% et 60-70%.

✓ *Fraction 10-30%* : la majorité des hémycytes est trouvée à cette interface. Deux populations morphologiquement différentes sont reconnues sur les préparations cyto centrifugées. La population majoritaire est constituée de grandes cellules ovoïdes agranuleuses. La population minoritaire est constituée par des cellules, plus petites, basophiles, les petits hyalinocytes (Figure 23E).

✓ *Fraction 30-50%* : les cellules collectées à cette interface correspondent à une population hétérogène de cellules (grandes agranuleuses et petits hyalinocytes). Quelques cellules présentant des granulations sont également présentes (Figure 23F).

✓ *Fraction 60-70%* : peu d'hémycytes sont obtenus à cette interface. Cependant l'observation de cellules cyto centrifugées montre une population homogène de cellules granuleuses (Figure 23G). Ces cellules présentent des granulations de forme et de taille variables.

La fraction 10-30% du gradient de Percoll est ensuite déposée sur un gradient de Ficoll pour tenter de séparer les deux populations de cellules agranuleuses

présentes. Une fraction nette a été recueillie à l'interface 10-15%. Cette fraction a été analysée en microscopie photonique par la méthode de cyto-centrifugation. Les cellules collectées à cette interface correspondent à une population homogène de cellules agranuleuses de grande taille (Figure 23H).

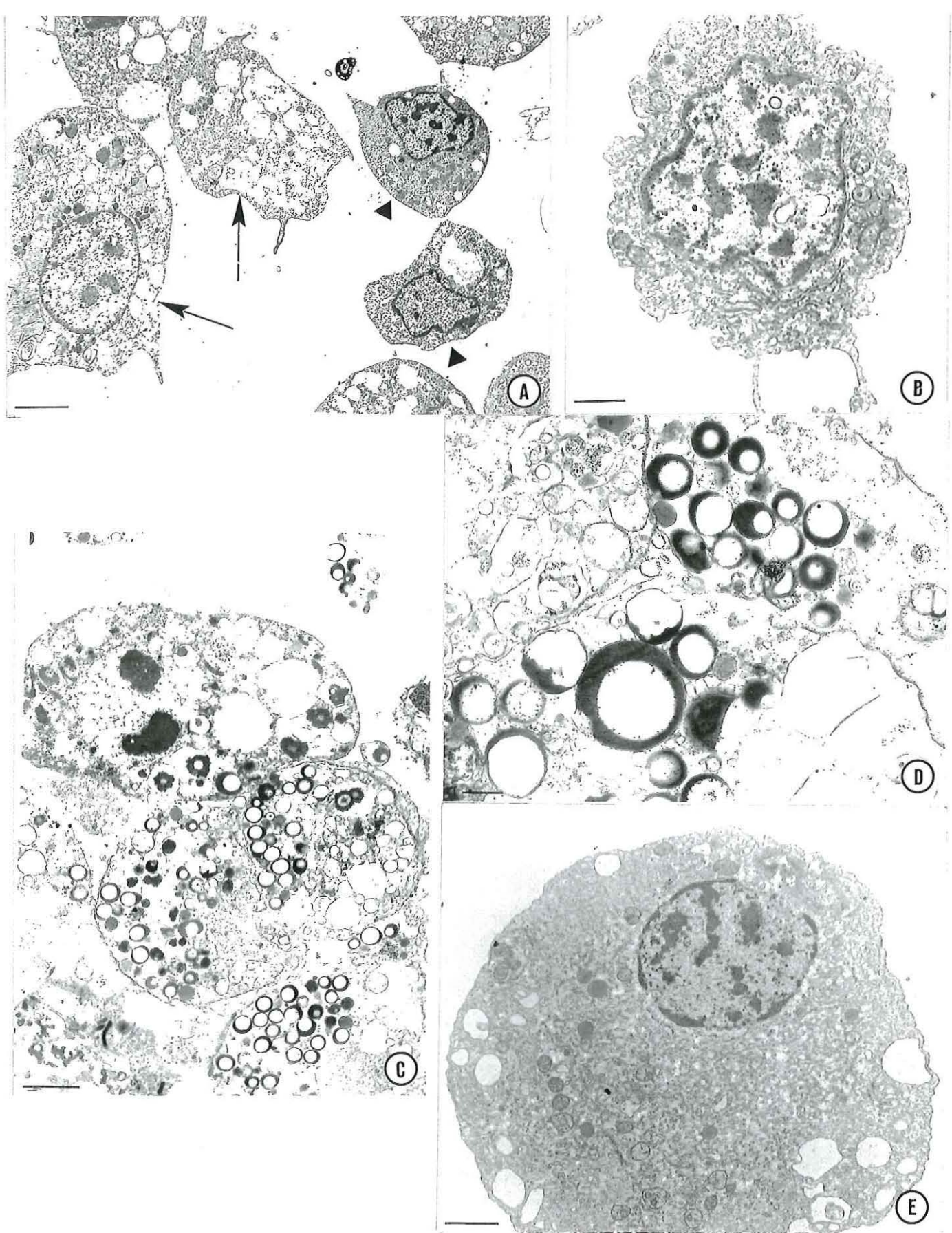
1.2.3. Etude ultrastructurale des populations hématocytaires séparées

Les fractions recueillies au niveau des différentes interfaces de Percoll et Ficoll ont été analysées en microscopie électronique à transmission après fixation en glutaraldéhyde et post-fixation en acide osmique.

✓ *La fraction de Percoll 10-30%* comporte une population majoritaire composée de cellules agranuleuses de grande taille (environ 20 μ m) et une population minoritaire composée de cellules de petites tailles (environ 10 μ m) (Figures 24A et B),

✓ *la fraction de Percoll 30-50%* correspond à une population hétérogène composée essentiellement de cellules agranuleuses de différentes tailles, et de quelques cellules granuleuses,

✓ *la fraction de Percoll 60-70%* révèle une population homogène de cellules granuleuses de taille comprise entre 15 et 20 μ m (Figures 24C et D). Dans le noyau arrondi, un nucléole est rarement observé. Le cytoplasme contient quelques mitochondries, des ribosomes libres, des vacuoles contenant un matériel granulaire assimilable à du glycogène. La caractéristique essentielle de ces hémocytes est la présence dans le cytoplasme de granules de structure hétérogène. Certains sont uniformément denses aux électrons, d'autres ont un centre clair et un cortex dense, les derniers ont un centre dense et un cortex clair (Figure 24D).



Clichés en microscopie électronique à transmission. **Figure 24A.** Fraction de Percoll 10-30% contenant des cellules agranuleuses (flèches) et des petits hyalinocytes (têtes de flèche)(barre=200nm). **Figure 24B.** Petit hyalinocyte à fort grossissement (barre=1 μ m). **Figure 24C.** Fraction de Percoll 60-70% contenant une population homogène de cellules granuleuses (barre=2 μ m). **Figure 24 D.** Détail des granulations des cellules granuleuses, de forme et de taille variables (barre=50nm). **Figure 24 E.** Cellule agranuleuse obtenue après séparation sur gradient de Ficoll (barre=2 μ m).

✓ La fraction de ficoll 10-15% est composée essentiellement de grandes cellules agranuleuses. Leur forme est ovoïde. Le noyau présente les mêmes caractéristiques que celui des hémocytes granuleux. Le cytoplasme contient plusieurs mitochondries parfois regroupées. Un appareil de Golgi, ainsi que du réticulum endoplasmique rugueux sont fréquemment observés. Ce type cellulaire peut comporter des petites vésicules claires aux électrons (Figure 24E).

1.3. Recherche des glycoprotéines sur hémocytes non séparés

Des marquages intenses sont notés sur la membrane des hémocytes (Figures 25A, B et C). Ces marquages correspondent aux résidus D-mannose et D-sucrose révélés par la technique à la Concanavaleine A.

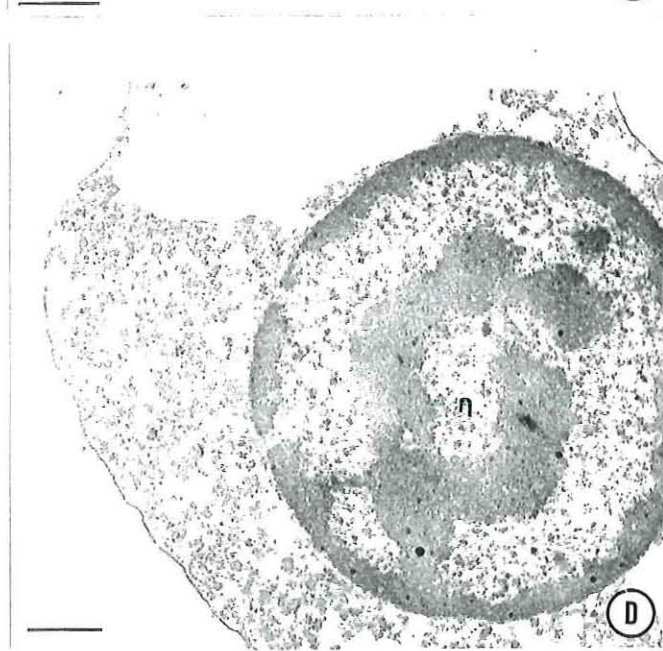
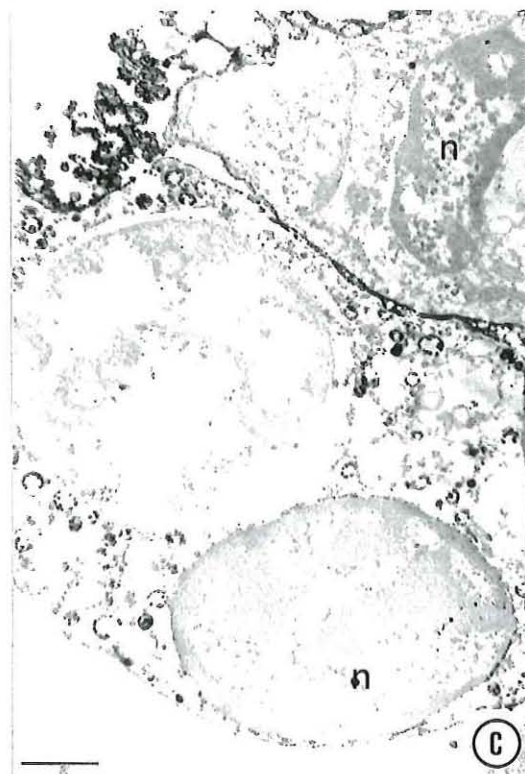
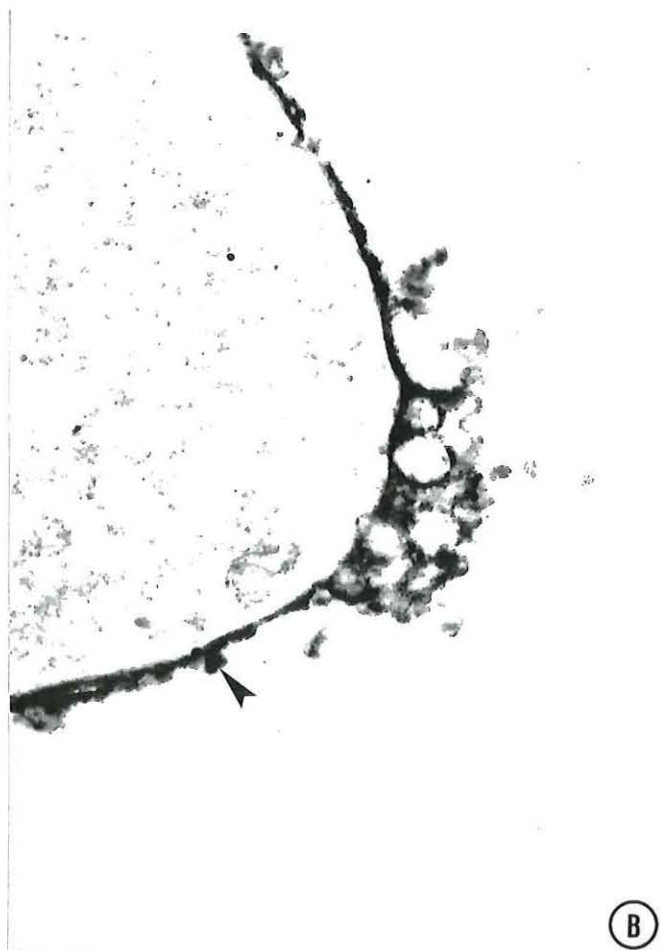
Aucun marquage n'est obtenu sur les échantillons témoins (Figure 25D).

2. CARACTERISATION ENZYMATIQUE DES POPULATIONS HEMOCYTAIRES

2.1. Activités enzymatiques des hémocytes non séparés

Les activités respectives des enzymes révélées par la galerie API ZYM ont été approximativement quantifiées sur la base des intensités des réactions colorimétriques et par référence aux données de Biomérieux.

Seize enzymes, au total, ont été détectées dans les hémocytes (tableau 4). Trois enzymes, l' α -chymotrypsine, l' α -galactosidase et la β -glucosidase n'ont pas été détectées. Les activités de la trypsine, de l' α -glucosidase et de l' α -mannosidase sont révélées à de faible niveau (0-5 nanomoles libérées). Parmi les seize activités obtenues, cinq enzymes, l'estérase (C4), la leucine arylamidase, la valine arylamidase, la phosphatase acide, et la β -galactosidase ont montré des activités enzymatiques supérieures à 30 nanomoles libérées. Les autres activités, la phosphatase alcaline, l'estérase lipase (C8), la lipase, la cystine arylamidase, la naphthol-AS-BI-



Clichés en microscopie électronique à transmission. Figure 25A. Marquage des glycoprotéines à la périphérie d'un hémocyte (flèche) (barre=50nm). Figure 25B. Détail du marquage (flèches) (barre=10nm). Figure 25C. Marquage des glycoprotéines à la jonction de deux cellules ; n : noyau (barre=2 μ m). Figure 25D. Echantillon témoin sans Concanavaline A. Noter l'absence de marquage à la périphérie de la cellule ; n : noyau (barre=1 μ m)

Enzymes	Hémocytes totaux	Population séparée de grandes cellules agranuleuses	Population séparée de granulocytes
Phosphatase alcaline	10	10	10
Estérase (C4)	>40	20	20
Estérase lipase (C8)	20	10	5
Lipase (C4)	5	<5	<5
Leucine arylamidase	>40	>40	10
Valine arylamidase	>40	10	5
Cystine arylamidase	20	<5	<5
Trypsine	<5	<5	<5
α -chymotrypsine	0	0	0
Phosphatase acide	30	5	5
Naphtol -AS-BI-phosphohydrolase	<5	<5	<5
α -galactosidase	0	0	0
β -galactosidase	>40	5	5
β -glucuronidase	15	5-10	5
α -glucosidase	<5	<5	<5
β -glucosidase	0	0	0
N-acétyl- β -glucosaminidase	20	<5	<5
α -mannosidase	<5	<5	<5
α -fucosidase	15	0	0

Tableau 4 : activités enzymatiques détectées dans les hémocytes totaux et dans les hémocytes séparées à l'aide du test API ZYM. Estimation du nombre de nanomoles libérées.

phosphohydrolase, la β -glucuronidase, la N-acétyl- β -glucosaminidase, et l' α -fucosidase ont une activité inférieure à 20 nanomoles libérées.

2.2. Activités enzymatiques des hémocytes séparés en gradient de densité

Nos résultats montrent, d'une manière générale, que les activités enzymatiques sont faibles dans les populations cellulaires séparées sur gradient de densité.

Quinze enzymes sont détectées dans les cellules granuleuses et dans les grandes cellules agranuleuses (tableau 4). Quatre enzymes, l' α -chymotrypsine, l' α -galactosidase, la β -glucosidase et l' α -fucosidase ne sont pas révélées. Parmi les quinze enzymes mises en évidence, quatre enzymes, l'estérase lipase (C8), la leucine arylamidase, la valine arylamidase et la β -glucuronidase ont montré des activités enzymatiques quantitativement différentes entre les populations cellulaires granuleuses et agranuleuses. Ces activités sont plus importantes dans la population des grandes cellules agranuleuses, respectivement 10, supérieure à 40, 10 et 10-15 nanomoles libérées, que dans la population des cellules granuleuses, respectivement, 5, 10, 5 et 5 nanomoles libérées. Aucune enzyme n'a montré une activité plus importante dans la population des cellules granuleuses comparativement avec la population des cellules agranuleuses.

2.3. Recherche d'activités intra-hémocytaires

Les recherches ont permis de mettre en évidence les quatre enzymes recherchées, l' α -naphtyl butyrate estérase, la β -glucuronidase, la Naphtol AS-D chloroacétate estérase, et l' α -naphtyl acétate estérase, sur le matériel cellulaire obtenu par empreintes de tissus cardiaque et sur les préparations d'hémocytes totaux cytocentrifugés. Cependant, sur empreintes de tissus cardiaque, les résultats obtenus ne sont pas lisibles.

- L'activité de l'enzyme Naphtol AS-D chloroacétate estérase est seulement localisée dans certaines granulations, qui apparaissent finement marquées en rouge

(Figure 26A). Les cellules agranuleuses et les petits hyalinocytes ne sont pas marqués (Figure 26B).

- L'activité de l'enzyme β -glucuronidase est localisée dans les granulations des granulocytes. L'activité plus ou moins intense est visualisée en rouge (Figure 26C). Aucune activité n'est discernée dans les cellules agranuleuses et les petits hyalinocytes, qui sont colorés facultativement en vert (Figure 26D).

- Sur populations totales cytocentrifugées, l'activité de l'enzyme α -naphtyl butyrate estérase se manifeste par un marquage brun ou rouge au niveau des granulocytes, et essentiellement de leur granulations (Figure 26E). Aucun marquage n'est observé sur les deux autres types cellulaires, les grandes cellules agranuleuses et les petits hyalinocytes (Figure 26F).

- Enfin, l'activité de l'enzyme α -naphtyl acétate estérase se manifeste par un marquage brun diffus. Les résultats ne sont pas clairement lisibles.

3. ESSAIS DE PRIMOCULTURES D'HEMOCYTES D'HUITRE PLATE

3.1. Mise au point d'une technique de lavage des hémocytes

La nécessité d'exclure les contaminants éventuels présents dans les prélèvements s'est traduite essentiellement par des essais de centrifugations en grand volume de tampon de rinçage. Plusieurs essais ont été réalisés à des vitesses et des temps différents afin de déterminer le protocole le plus approprié pour éliminer ces contaminants. Après avoir fait varier la vitesse de 100 à 900 g, il est apparu nécessaire d'associer plusieurs centrifugations à différentes vitesses pour d'une part, éviter la perte cellulaire, et d'autre part décontaminer au mieux les prélèvements.

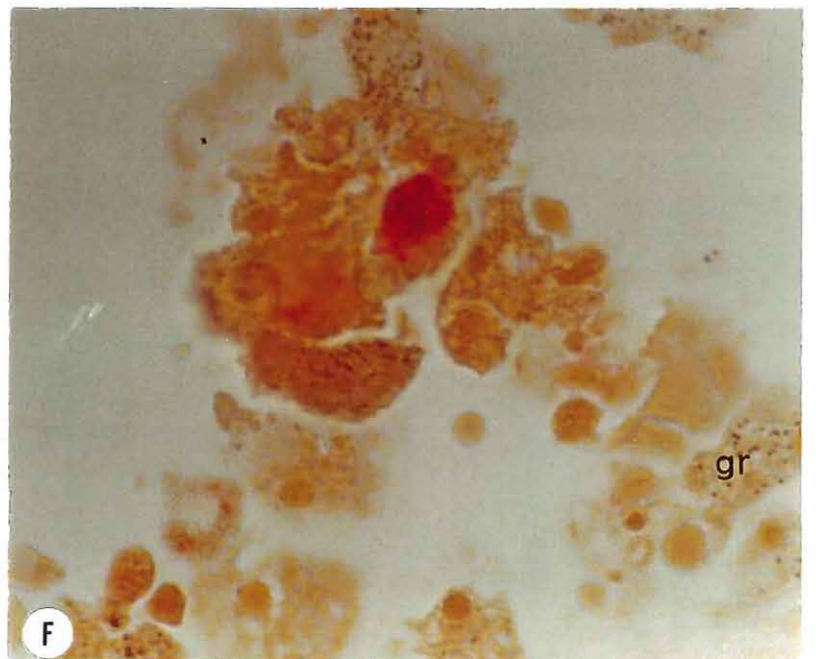
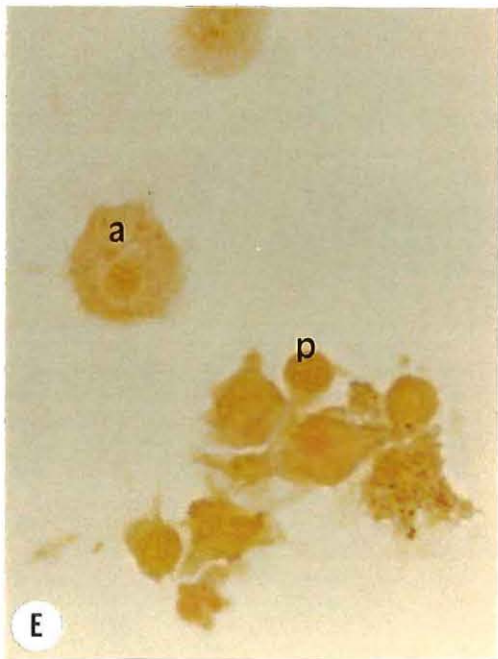
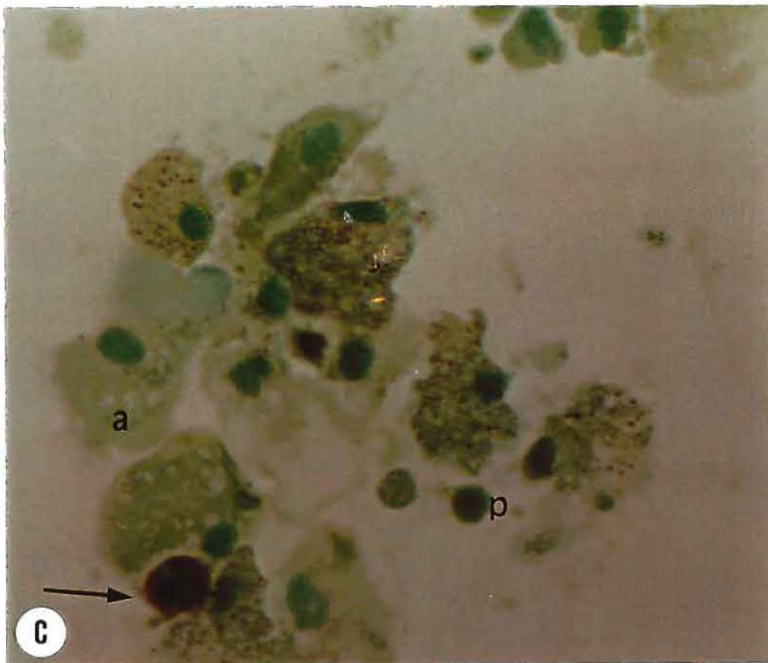
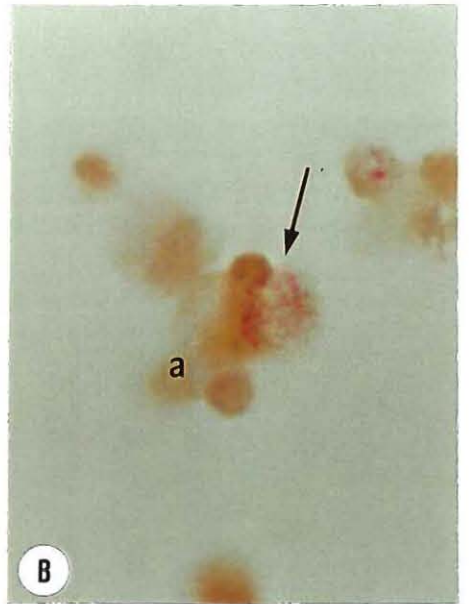
A la suite de ces résultats, les temps de centrifugation ont été optimisés en tenant compte des critères précédemment cités. Les durées et vitesses de centrifugation

Clichés en microscopie photonique (x1000). Marquage d'activités enzymatiques sur hémocytes totaux cytocentrifugés.

Figures 26A et B. Activité de l'enzyme AS-D-chloroacétate estérase qui se caractérise par un marquage rouge des granulations des cellules granuleuses. Noter l'absence de marquage dans les autres types cellulaires : a : cellule agranuleuse ; p : petit hyalinocyte

Figures 26C et D. Activité de l'enzyme β -glucuronidase qui correspond à un marquage rouge de certaines granulations (flèches). Les cellules agranuleuses (a) et les petits hyalinocytes (p) ne sont pas marqués.

Figures 26E et F. Activité de l'enzyme α -naphtyl butyrate estérase qui se caractérise par un marquage rouge intense de certaines granulations. Les cellules à granulations réfringentes (gr), les cellules agranuleuses (a) et les petits hyalinocytes (p) ne sont pas marqués.



donnant un résultat satisfaisant sont celles énoncées dans le chapitre 2.5.1..

3.2. Tests de milieux de culture

Plusieurs paramètres ont été retenus pour suivre l'évolution des cellules dans les différents milieux testés : la survie cellulaire, la numération cellulaire par puits en fonction du temps et l'aspect du tapis cellulaire.

3.2.1. Les milieux de base

Les milieux qui ont été testés sont constitués soit d'hémolymphe d'huître creuse ou d'huître plate, soit d'eau de mer, soit de solution d'Alsever. Quel que soit le milieu testé, il n'a pas été possible de conserver les cellules au-delà de 48 heures.

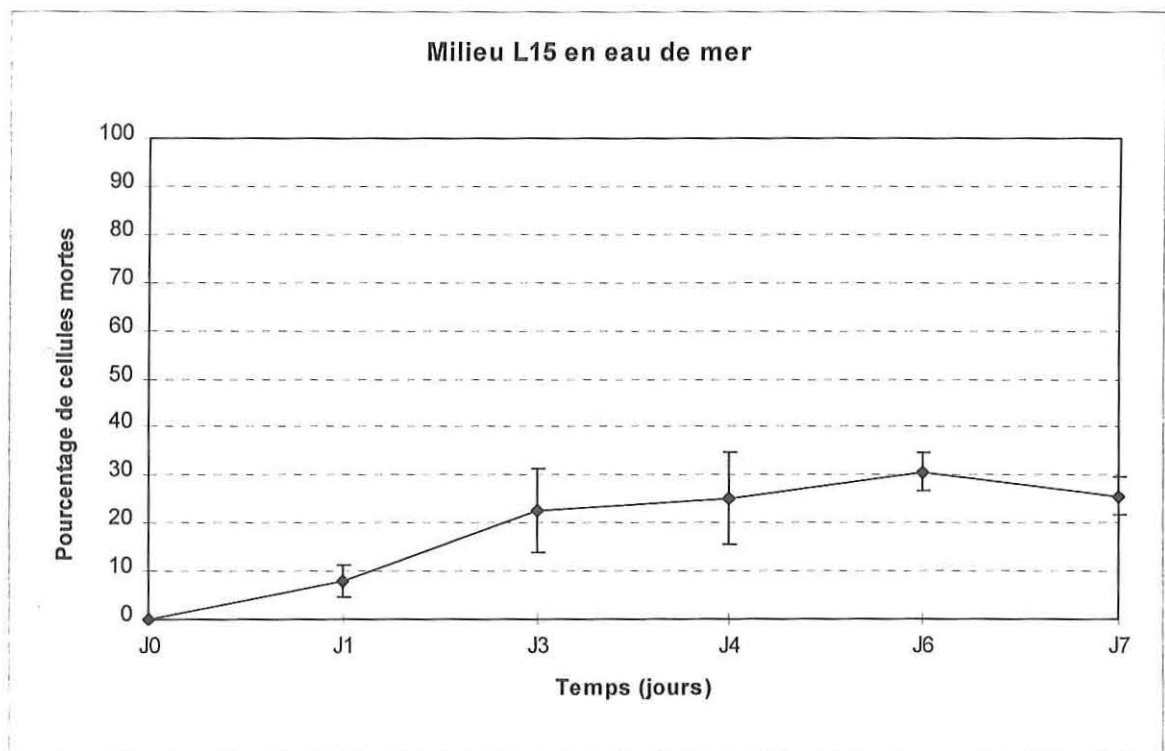
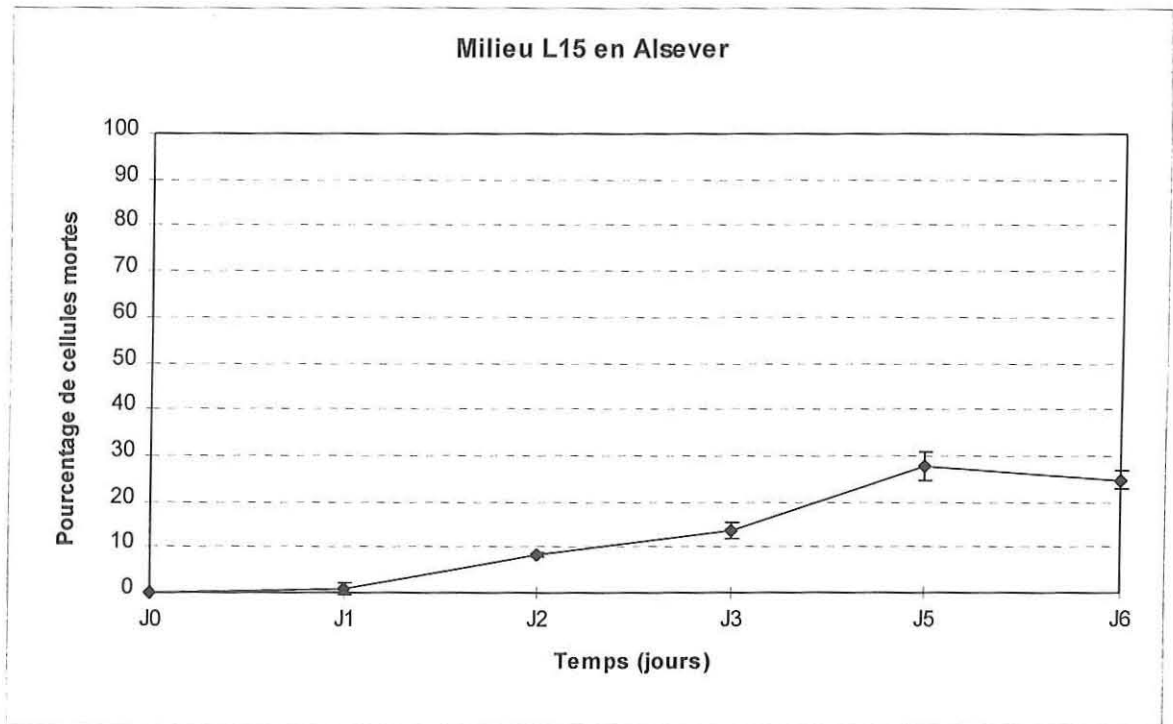
3.2.2. Les milieux synthétiques

Des milieux, tels que le milieu de Leibovitz : L15, le milieu de Grace ou le milieu 199 ont été testés. Ces milieux ont été reconstitués en eau de mer ou en solution modifiée d'Alsever afin d'obtenir la même osmolarité que le milieu marin.

La survie cellulaire en milieu 199 et en milieu de Grace est relativement limitée et n'excède pas deux jours. De plus ces milieux favorisent, malgré l'ajout d'antibiotiques, une prolifération bactérienne importante. La numération est impossible à réaliser sur ces préparations contaminées.

Par contre, le milieu de Leibovitz (L15) à 2%, reconstitué en eau de mer ou en solution d'Alsever permet une bonne conservation des cellules. En outre, après huit jours de mise en culture, la mortalité cellulaire n'excède pas 30% (Figures 27A etB). Il faut noter que ces essais sont réalisés sans changement de milieu.

En fonction de ces observations, il a été expérimenté l'ajout de sérum foetal de veau à 10% et d'hémolymphe d'huître plate à 10% en supplémentation de ces deux milieux. La numération et la survie ont été analysés quotidiennement.



Figures 27. Evaluation de la mortalité cellulaire quotidienne; **A.** Dans le milieu L15 en Alsever. **B.** Dans le milieu L15 en eau de mer

Une analyse statistique de la variance à deux facteurs avec un seuil $\alpha=5\%$ a été effectuée sur la numération cellulaire en fonction des milieux, et en fonction du temps. La normalité des distributions a été vérifiée pour chacun des milieux. Seules les données du milieu L15 eau de mer supplémenté en hémolymphe ne suivent pas une loi normale. En outre, pour obtenir une additivité des effets, les valeurs des numérations ont été transformées en données logarithmiques.

L'analyse de variance à deux facteurs croisés a révélé un effet jour significatif ($p=0.0021$). Par contre, l'effet milieu et les interactions entre les jours et les milieux ont été trouvés non significatifs ($p=0.614$ et $p=0.1079$). L'analyse de variance a été recommencée, par jour, pour les différents milieux. Il a ainsi été possible d'obtenir un classement qui différencie significativement deux groupes de milieux : les milieux, L15 reconstitué en Alsever supplémenté en SVF ou en hémolymphe, sont plus adaptés à la survie cellulaire que les milieux L15 eau de mer et L15 Alsever.

3.2.3. Aspect du tapis cellulaire

Pour le milieu Leibovitz (L15) reconstitué en Alsever, le tapis cellulaire est homogène, régulièrement réparti sur toute la surface du puits (Figure 28A).

Pour le milieu de Leibovitz (L15) reconstitué en eau de mer, des amas de cellules agrégées sont observés, provoquant dans le tapis cellulaire des plages vides (Figure 28B).

3.2.4. Nombre de cellules à ensemercer

Plusieurs essais d'ensemencement ont été réalisés pour définir la densité de cellules nécessaires à l'obtention d'un tapis cellulaire homogène, où les cellules sont en contact les unes avec les autres. Après plusieurs essais, il est apparu qu'une densité de 300 000 cellules ne permettait pas aux cellules de bénéficier d'un contact alors qu'une densité supérieure de 10^6 cellules entraînait un phénomène d'amas et de superposition des cellules entre elles. Au vue des résultats obtenus, dans ces conditions



Figure 28A. Cliché en microscopie photonique (x100). Hémocytes en milieu L15 reconstitué en Alsever, après 72 heures de mise en culture

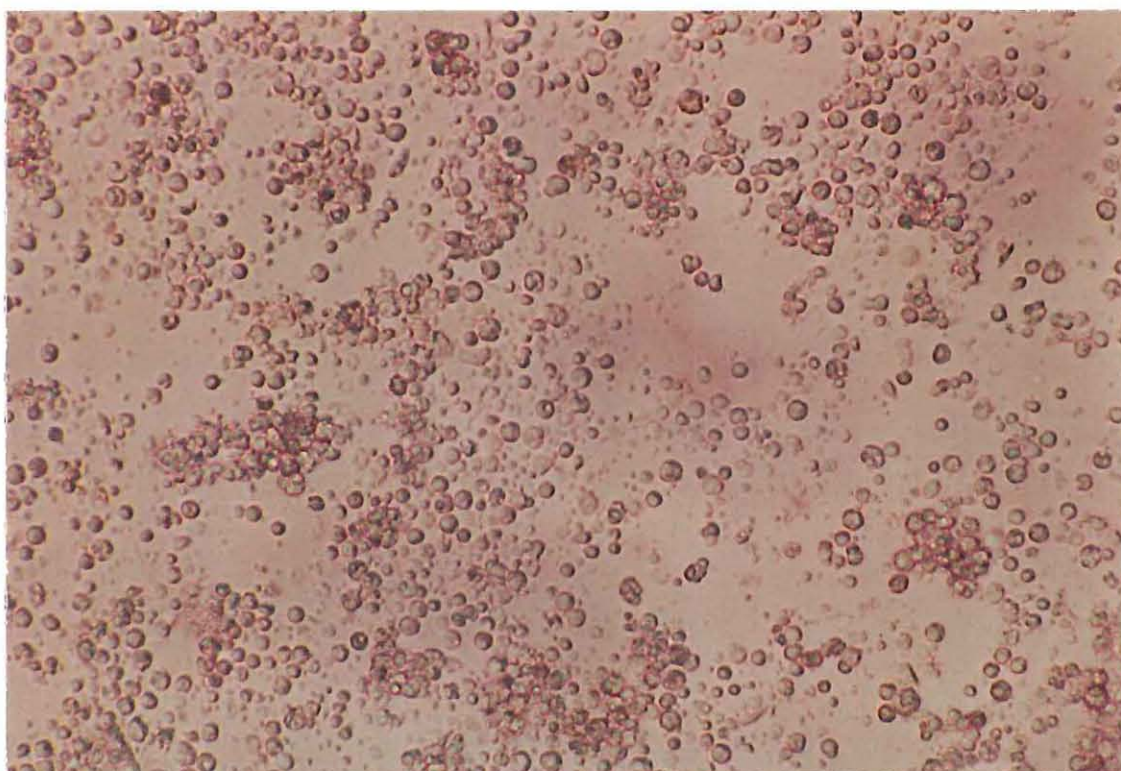


Figure 28B. Cliché en microscopie photonique (x100). Hémocytes en milieu L15 reconstitué en eau de mer, après 72 heures de mise en culture.

d'expérience, la densité retenue est de 5.10^5 cellules par puits, sous un volume de 200 μ l de milieu.

4. DISCUSSION

4.1. Caractérisation morphologique

Le prélèvement de l'hémolymphe des huîtres s'accompagne de phénomènes quasi instantanés d'aggrégation. La solution modifiée d'Alsever a été choisie pour le prélèvement des hémocytes. Elle est utilisée chez les mollusques bivalves pour inhiber ces phénomènes d'agglutination (Bachère *et al.*, 1988). Cette solution s'est également révélée efficace pour bloquer la coagulation et la mélanisation lors de prélèvements d'hémolymphe de crevettes (Rodriguez Leon, 1994).

Friebel et Renwranz (1995) rapportent une autre technique de prélèvement des hémocytes de la moule, *Mytilus edulis*, basée sur l'utilisation d'une solution contenant de la cytochalasine B. Cette technique qui permet d'inhiber les phénomènes d'aggrégation peut cependant modifier l'analyse fonctionnelle ultérieure des hémocytes. En effet, la cytochalasine B empêche la fermeture des vacuoles de phagocytose et provoque le relarguage extracellulaire des enzymes lysosomiales.

La mise au point de méthodes optimisées d'obtention des hémocytes a permis d'aborder leur étude d'un point de vue morphologique en évitant les risques de description de cellules modifiées de façon artéfactuelle.

Notre but étant d'acquérir des données morphologiques de base pouvant être appliquées à la reconnaissance des constituants du système de défense des huîtres plates, puis ensuite à une étude comparative entre les populations de cellules provenant d'animaux sensibles et résistants à la bonamiose, la technique de cyto centrifugation a été retenue pour la détermination de la formule hémocytaire. Cette technique présente l'avantage d'obtenir des couches monocellulaires, comparativement à la technique d'empreintes tissulaires. Elle permet d'obtenir des préparations de bonne qualité, et

met ainsi en évidence les différences morphologiques entre les cellules. Sur cette base, trois types cellulaires ont été définis en microscopie photonique : des granulocytes, des grandes cellules agranuleuses et des petits hyalinocytes. Le schéma d'identification des types cellulaires présenté dans cette étude est comparable à ceux proposés par Cheng (1989), Auffret (1985) et Chagot (1989).

Cependant, une classification et une identification de types hémocytaires basée uniquement sur des critères morphologiques ne semblent pas suffisantes. Différents auteurs ont entrepris des analyses biochimiques, cytochimiques ainsi que des études fonctionnelles afin de déterminer le rôle et la fonction des hémocytes (Auffret, 1985 ; Chagot, 1989 ; Pipe, 1990 ; Hine and Wesney, 1994). Cependant, les réels progrès dans ce domaine sont largement dépendants de la disponibilité de populations séparées d'hémocytes.

Des expériences de séparation des hémocytes d'huître plate *Ostrea edulis* ont été entreprises à partir d'hémocytes totaux en suspension en Alsever. Les protocoles utilisés sont directement extrapolés des techniques développées pour séparer des sous-populations d'hémocytes d'huîtres creuses *Crassostrea virginica* et *Crassostrea gigas* et de moule *Mytilus edulis* (Cheng *et al.*, 1979 ; Bachère *et al.*, 1988 ; Friebel et Renwranz, 1995).

Nos résultats sont en désaccord avec les données rapportées par Cheng *et al.* (1979), puisqu'aucune fraction cellulaire n'a été obtenue sur gradients de saccharose. En effet, ces auteurs ont obtenu cinq sous-populations d'hémocytes de l'huître américaine *C. virginica*. Ces séparations en gradient de saccharose, essentiellement basées sur des critères de taille, peuvent expliquer ces résultats contradictoires et le nombre élevé des types cellulaires retrouvés par ces auteurs. Sminia et Van der Knaap. (1987) rappellent d'ailleurs que certains types multiples peuvent représenter des stades de maturation ou des stades fonctionnels des types hémocytaires granuleux et agranuleux.

De la même manière, Bachère *et al.* (1988) décrivent la séparation de huit sous-populations hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, par la technique d'élutriation.

Friebel et Renwanz (1995) rapportent, sur gradient de Percoll, la séparation de deux types cellulaires granuleux chez la moule, *Mytilus californianus* : un premier type composé de cellules à granulations éosinophiles et un deuxième type essentiellement composé de cellules à granulations basophiles. Par contre, ces auteurs ne mettent pas en évidence de population cellulaire agranuleuse.

Il a été apporté quelques modifications à ces protocoles, notamment l'utilisation de la solution d'Alsever pour la préparation des gradients. La première étape de séparation effectuée sur un gradient de Percoll a permis d'obtenir une population homogène de cellules granuleuses à l'interface 60-70%. Cependant, les populations agranuleuses (grandes cellules agranuleuses et petits hyalinocytes) obtenues dans les autres fractions, ne peuvent être séparées par cette seule technique. La seconde étape, qui consiste à déposer sur gradient de Ficoll, la population enrichie en cellules agranuleuses, obtenue à l'étape précédente, a permis d'obtenir une fraction homogène, riche en grandes cellules agranuleuses.

Il a ainsi été possible d'obtenir deux populations homogènes, soit enrichies en grandes cellules agranuleuses, en quantité importante, soit enrichies en cellules granuleuses, en faible quantité. Cependant, il semble que cette séparation basée uniquement sur des critères de densité ne soit pas suffisante pour pouvoir séparer la population des petits hyalinocytes.

Il est possible d'obtenir un enrichissement plutôt qu'une séparation des types hématocytaires après centrifugation en gradient de densité. Il serait intéressant de tester des techniques d'immunoaffinité (Flo *et al.*, 1991) utilisant des anticorps monoclonaux. De tels anticorps spécifiques des populations granuleuses et agranuleuses sont en cours de préparation au laboratoire. Ils devraient permettre la séparation des types cellulaires par un trieur de cellules.

4.2. Caractérisation fonctionnelle

Des analyses enzymatiques, à l'aide de galeries API ZYM, ont été réalisées sur populations d'hémocytes totaux, puis sur populations de cellules granuleuses et de cellules agranuleuses. La recherche d'activité à l'aide de ces galeries est utilisée pour la caractérisation d'activités enzymatiques cellulaires (Monget, 1975 ; Nardon *et al.*, 1976), pour l'identification biochimique de champignons (Léger *et al.*, 1986), de protozoaires du genre *Trypanosoma*, mais également en bactériologie (Bernardet *et al.*, 1996). Ce système rapide d'identification a par ailleurs été utilisé dans le cadre de recherche d'activité enzymatique des hémocytes de moule *Mytilus edulis* et de palourde européenne *Ruditapes decussatus* (Noël, 1992 ; Lopez Gomez, 1995).

Les résultats obtenus montrent des différences d'activités entre la population d'hémocytes totaux et les populations séparées. En particulier, l'activité de l' α -fucosidase est inexistante chez les populations séparées. En outre, sept enzymes, l'estérase (C4), l'estérase lipase (C8), la valine arylamidase, la cystine arylamidase, la phosphatase alcaline et la N-acétyl- β -glucosamidase sont quantitativement plus importantes dans la population totale que dans les populations séparées.

Après séparation en gradient de densité, une activité enzymatique faible est notée, d'une manière générale, pour les hémocytes séparés. Au niveau qualitatif les résultats indiquent peu de différences entre la population de cellules agranuleuses, et la population de cellules granuleuses. Par contre, d'un point de vue quantitatif, une baisse d'activité est notée pour quatre enzymes, dans la population des cellules granuleuses comparativement à la population des cellules agranuleuses. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus en microscopie photonique et conduisent à envisager l'hypothèse que la population des cellules granuleuses est une population évolutive, et que le traitement de séparation a pu entraîner un relargage des enzymes présentes dans les cellules. En effet, certains hémocytes à granulations moins marquées, observés en microscopie photonique, pourraient traduire un relargage des contenus granulaires dans l'hémolymphe, phénomène semblable à la dégranulation des basophiles et mastocytes de mammifères (Roitt *et al.*, 1985). De la même manière, Chagot (1989) rapporte en microscopie électronique la présence de granulations "claires" aux

électrons et suggère qu'elles pourraient correspondre à différentes étapes de maturation des granules. En outre, ces données sont en accord avec l'activité enzymatique importante retrouvée dans le sérum après séparation des cellules par centrifugation (résultats non montrés).

Les résultats obtenus en microscopie photonique montrent qu'il est possible de détecter un plus grand nombre d'activités enzymatiques dans les cellules granuleuses. En particulier, ce type cellulaire est particulièrement riche en phosphatase acide. Cette présence d'activité confirme les données établies pour les granulocytes de l'huître américaine *C. virginica* (Cheng et Downs, 1988), l'huître creuse *C. gigas* et l'huître plate *O. edulis* (Auffret, 1985) mais contredit celles présentées par Henry (1987) pour les granulocytes de la palourde européenne, *Ruditapes decussatus* et Chagot (1989) pour les granulocytes d'*O. edulis* et de *C. gigas*. Néanmoins, l'ensemble de nos observations suggère que les cellules granuleuses d'*Ostrea edulis* puissent avoir, du fait d'un équipement enzymatique plus complet, des capacités de destruction de corps étrangers après phagocytose plus importantes que les autres types cellulaires. Il est intéressant de noter que les activités enzymatiques mises en évidence appartiennent à la famille des hydrolases. Ces enzymes sont toutes associées à la dégradation de matériels phagocytés (Moore et Gelder, 1985). Les phosphatases acides, et la β -glycérophosphatase ont été localisées dans les granules des hémocytes de la moule *M. edulis* (Lowe et Moore, 1978 ; Pipe, 1990).

4.3. Caractérisation des glycosylations

Par la technique utilisant la concanavaline A, il est possible de révéler des marquages nets et inégalement répartis, correspondant à des résidus D-mannose et D-glucose, à la surface des hémocytes. Ces données sont en accord avec celles de Chen et Bayne (1994) rapportant la présence de carbohydrates sur les hémocytes de la moule, *M. californianus*, et suggèrent que ces molécules aient un rôle opsonisant.

Dans cette perspective, il serait intéressant de rechercher la présence de lectines à la surface des hémocytes. En effet, ces molécules, qui peuvent être des protéines hémocytaires ou plasmatique, sont fortement impliqués dans les phénomènes d'opsonisation. Elles se fixent sur des particules étrangères présentes dans l'hémolymphe et facilitent leur internalisation. Des lectines extracellulaires ont été décrites chez les Vertébrés. Elles facilitent l'ingestion de bactéries (Gallily *et al.*, 1984) et de levures (Bar-Shavit et Goldman, 1976) par les macrophages. D'autre part, Vasta *et al.* (1994) ont décrit la présence de lectine sur les hémocytes de la moule *M. californianus*, et proposent un rôle opsonisant de ces molécules.

4.4. Mise au point d'un système d'étude *in vitro*

La deuxième partie du travail a été focalisée sur des essais de primocultures d'hémocytes d'huître plate, *Ostrea edulis*. Nous avons étudié plus particulièrement, le mode de prélèvement des hémocytes, le protocole de lavage et la composition du milieu de culture en choisissant parmi différents milieux synthétiques ou empiriques ceux qui permettaient la meilleure survie des cellules, dans le temps.

Les travaux effectués, depuis quelques années, pour la mise au point de lignées cellulaires de mollusques marins ont été relativement nombreux (Bayne, 1968 ; Flandre, 1971 ; Poder, 1980 ; Odintsova et Khomenko, 1991 ; Kleinschuster et Swink, 1992) mais sont restés infructueux jusqu'à ce jour. Quelques résultats intéressants sont toutefois disponibles. Ils concernent essentiellement les primocultures de tissus d'huître plate, *Ostrea edulis*, d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et de coquille Saint Jacques, *Pecten maximus*, (Le Deuff *et al.*, 1995 ; Renault *et al.*, 1995 ; Mortensen et Glette, 1996).

Il ressort de toutes les expériences que des milieux de base (eau de mer ou solution d'Alsever seuls) ne sont pas appropriés à la culture d'hémocytes d'huître plate, puisqu'ils ne permettent pas la survie des cellules au delà de 48h de mise en culture. De même, malgré la complexité de leur composition, et l'hypothèse de la présence de facteurs de croissance et d'éléments nutritifs (Sevala *et al.*, 1993), les

hémolymphes d'huître plate et d'huître creuse seules sont inadaptées au maintien des hémocytes. La difficulté en approvisionnement rend de plus leur utilisation aléatoire.

L'analyse de variance à deux facteurs a permis de faire ressortir une différence significative pour la survie entre les milieux L15 Alsever supplémenté en hémolymphes ou en sérum foetal de veau et les autres milieux. Il faut préciser toutefois que notre analyse a exclu un certain nombre de valeurs afin d'avoir des effectifs équilibrés. Cette analyse ne porte, en fait, que sur les trois premiers jours d'expérience. Il serait indispensable de compléter ce travail préliminaire, par une analyse sur une durée de culture plus longue, afin de vérifier si un nombre de numérations plus importantes peut améliorer la discrimination statistique des milieux.

Au vue de nos résultats, l'ajout d'hémolymphes et de sérum foetal de veau permet d'obtenir significativement une numération satisfaisante sur trois jours. Nous avons choisi le sérum foetal de veau en supplémentation, car la disponibilité d'hémolymphes est aléatoire et aucun paramètre ne nous permet, à l'heure actuelle, de juger de la qualité des hémolymphes ponctionnées.

Les essais de primoculture en microplaque ont été répétés avec des quantités croissantes de cellules par puits, afin d'obtenir un tapis cellulaire confluent, homogène au fond du puits. Les phénomènes de coopération cellulaire nécessitent un nombre important de cellules en culture. Les cellules ancrées au fond de fioles produisent un microenvironnement qui favorise la croissance cellulaire (Watson *et al.*, 1987 ; Gumbiner *et al.*, 1993).

Lors de nos expériences, le pourcentage initial des types hémocytaires n'a pas été déterminé avant la mise en culture. Il serait important de vérifier si la présence d'un type particulier influence la survie ou le maintien des cellules en culture. En effet, certaines cellules peuvent sécréter dans le milieu de culture des substances nécessaires au développement d'autres types cellulaires (Gumbiner *et al.*, 1993).

D'autres essais devront compléter ces premiers résultats, notamment des essais de température de culture, et des essais de changements de milieux. D'autre part, bien

que les hémocytes présentent un aspect « normal » en microscopie photonique, ils peuvent être fonctionnellement altérés. Hervio (1992) a d'ailleurs rapporté ce type de phénomène lors de la mise en culture d'hémocytes en microtubes Eppendorf.

Bien qu'elle nécessite une optimisation, la technique de primoculture des hémocytes en microplaque est préférable aux techniques utilisées jusqu'à présent et qui consistaient notamment à réaliser des primocultures d'hémocytes sur lames histologiques en eau de mer filtrée stérile (Hervio, 1992). La méthode décrite par cet auteur, s'est révélée inadéquate notamment pour des durées d'expérience de quelques jours, car les risques d'assèchement des primocultures étaient importants.

La disposition d'un tel système d'étude constitue la première étape de l'analyse, *in vitro*, des interactions entre le parasite et les hémocytes. Il devrait permettre d'étudier les mécanismes par lesquels le parasite *B. ostreae* s'établit dans l'hôte et induit la maladie.

Résultats - Chapitre III

Etude des mécanismes cellulaires de défense
mis en jeu par l'huître plate, *Ostrea edulis*,
vis-à-vis du parasite *Bonamia ostreae*

1. CYTOLOGIE COMPARATIVE, *IN VIVO*, DES POPULATIONS HEMOCYTAIRES PROVENANT D'HUITRES PLATES RESISTANTES ET SENSIBLES AU PARASITE *BONAMIA OSTREAE*

Les résultats ont été analysés par différents tests statistiques, avec le risque $\alpha=5\%$. Pour la numération nous avons effectué un test d'égalité des moyennes de deux lois normales, puis nous avons calculé l'intervalle de confiance à 95% de ces moyennes. De même, pour le calcul des différents types hémodocytes, un test d'égalité des pourcentages de deux lois normales, et un calcul de l'intervalle de confiance à 95% ont été réalisés.

1.1. Analyse de la numération cellulaire

Les résultats de la numération cellulaire sont présentés sur la figure 29. Les histogrammes représentent la moyenne, pour chaque population, inoculée et non inoculée, de la numération (nombre d'hémocytes circulants totaux par millilitre d'hémolymphe). Des différences significatives entre les populations sont observées, en particulier entre les populations sensibles, PAL, QUIB, et les populations résistantes G1xTQuib et G1xG2.

Quel que soit l'état des populations, inoculées ou non inoculées, le nombre total de cellules est plus faible chez les huîtres sélectionnées que chez les huîtres sensibles. Pour les populations non inoculées, les numérations sont de 6.4, 5.3, 4.8 et 4.2 10^6 cellules/millilitre d'hémolymphe, respectivement pour les populations sensibles (PAL, QUIB), et pour les populations sélectionnées (G1xTquib et G1xG2), et de 5, 6.8, 4 et 3.3 10^6 cellules/millilitre pour les mêmes populations inoculées.

Si l'on compare les populations résistantes, entre elles, cette numération est constante que les huîtres soient inoculées ou non. Il n'y a pas de tendance d'augmentation significative de la numération cellulaire pour les populations inoculées par rapport aux populations non inoculées.

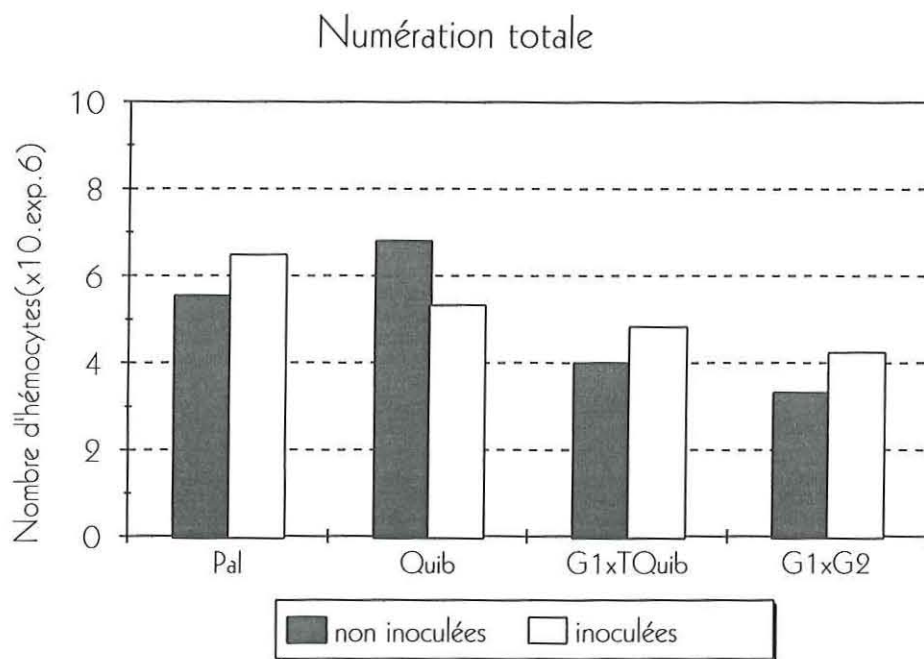


Figure 29. Numération cellulaire (nombre d'hémocytes circulants/millilitre d'hémolymphe) des deux populations sélectionnées G1xTQuib, G1xG2, et des deux populations sensibles Palavas (PAL) et Quiberon (QUIB).

Après le test d'égalité des moyennes, le nombre total des hémocytes circulants est significativement plus faible, pour les populations non inoculées, entre PAL (Palavas) et les deux populations résistantes, G1xTQuib et G1xG2 ($p=2.3$ et $p=3.1$), et entre QUIB (Quiberon) et les populations G1xTQuib et G1xG2 ($p=5$ et $p=5.8$).

Pour les populations ayant subi une inoculation, le nombre d'hémocytes circulants est significativement plus faible d'une part entre la population sensible PAL (Palavas) et les deux populations sélectionnées G1xTQuib et G1xG2 ($p=3.7$ et $p=5.4$), et d'autre part, entre la population QUIB (Quiberon) et la population G1xG2 ($p=3.1$).

Le calcul de l'intervalle de confiance à 95% des moyennes ne permet pas de définir avec la valeur de la numération cellulaire l'appartenance d'un individu à un groupe donné (Figure 30).

1.2. Analyse de la formule hémocytaire

1.2.1. Observation de préparations cytocentrifugées

En ce qui concerne les populations non inoculées, le comptage des différents types hémocytaires indique que :

- les pourcentages des grandes cellules agranuleuses sont réduits chez les huîtres résistantes par rapport aux huîtres sensibles. Respectivement pour G1xTQuib, G1xG2, PAL et QUIB, les pourcentages sont de 25%, 20%, 56% et 57% (Figure 31)
- les pourcentages des cellules granuleuses sont plus importants pour les populations sélectionnées que pour les populations sensibles (Figure 31).

Les deux populations sélectionnées G1xTQuib et G1xG2 ont une formule hémocytaire semblable. Ce profil est conservé après inoculation.

Le test d'égalité des pourcentages de deux lois normales révèle des différences significatives pour le nombre des grandes cellules agranuleuses. Pour les populations

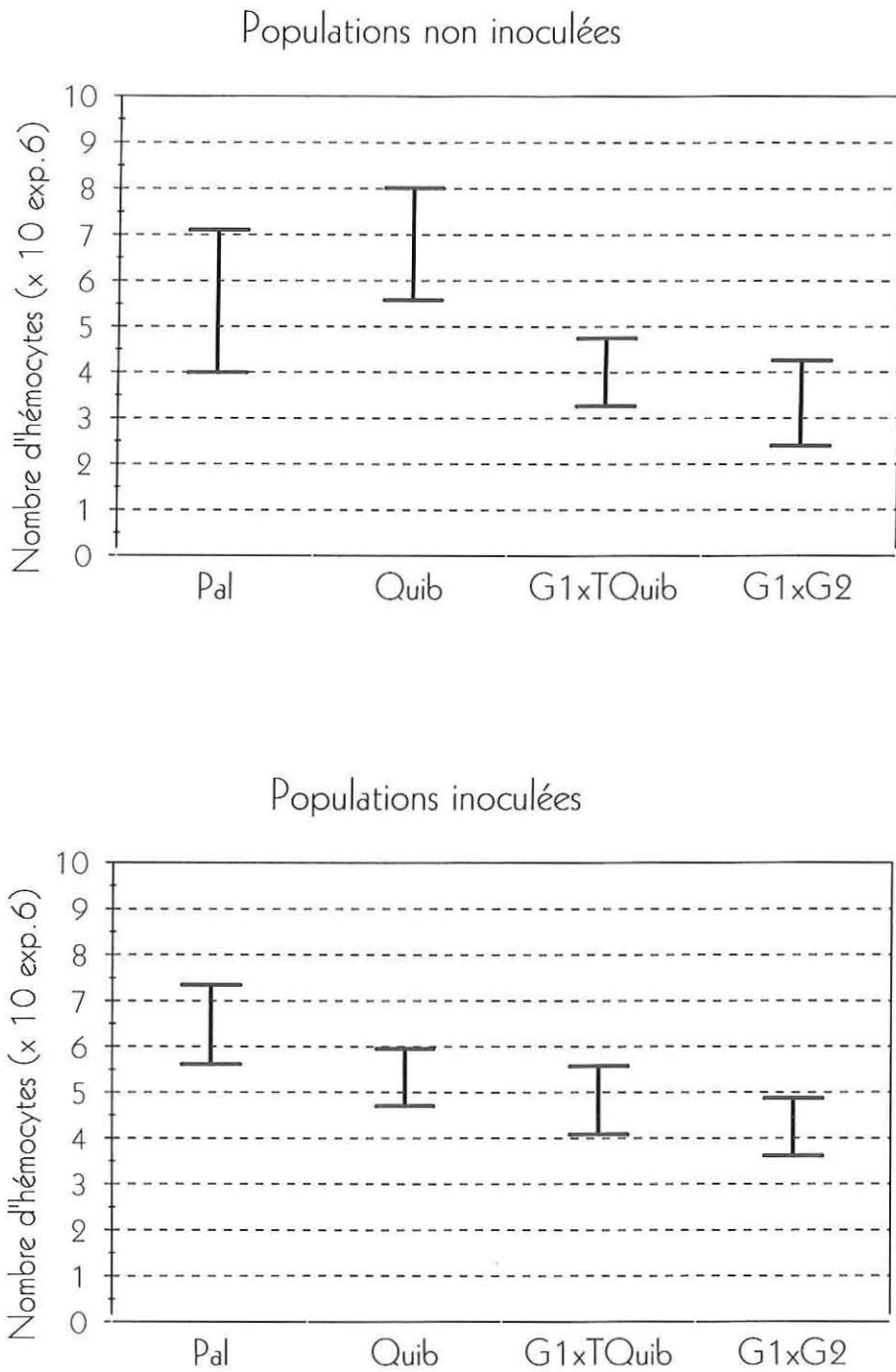


Figure 30. Intervalle de confiance à 95% de la numération cellulaire des populations sélectionnées sélectionnées G1xTQuib, G1xG2, et des populations sensibles Palavas (PAL) et Quiberon (QUIB), inoculées ou non inoculées.

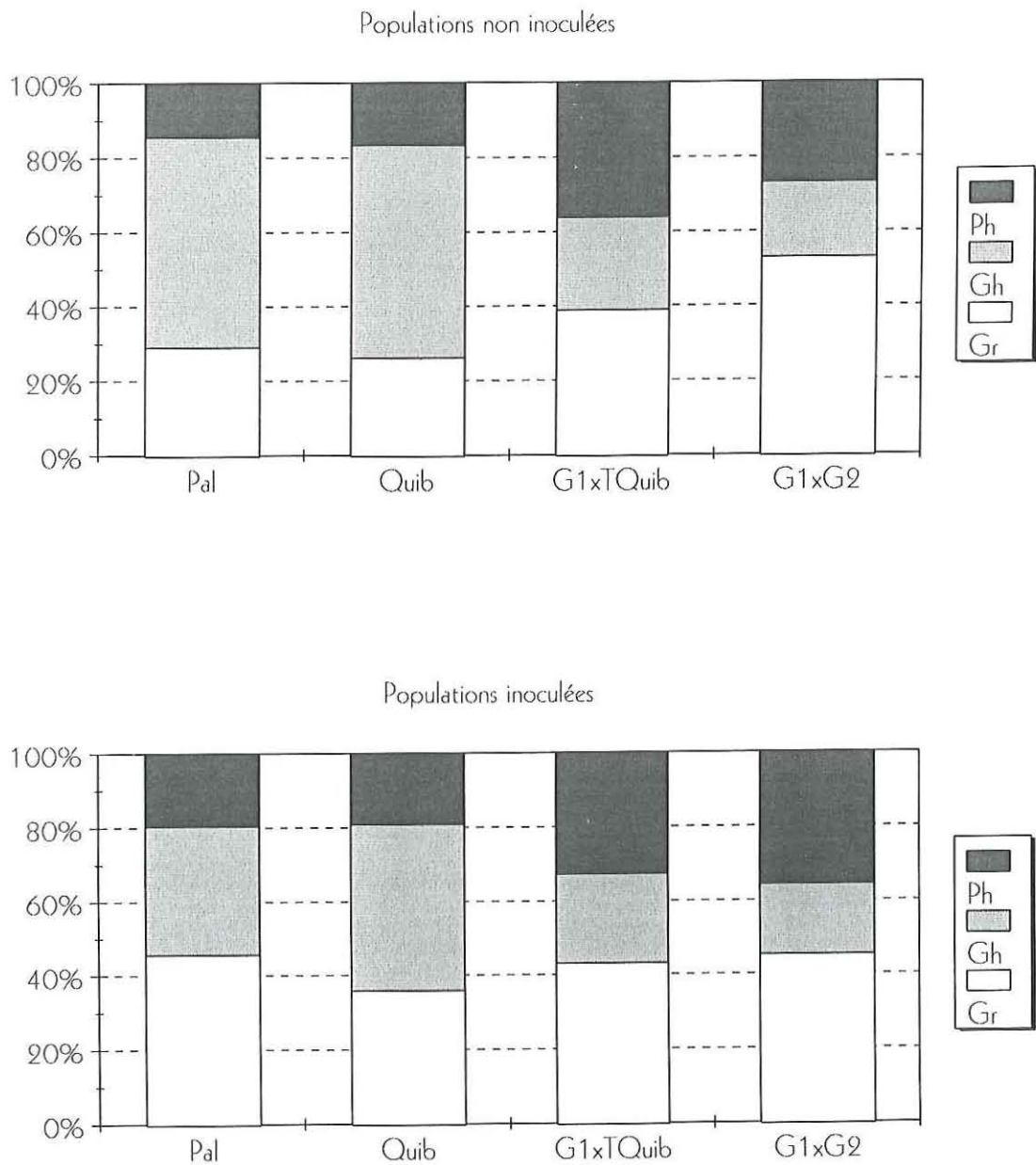


Figure 31. Formule hémocytaire (% de chaque type cellulaire) pour chacune des populations inoculées et non inoculées. granulocytes (Gr), grandes cellules agranuleuses (Gh) et petits hyalinocytes (Ph).

non inoculées, le pourcentage des grandes cellules agranuleuses est significativement plus faible :

- pour la population G1xTQuib, par rapport aux populations sensibles PAL et QUIB ($p=10.66$ et $p=14.69$),
- pour la population G1xG2, par rapport aux populations PAL et QUIB ($p=12.25$ et $p=16.67$).

En outre, après inoculation les mêmes différences significatives sont retrouvées, avec cependant une réduction des populations des grandes cellules agranuleuses, pour les huîtres sensibles à la bonamiose.

Pour les populations granuleuses, une différence significative est trouvée entre la population PAL inoculée et la population QUIB inoculée ($p=2.26$). Les autres pourcentages ne sont pas significativement différents (<1.96).

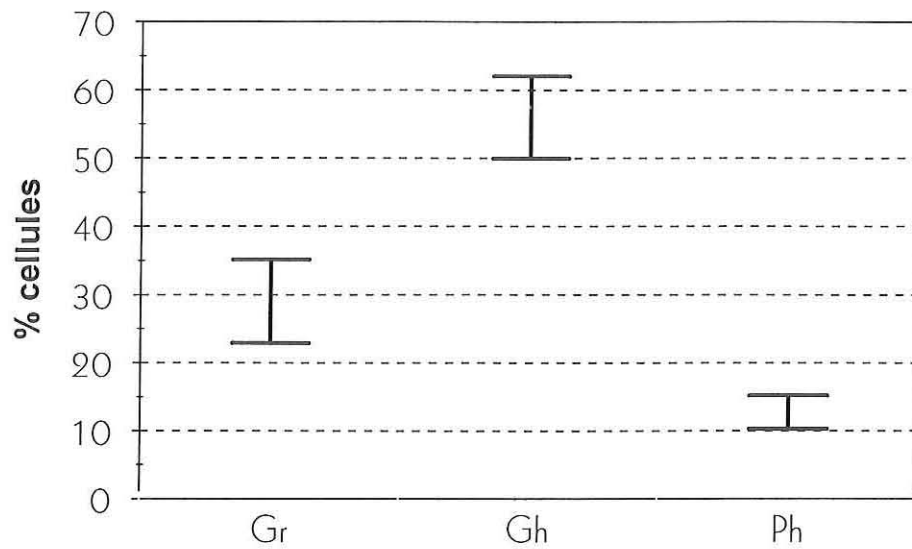
Le calcul de l'intervalle de confiance à 95% permet de définir une formule hémostatique type, représentative de chacune des populations sensibles ou résistantes (Figures 32 et 33).

1.2.2. Etude en cytométrie de flux

Il est difficile de discriminer les trois populations cellulaires, granuleuses, agranuleuses et petits hyalinocytes, comme cela est possible sur préparations cyto centrifugées. Toutefois, il semble se dessiner un profil global pour chaque population d'huître sensible et résistante, au sein duquel trois groupes se distinguent (Figures 34 et 35) :

- un premier composé de petites cellules non complexes, de taille relativement homogène,
- un second avec des cellules de taille plus grande, plus hétérogène, un peu plus complexes,
- un troisième groupe composé de cellules complexes, de taille très hétérogène.

Population de Palavas non inoculée



Population G1XG2 non inoculée

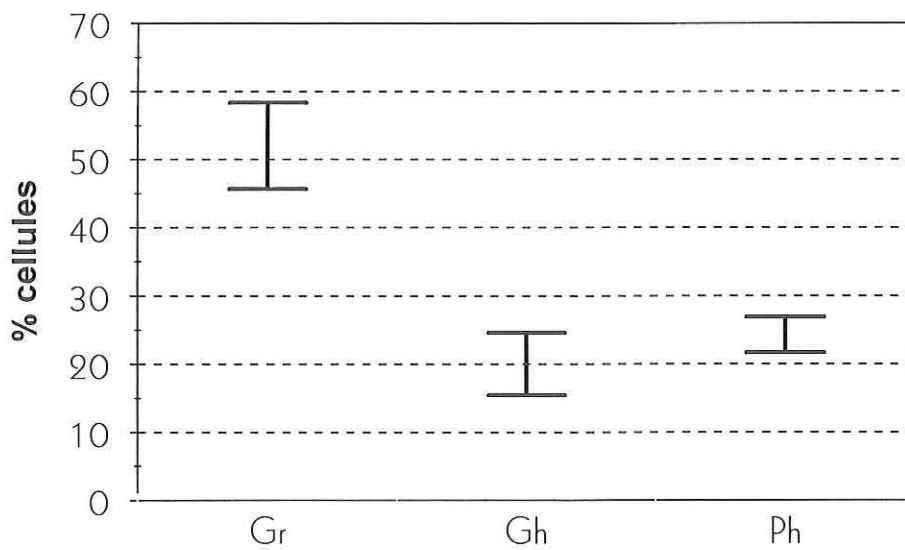
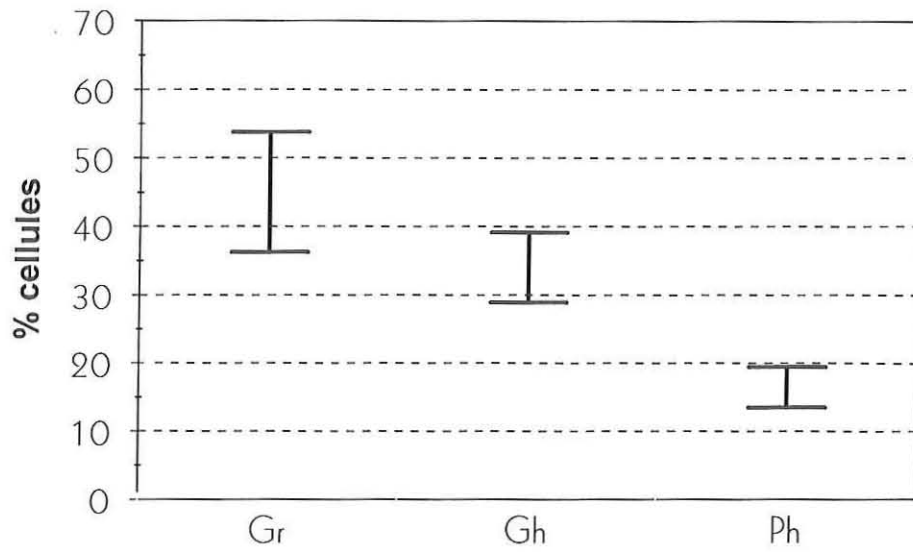


Figure 32. Intervalle de confiance à 95% pour chaque type cellulaire : granulocytes (Gr), grandes cellules agranuleuses (Gh) et petits hyalinocytes (Ph), pour la population sensible Palavas (PAL) et pour la population sélectionnée G1xG2, non inocuées.

Population de Palavas inoculée



Population G1XG2 inoculée

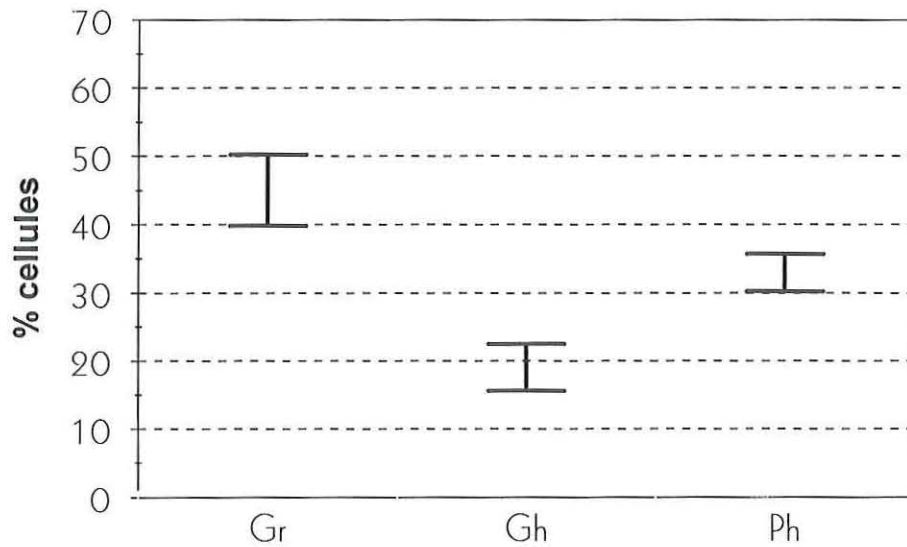


Figure 33. Intervalle de confiance à 95% pour chaque type cellulaire : granulocytes (Gr), grandes cellules agranuleuses (Gh) et petits hyalinocytes (Ph), pour la population sensible Palavas (PAL) et pour la population sélectionnée G1xG2, inoculées.

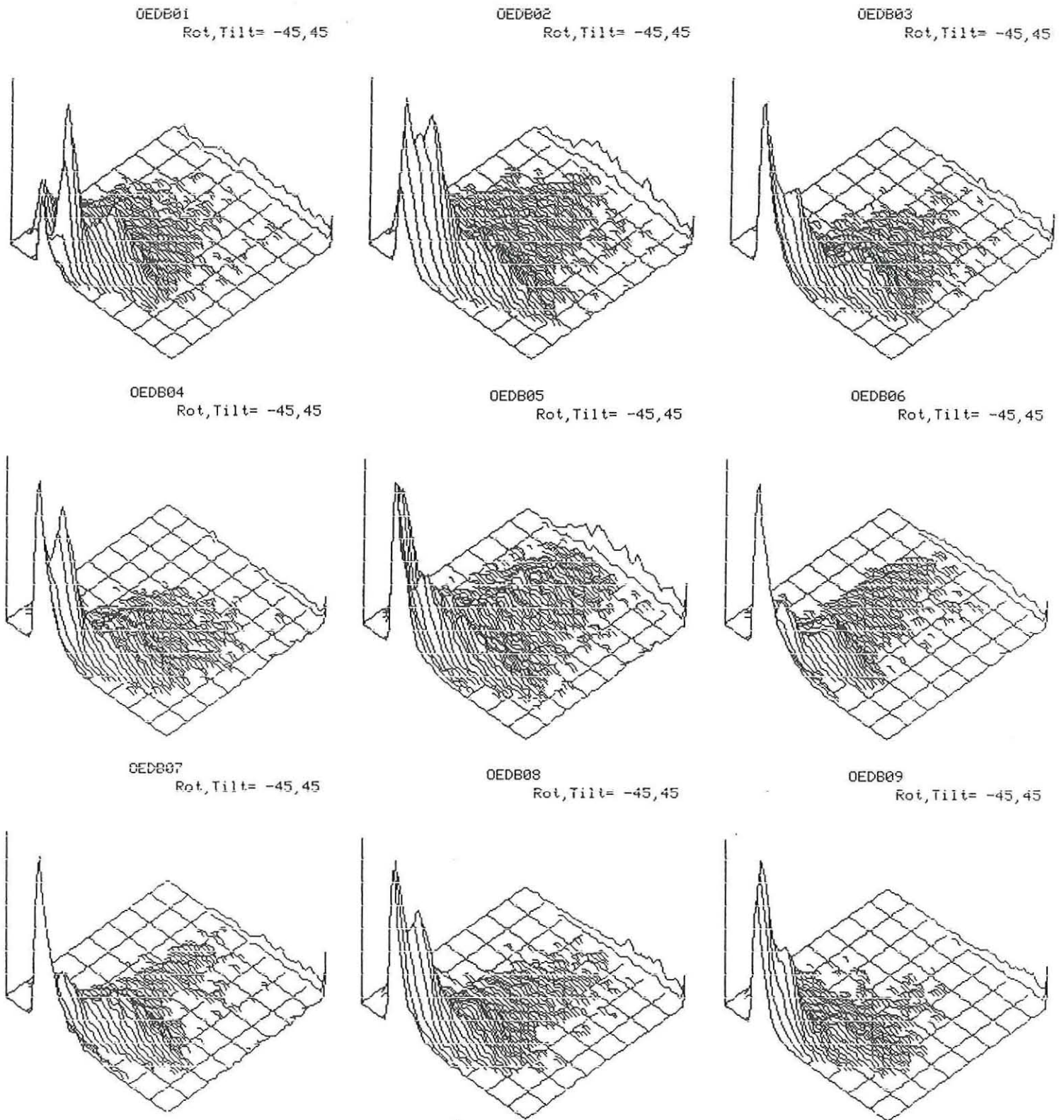


Figure 34. Population sélectionnée G1xG2. Représentation en trois dimensions des résultats obtenus pour 10 000 évènements en cytométrie de flux. Axe des X : taille des cellules ; axe des Y : complexité des cellules

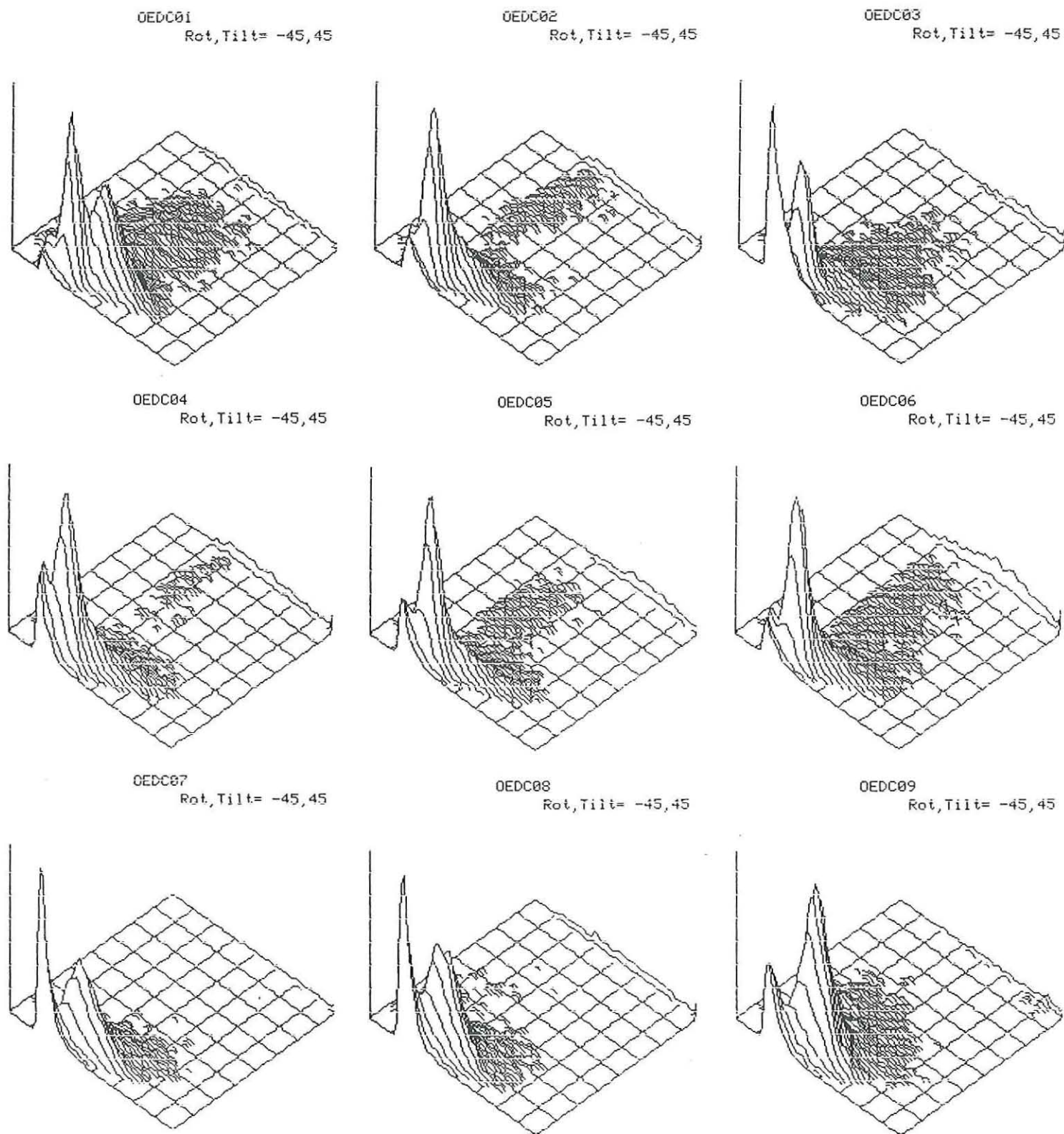


Figure 35. Population sensible Palavas (PAL). Représentation en trois dimensions des résultats obtenus pour 10 000 évènements en cytométrie de flux. Axe des X : taille des cellules ; axe des Y : complexité des cellules

1.3. Détermination du taux d'infection des différents types hématocytaires

Le comptage des types hématocytaires infectés par le parasite *Bonamia ostreae* a été réalisé sur sept animaux survivants parasités. Les trois populations cellulaires, granulocytes, grandes cellules agranuleuses et petits hyalinocytes, sont infectées par le parasite (Figure 36). Cependant, l'analyse statistique du pourcentage de chaque type infecté désigne la population des grandes cellules agranuleuses comme la plus infectée, à l'issue de notre expérience (Figure 37).

Les cellules agranuleuses contiennent en moyenne plus de cinq parasites alors que les autres types cellulaires en contiennent en moyenne moins de cinq.

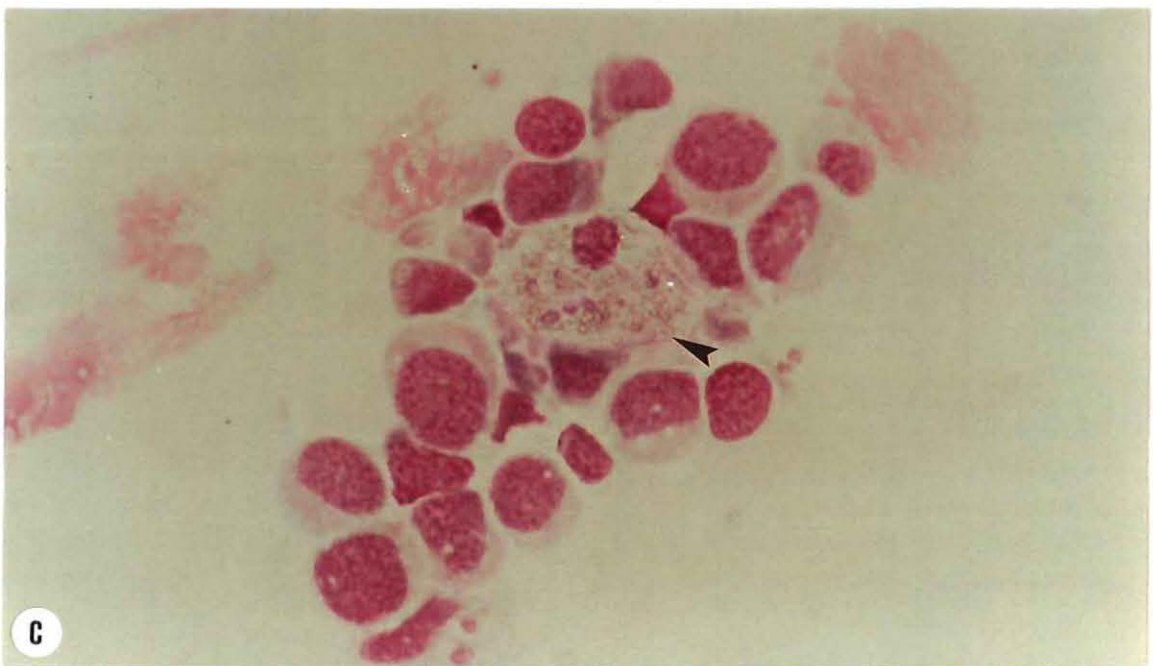
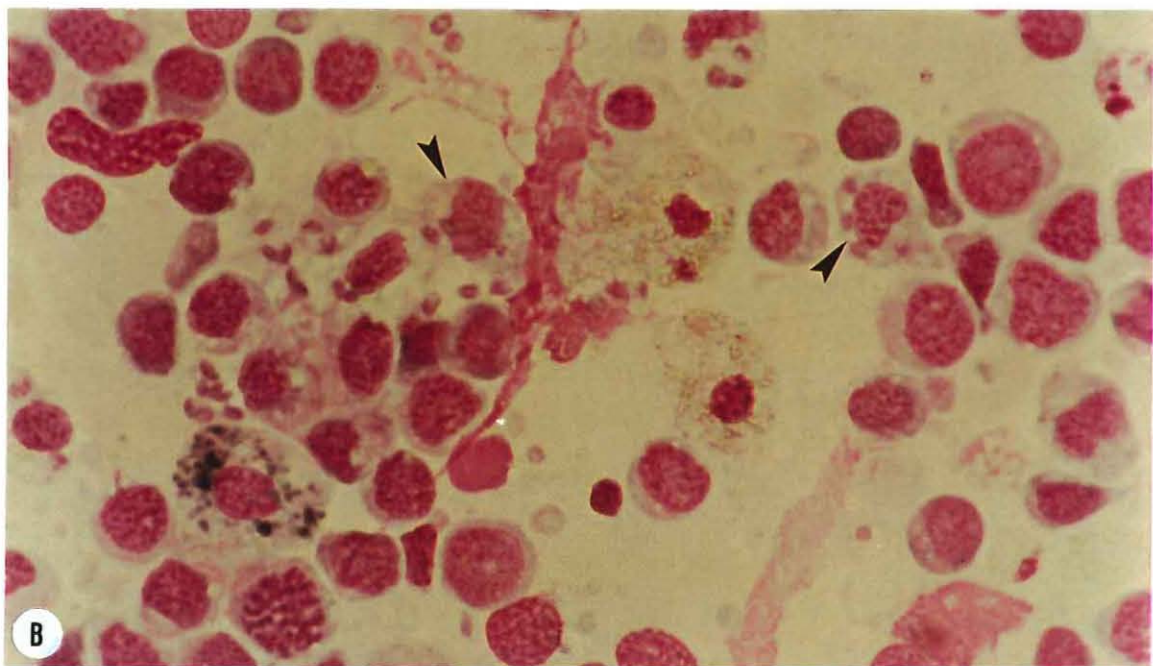
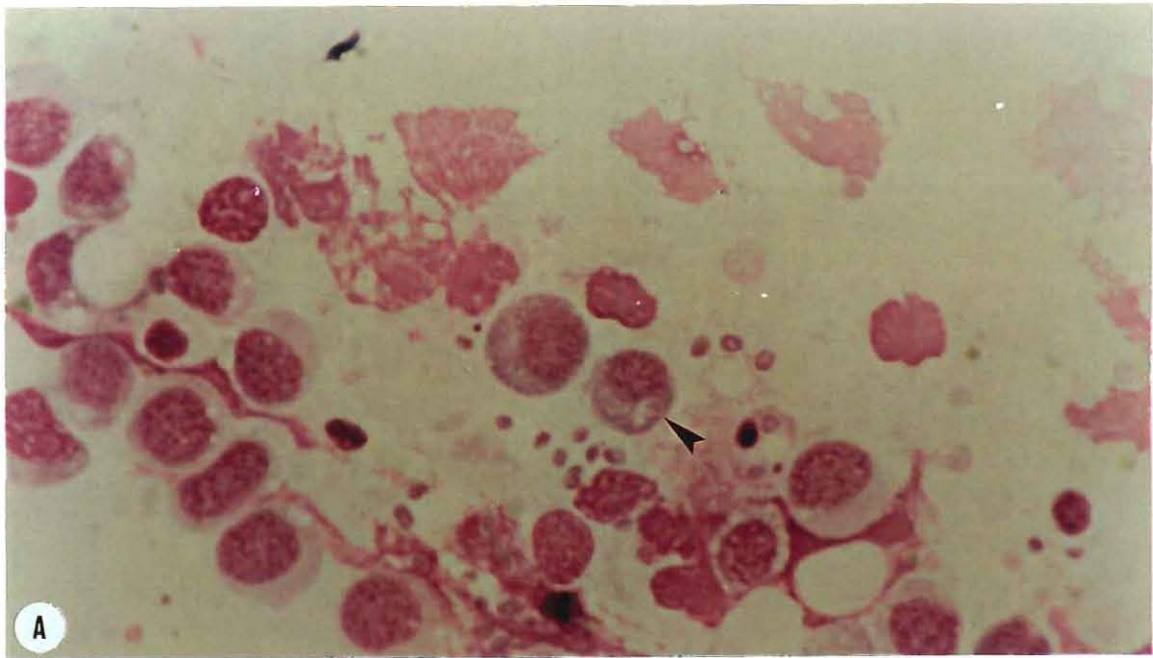
2. CYTOLOGIE COMPARATIVE, *IN VITRO*, DES CULTURES HEMOCYTAIRES PROVENANT D'HUITRES SAINES ET PARASITEES

Les résultats obtenus mettent en évidence des différences nettes du nombre de cellules par puits entre les hémocytes provenant d'animaux sains et les hémocytes provenant d'animaux parasités. Un nombre constant ou croissant de cellules par puits est observé pour le groupe des hémocytes "sains" pendant une période de 15 jours, alors, qu'à partir du deuxième jour de mise en culture, une diminution du nombre de cellules "parasitées" est notée (Figure 38).

Parallèlement, pendant la durée de l'expérience, le dénombrement quotidien des cellules mortes n'excède pas 10% pour les cellules provenant d'animaux sains, alors qu'il peut atteindre 40% pour le groupe de cellules provenant d'animaux parasités (Figure 39).

D'autre part, de manière concomitante, une modification marquée de la formule hémocytaire est observée pour les hémocytes provenant d'animaux parasités. Rapidement, le pourcentage des hémocytes agranuleux diminue, tandis que le pourcentage des cellules granuleuses augmente (Figure 40).

Figure 36. Clichés en microscopie photonique d'hémocytes cytocentrifugés, colorés à l'Hémacolor (x1000). **A.** Petit hyalinocyte infecté (flèche). **B.** Cellules agranuleuses infectées (flèches). **C.** Cellule granuleuse infectée (flèche).



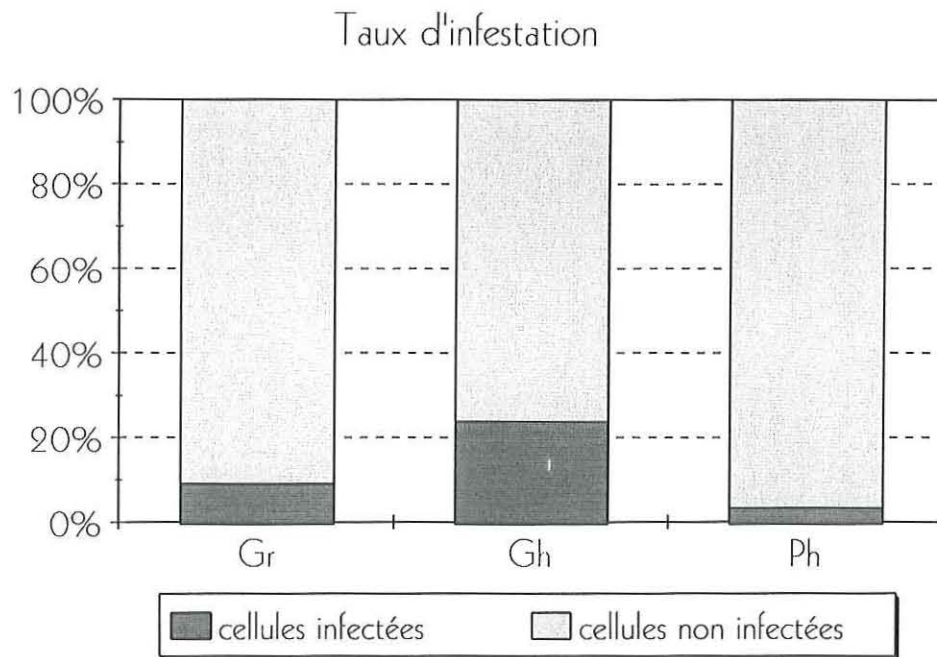
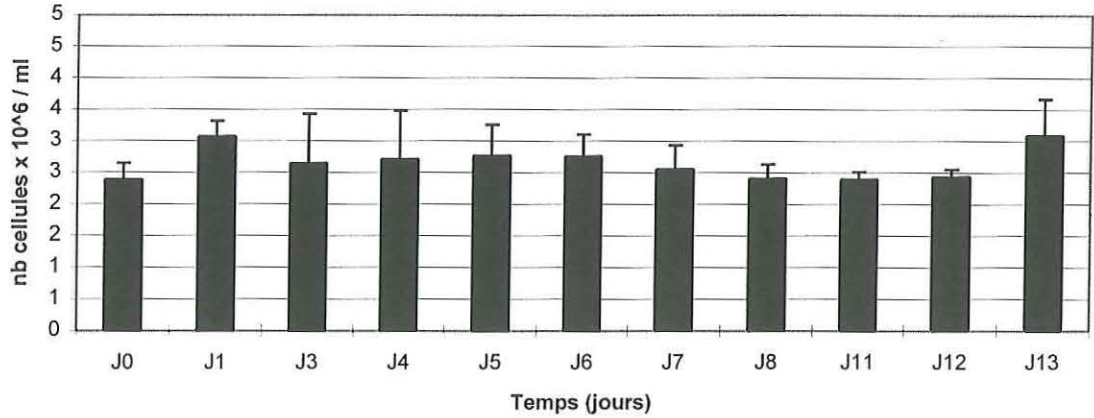


Figure 37. Taux d'infection des trois populations cellulaires définies : granulocytes (Gr), grandes cellules agranuleuses (Gh) et petits hyalinocytes (Ph).

Numération hémocytes provenant d'animaux sains



Numération hémocytes provenant d'animaux parasités

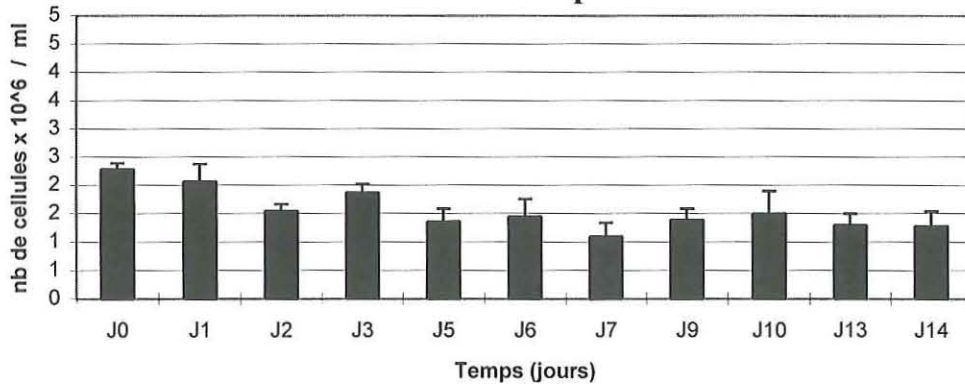


Figure 38. Représentation du suivi quotidien de la numération cellulaire des hémocytes provenant d'animaux parasités, et provenant d'animaux sains.

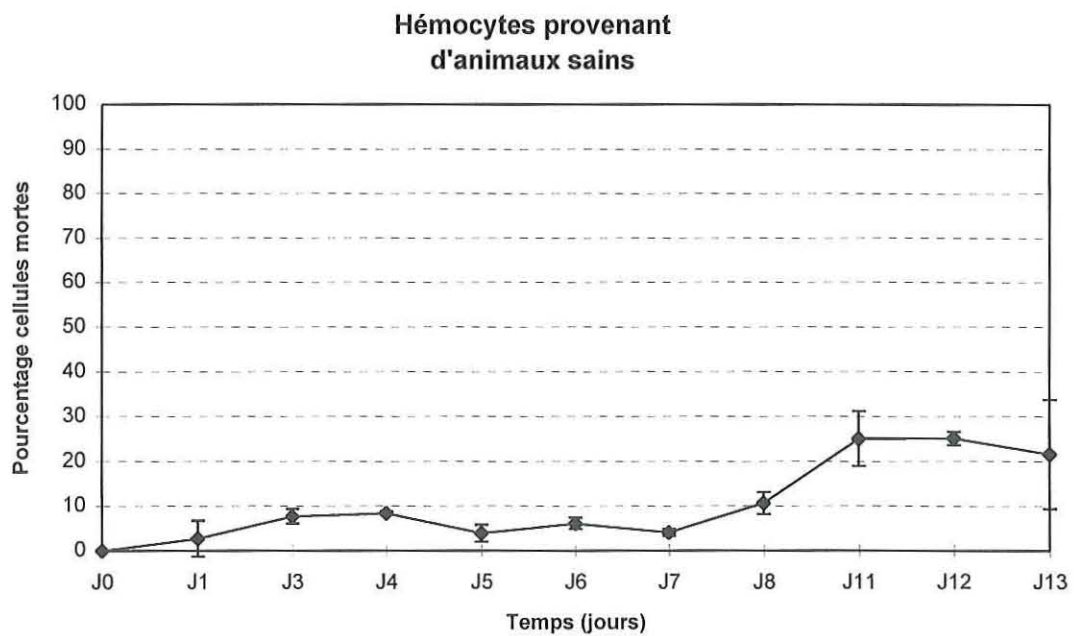
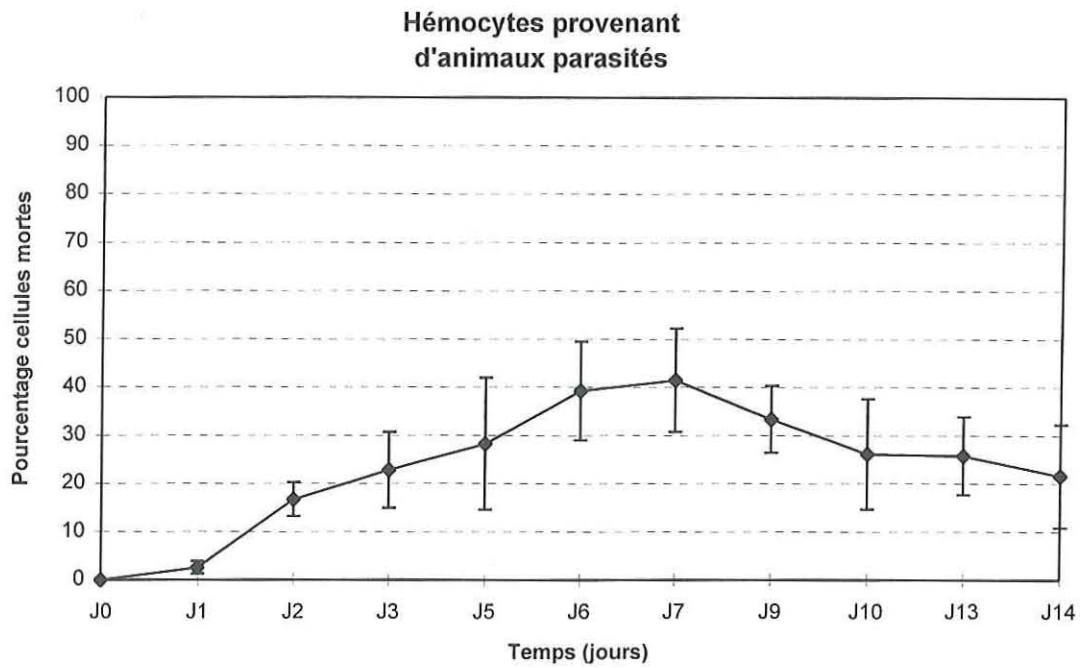


Figure 39. Représentation du suivi quotidien de la mortalité des hémocytes provenant d'animaux parasités, et provenant d'animaux sains.

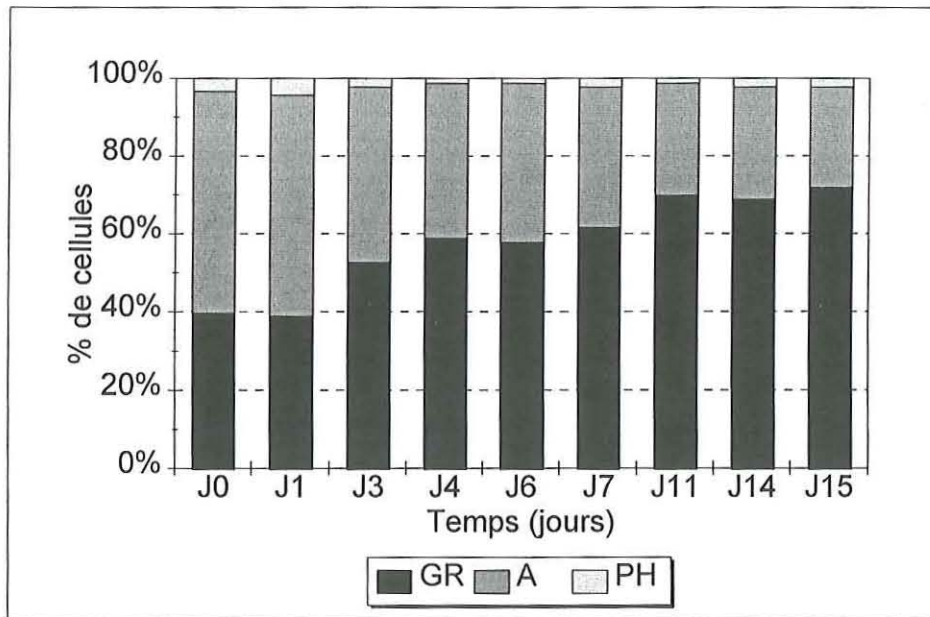
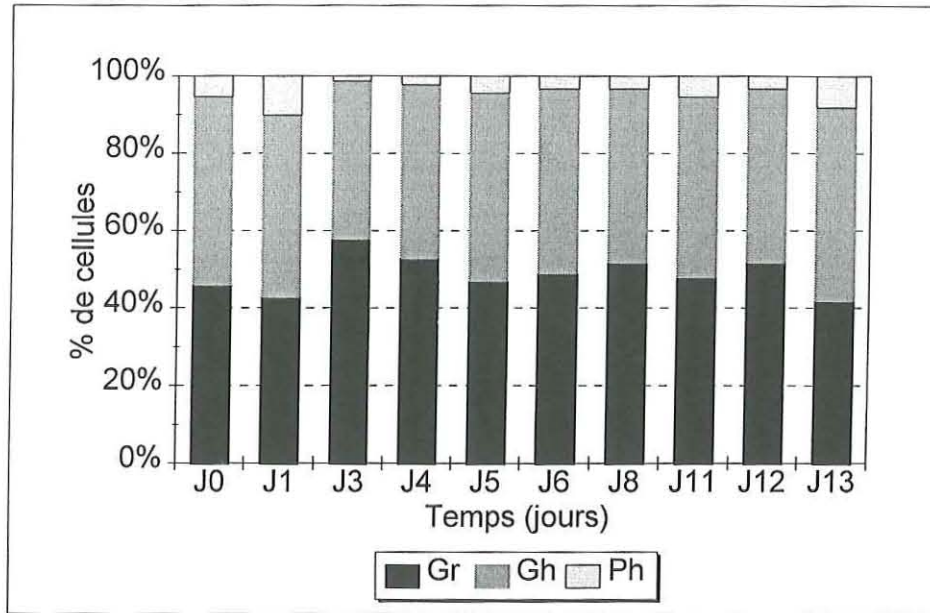


Figure 40. Suivi quotidien de la formule hémocytaire des cellules provenant d'animaux sains : **A** et provenant d'animaux parasités : **B**. Gr : granulocytes ; Gh : grande cellule agranuleuse ; PH : petit hyalinocyte.

Une analyse statistique de la variance à un facteur avec un risque $\alpha = 5\%$ a été effectuée sur la répartition des 3 types cellulaires provenant d'animaux sains et parasités.

L'analyse de variance a révélé une diminution significative, au cours du temps, du pourcentage des cellules agranuleuses parasitées ($p=0.0001$). Par contre, aucune diminution significative n'a été obtenue pour les pourcentages des cellules agranuleuses saines.

Cette analyse a également montré une augmentation significative du pourcentage des cellules granuleuses parasitées ($p=0.0001$).

En outre, bien que le parasite soit présent dans tous les types cellulaires au premier jour de mise en culture, seules les cellules agranuleuses sont trouvées infectées au bout de huit jours d'expérience (Figure 41).

3. ANALYSE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES D'HEMOCYTES PROVENANT D'ANIMAUX PARASITES

3.1. Sur galerie API ZYM

Seize enzymes, au total, ont été détectées dans les hémocytes parasités (Tableau 6). Trois enzymes, l' α -chymotrypsine, l' α -galactosidase et la β -glucosidase n'ont pas été détectées. Les activités de la trypsine, de l' α -glucosidase et de l' α -mannosidase sont révélées à de faibles niveaux (0-5 nanomoles libérées). Parmi les seize activités obtenues, six enzymes, la leucine arylamidase, la valine arylamidase, la phosphatase acide, la phosphatase alcaline, la β -glucuronidase et la β -galactosidase ont montré des activités enzymatiques supérieures à 30 nanomoles libérées. Les autres enzymes ont une activité inférieure à 20 nanomoles libérées.

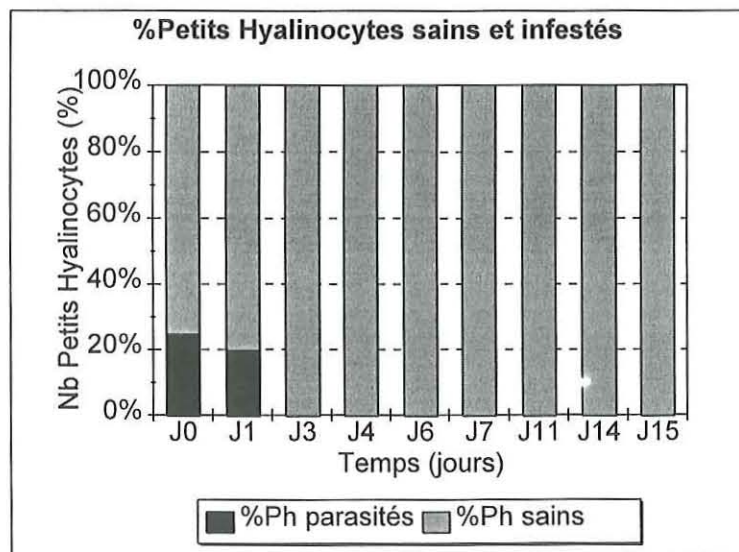
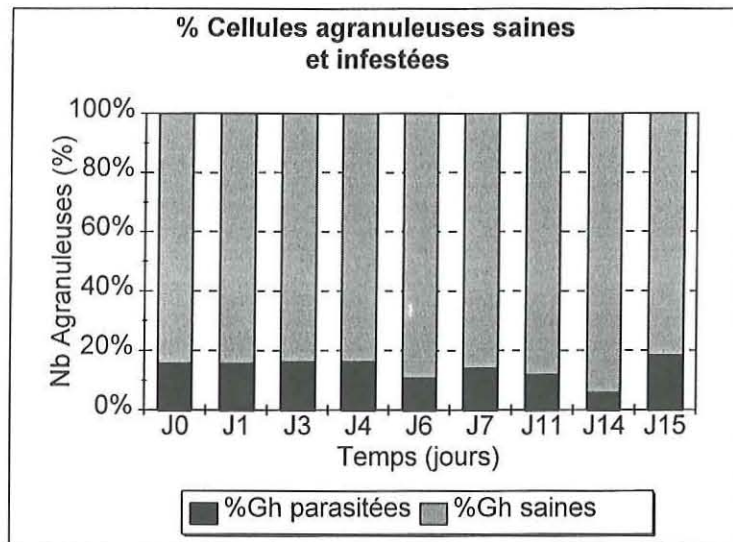
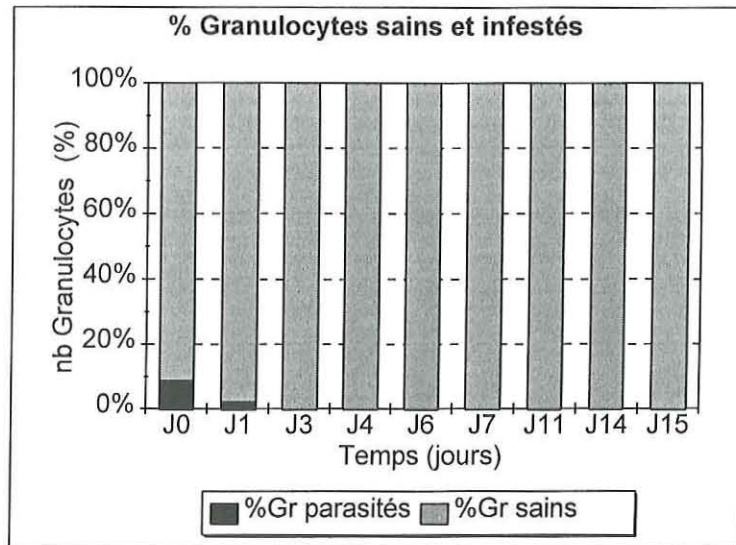


Figure 41. Evolution du taux d'infection des trois types cellulaires.

Enzymes	Hémocytes provenant d'animaux parasités
Phosphatase alcaline	≥ 40
Estérase (C4)	20
Estérase lipase (C8)	10
Lipase (C4)	5
Leucine arylamidase	≥ 40
Valine arylamidase	≥ 40
Cystine arylamidase	20
Trypsine	0-5
α- chymotrypsine	0
Phosphatase acide	30
Naphtol -AS-BI-phosphohydrolase	20
α-galactosidase	0
β-galactosidase	≥ 40
β-glucuronidase	≥ 40
α-glucosidase	0-5
β-glucosidase	0
N-acétyl-β-glucosaminidase	20
α-mannosidase	0-5
α-fucosidase	15

Tableau 6 : Activités enzymatiques détectées dans les hémocytes provenant d'animaux infectés par *Bonamia ostreae*, à l'aide du test APIZYM et estimation du nombre de nanomoles libérées.

3.2. Etude enzymatique des hémocytes parasités

- L'activité de l'enzyme Naphtol AS-D chloroacétate estérase est localisée dans certaines cellules granuleuses parasitées qui apparaissent finement marquées en rouge (Figure 42A). Les cellules agranuleuses parasitées ne sont pas marquées.
- L'activité de l'enzyme β -glucuronidase plus ou moins marquée est localisée dans les granulations des granulocytes infectés. L'activité est visualisée en rouge (Figure 42B). Aucune activité n'est discernée dans les cellules agranuleuses infectées (Figure 42C).
- L'activité de l'enzyme α -naphtyl butyrate estérase se manifeste par un marquage rouge des granulations des cellules granuleuses parasitées (Figure 42D). Aucun marquage n'est observé pour les cellules agranuleuses parasitées (Figure 42E).
- Enfin l'activité de l'enzyme α -naphtyl acétate estérase se manifeste par un marquage brun diffus. La localisation exacte est impossible à déterminer.

Sur préparations de parasites purifiés, cytocentrifugés, les quatres activités recherchées n'ont pas été observées.

3.3. Etude enzymatique ultrastructurale des hémocytes parasités

3.3.1. Recherche de la thiamine

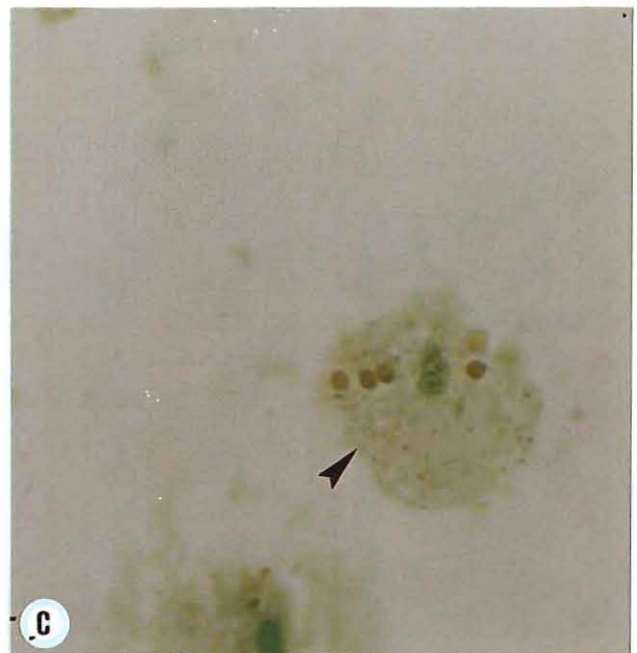
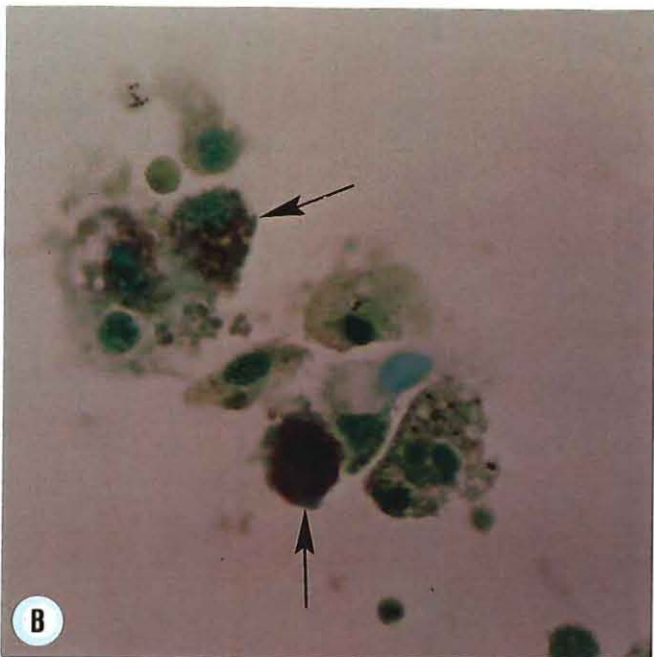
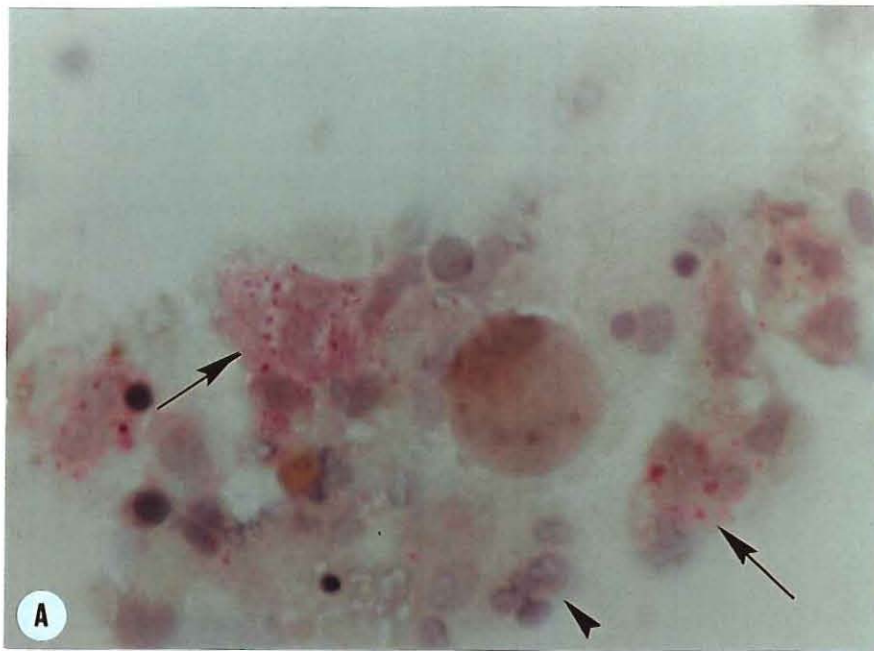
Nous avons noté une forte activité dans quelques granulations. Cette activité est principalement localisée dans la "lumière" de certaines granulations avec une intensité et une répartition irrégulières (Figures 43A, 43C et 43D). La réaction est négative dans les cellules agranuleuses (Figure 43B). Nos résultats ne mettent en évidence aucune activité dans le parasite et dans les cellules agranuleuses parasitées.

Clichés en microscopie photonique (x1000). Marquage d'activités enzymatiques sur hémocytes totaux cytocentrifugés.

Figure 42A . Activité de l'enzyme AS-D-chloroacétate estérase qui se caractérise par un marquage rouge des cellules granuleuses parasitées (flèches). Noter l'absence de marquage sur les cellules agranuleuses parasitées (tête de flèche)

Figures 42B et C. Activité de l'enzyme β -glucuronidase qui correspond à un marquage rouge plus ou moins intense des cellules granuleuses parasitées (flèches). Les cellules agranuleuses parasitées ne sont pas marquées (tête de flèche)

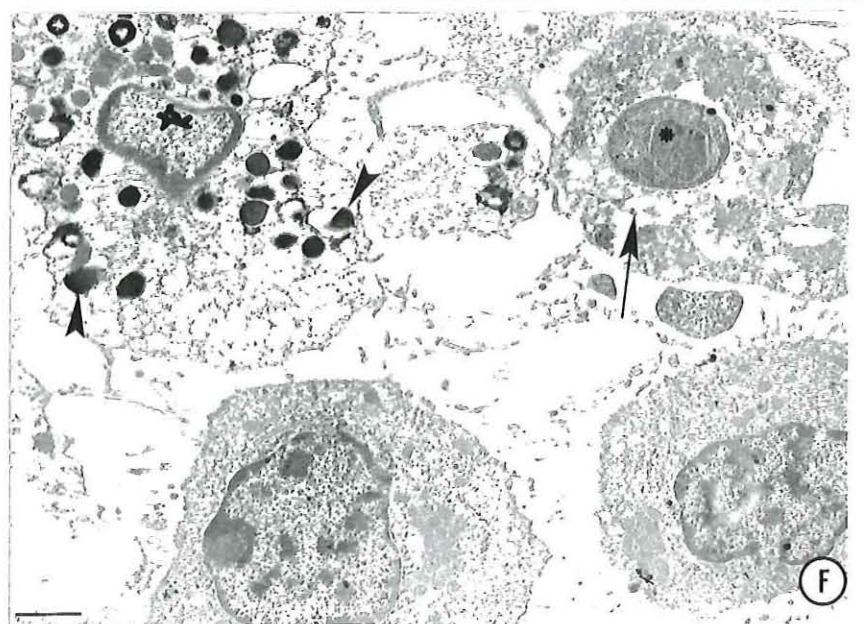
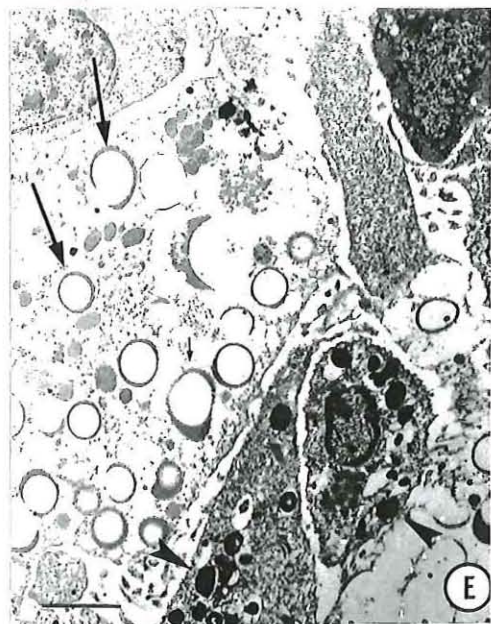
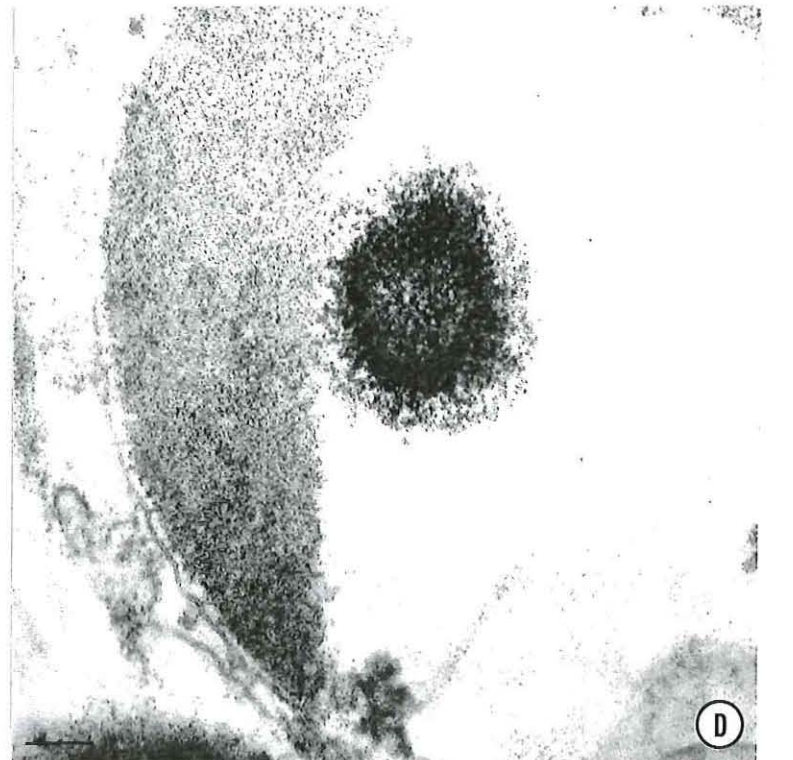
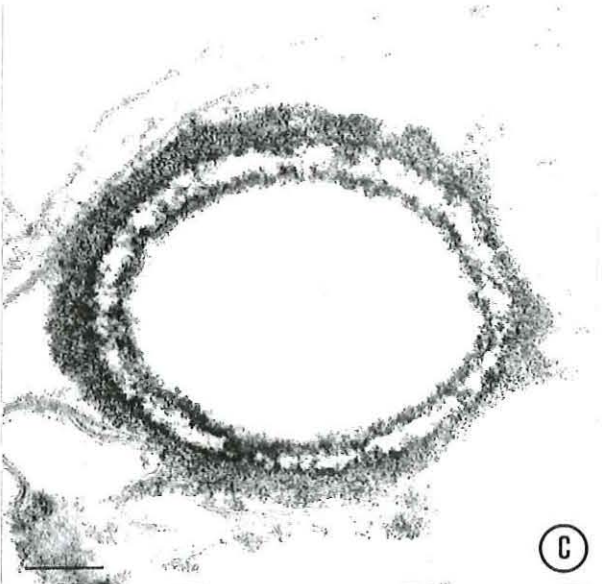
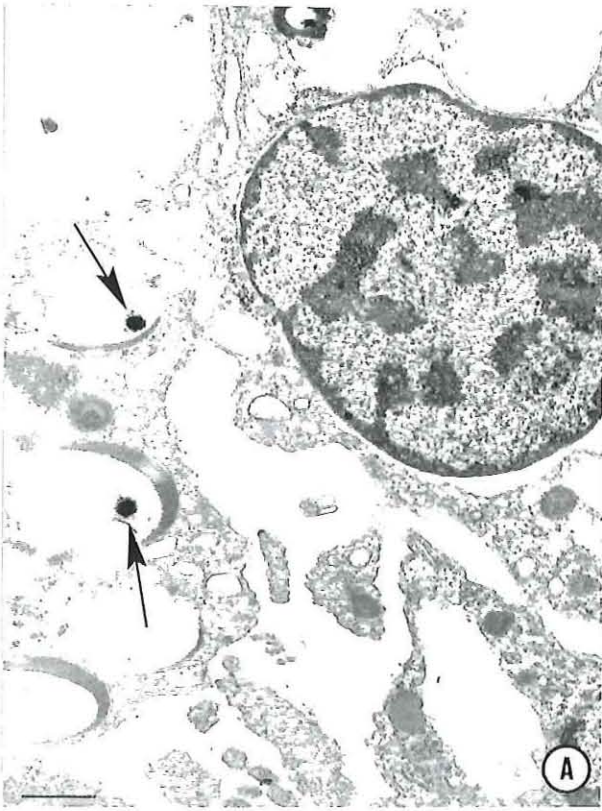
Figures 42D et E. Activité de l'enzyme α -naphtyl butyrate estérase qui se caractérise par un marquage rouge intense des cellules granuleuses parasitées (flèche). Les cellules agranuleuses parasitées ne sont pas marquées (tête de flèche)



Clichés en microscopie électronique à transmission

Figures 43 A à D. Activité de la thiamine. **A.** Marquage dans la lumière de certaines granulations (flèches) (barre=1 μ m). **B.** Absence de marquage sur les hémocytes agranuleux. n : noyau (barre=1 μ m). **C et D.** Marquages à fort grossissement (barre=10nm)

Figures 43 E et F. Activité de la glycérophosphatase. **E.** Marquage de certaines granulations (têtes de flèches). Noter l'absence de marquage sur les granulations "claires" (flèches) (barre=2 μ m). **F.** Marquage des granulations (tête de flèche). Absence de marquage sur les cellules agranuleuses infectées (flèche) (*) *Bonamia ostreae*. (barre=1 μ m)



3.3.2. Recherche de la β -glycerophosphatase

La réaction de l'activité β -glycerophosphatase est positive dans certaines granulations cytoplasmiques des hémocytes granuleux (Figures 43E et 43F). Par contre, chez certaines cellules à « granulations claires », aucune activité n'est observée.

Il faut noter l'absence d'activité hyaloplasmique libre dans les trois types cellulaires, granulocytes, grandes cellules agranuleuses et petits hyalinocytes.

3.3.3. Recherche de la cytidine phosphatase

La présence d'un marquage très fin de la citerne périnucléaire, du réticulum endoplasmique des trois principaux types cellulaires a été mise en évidence lors de la recherche de cytidine phosphatase (Figures 44 B et C). La réaction est également positive dans ces organites pour le parasite *Bonamia ostreae* (Figure 44A). Aucun marquage n'est observé dans les granulations des hémocytes granuleux (Figure 44D).

4. DISCUSSION

4.1. Cytologie comparative, *in vivo*

Ces résultats représentent une première approche pour étudier, *in vivo*, les mécanismes cellulaires de défense impliqués dans la résistance des huîtres plates à la bonamiose. Il est important de rappeler que les mécanismes de défense des mollusques, et en particulier des huîtres plates, sont de type non spécifique, et que les supports de cette immunité cellulaire sont les hémocytes.

Dans cette expérience, la nécessité d'établir un schéma général de nomenclature afin de décrire, d'identifier et de comparer de façon précise les types hémocytaires est pleinement justifiée. Il a été choisi, pour ce travail, de classer les différents types hémocytaires en fonction de la morphologie des cellules, de leur forme et de leur affinité tinctoriale sur la base de préparations cyto centrifugées observées en microscopie photonique. Comme il a été vu précédemment, cette technique met bien

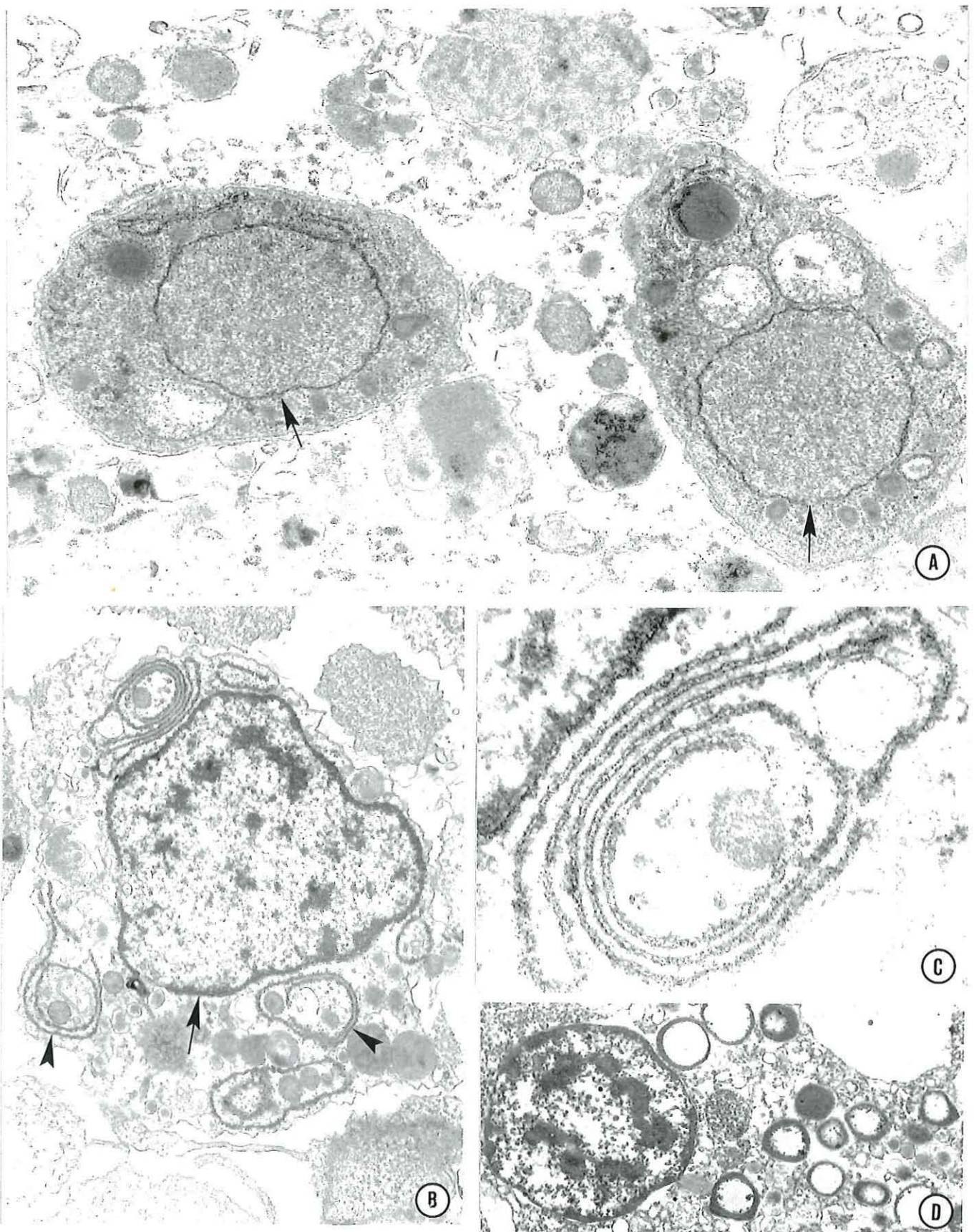


Figure 44. Clichés en microscopie électronique à transmission. Mise en évidence de l'activité de la cytidine monophosphatase. A. Marquage au niveau de la citerne périnucléaire des parasites (flèches) (barre=500nm). B. Marquage au niveau de la citerne périnucléaire (flèche), du réticulum endoplasmique (tête de flèche) d'un hémocyte agranuleux (barre=1 μ m). C. Détail du réticulum endoplasmique marqué (barre=200nm). D. Absence de marquage dans les granulations des hémocytes granuleux (barre=1 μ m)

en évidence les différences morphologiques entre les cellules, et permet aisément d'identifier les trois types cellulaires décrits : les granulocytes, les grandes cellules agranuleuses et les petits hyalinocytes. Cependant, une certaine variabilité des observations, en particulier au sein du groupe des petits hyalinocytes, et la lourdeur des analyses en microscopie photonique soulignent la nécessité de développer d'autres outils d'identification. En particulier, les premiers résultats encourageants obtenus en cytométrie de flux doivent être poursuivis. En effet, il n'est pas possible pour l'instant de discriminer très clairement les trois populations hémyocytaires. Cependant, un profil général associé à un état de résistance des animaux, vis-à-vis de la bonamiose, semble émerger de ces analyses. La réalisation rapide des comptages en cytométrie de flux, par rapport à la lourdeur des analyses en microscopie photonique, va désormais autoriser l'analyse d'un nombre beaucoup plus important d'individus. En outre, la disponibilité prochaine d'anticorps monoclonaux spécifiques des populations granuleuses, permettra de localiser précisément ce type cellulaire sur les profils obtenus. Il sera alors possible d'en déduire sa représentativité au sein des populations totales.

Ces réactifs devraient permettre la réalisation de tris cellulaires automatisés et de définir ainsi un profil spécifique d'une population présentant un statut de résistance ou de sensibilité à la bonamiose.

Cette étude ne prend en compte que les cellules circulantes. Feng (1965) considère que les cellules circulantes représentent une estimation exacte de la population hémyocyttaire totale. Cependant, les huîtres possèdent un système circulatoire semi-ouvert où circule librement l'hémolymphe (Adema *et al.*, 1991). De ce fait, les hémocytes peuvent être trouvés à différentes localisations dans le système circulatoire, mais également dans les tissus. Des études ont montré une influence de la température, de la taille des animaux, de facteurs génétiques sur le volume de l'hémolymphe ainsi que sur le nombre d'hémocytes circulants présents. Cependant l'importance de chacun de ces facteurs n'a pas été clairement définie (Cheng, 1988 ; Adema *et al.*, 1991 ; Oubella *et al.*, 1993 ; Anderson *et al.*, 1995).

Dans le cas de notre étude, quelques facteurs n'ont pas pu être contrôlés, comme par exemple la température pendant les 7 mois d'expérimentation, et les effets "bac". Cependant, l'origine des huîtres (elles proviennent toutes d'un nombre réduit de géniteurs), l'homogénéité de leur taille et les conditions similaires de production et d'élevage permettent de limiter les variations dues à ces différents paramètres.

Les résultats obtenus indiquent que le statut de résistance est associé à une réduction du nombre de cellules circulantes. Toutefois, le calcul de l'intervalle de confiance à 95% ne permet pas de définir un intervalle strict pour chaque groupe de populations, sensibles ou résistantes. La numération cellulaire n'est pas un indicateur suffisant pour déterminer l'appartenance d'un individu à un groupe possédant un statut de résistance.

Peu d'études sont disponibles sur le nombre et le pourcentage des types hémycytaires présents chez les différentes espèces de mollusques bivalves marins. En outre, la littérature fait état d'une certaine variabilité entre les différentes populations au sein d'une même espèce et entre différentes espèces (Renwranz *et al.*, 1979 ; Cheng, 1988). Les données sont parfois fragmentaires, contradictoires et portent souvent sur un nombre réduit d'individus. Certains auteurs mentionnent une population de cellules granuleuses majoritaires, alors que d'autres considèrent que la population des hyalinocytes est la plus représentée.

Si la formule hémytaire des mollusques semble variable, l'étude morphologique des hémycytes suggère des fonctions cellulaires différentes (Huffman et Tripp, 1982 ; Olafsen, 1986 ; Oliver et Fisher, 1995). C'est sur cette base qu'a été recherchée l'existence d'une association entre le statut de résistance à la bonamiose et la formule hémytaire des animaux.

Les résultats obtenus désignent une formule hémytaire caractéristique pour chacune des populations sensibles ou résistantes. Ces résultats sont d'autant plus encourageants qu'ils pourraient contribuer à l'élaboration d'un test précoce du niveau de résistance à la bonamiose, même sans contact préalable avec le parasite. Pour

l'instant, les programmes de sélection ne peuvent mesurer le niveau de résistance individuel des huîtres testées. Leur survie est observée après confrontation des huîtres à tester avec le parasite par culture en milieu naturel fortement infecté pendant un nombre suffisant d'années (cycles d'au moins 4 ans) ou par inoculation individuelle (cycles d'au moins 3 ans). Un test précoce non destructif permettrait de ramener la durée du cycle de sélection à 2 voire un an.

Il existe une association significative entre la formule hémodocytaire et le statut de résistance à la bonamiose. Une des hypothèses est que la réduction du nombre des grandes cellules agranuleuses soit le résultat de la sélection des huîtres plates vis à vis du parasite *B. ostreae*. Comme le rapporte Hine et Wesney (1994), ce type cellulaire semble apparaître comme la cellule cible privilégiée d'un parasite du même genre, *Bonamia* sp. décrit chez l'huître *Tiostrea chilensis*.

Cependant, il semble nécessaire d'analyser les formules hémodocytaires d'animaux moribonds infectés par le parasite pour vérifier cette hypothèse. Les résultats devront également être confirmés, si possible, par l'analyse de la cinétique des formules hémodocytaires au cours du temps, pour des animaux parasités. Cependant, ces expériences nécessitent la mise au point de méthodes de prélèvement de l'hémolymphe, sans destruction de l'animal.

Les résultats de ce travail montrent en outre un plus grand nombre de parasites dans les grandes cellules agranuleuses que dans les autres types cellulaires.

Tous ces résultats suggèrent que les animaux ne sont pas en fait résistants, mais plutôt tolérants à l'infection. Cette tolérance correspondrait à un décalage de l'installation de l'infection ; ceci pouvant s'expliquer par une probabilité moindre pour le parasite de rencontrer une cellule agranuleuse, de s'y multiplier, et d'entraîner à terme la mort de l'animal.

4.2. Cytologie comparative, *in vitro*

Sur la base du protocole de primoculture mis au point, il a été envisagé dans un premier temps de réaliser des infections expérimentales des hémocytes *in vitro* afin d'étudier la cinétique de développement du parasite sur des populations cellulaires totales ou séparées. Cependant, les huîtres utilisées dans cette étude étant fortement infectées, il nous est apparu intéressant de vérifier *in vitro* le comptage différentiel cellulaire entre des hémocytes provenant d'animaux sains et des hémocytes provenant d'animaux parasités.

Les animaux sains sont diagnostiqués par observation d'empreintes tissulaires au microscope photonique. Cette technique rapide est utilisée à l'heure actuelle pour diagnostiquer le parasite *Bonamia ostreae*. Cependant, nous ne pouvons affirmer avec certitude que les animaux sains le soient réellement. Il reste envisageable que des animaux faiblement infectés puissent être diagnostiqués négatifs.

Les résultats obtenus permettent tout d'abord de valider le choix du milieu de culture pour le maintien en survie des hémocytes pendant plus d'une dizaine de jours. Ces résultats ont permis de suivre, d'une part la fluctuation du nombre de cellules par puits, entre les cellules saines et les cellules parasitées, et d'autre part l'évolution de la répartition des trois types cellulaires, pendant une durée de quinze jours, pour les deux populations hémocytaires saines et parasitées, par comptage associé à l'identification cytologique des différents types cellulaires présents.

Les résultats des hémogrammes montrent que les hémocytes sains ont la même formule cellulaire au cours du temps. Les pourcentages de cellules agranuleuses, de granulocytes et de petits hyalinocytes restent constants pendant une période de culture de dix jours. Par contre, ces pourcentages pour les cellules provenant d'animaux parasités varient nettement à partir du troisième jour de mise en culture. Il apparaît une diminution importante du pourcentage de cellules agranuleuses et une augmentation du pourcentage de granulocytes. Cette modification du comptage différentiel cellulaire peut s'expliquer soit par une augmentation réelle du nombre de granulocytes, soit par un phénomène de compensation de la diminution des cellules agranuleuses. Il semble que la seconde hypothèse soit la plus probable, puisque la numération cellulaire n'a

pas permis d'observer d'augmentation nette du nombre total d'hémocytes parasités par puits, pendant la durée de l'expérience.

En outre, aux premiers jours de mise en culture, le comptage différentiel des hémocytes provenant d'animaux sains et des hémocytes provenant d'animaux parasités était similaire. Une hypothèse est que le pourcentage des cellules parasitées devait être relativement faible, ou à un stade précoce d'infection. La proximité des cellules dans les puits en culture facilite le développement du parasite dans ce système expérimental.

Il serait important de travailler sur populations hémocytaires séparées pour vérifier les résultats obtenus, et notamment la diminution du nombre de cellules agranuleuses. Des études, à partir d'huîtres ayant des degrés d'infection connus et définis, permettront de compléter ces expériences.

Ces résultats obtenus *in vitro* semblent refléter la situation *in vivo*. Ils renforcent en effet l'hypothèse que le parasite est plus apte à survivre dans les grandes cellules agranuleuses.

Ces résultats sont en désaccord avec ceux rapportés par Mourton *et al.* (1992) qui ont décrit la population granuleuse comme majoritairement infectée. Le système de maintien en survie des cellules sur lames, rapporté par ces auteurs, ne permet pas une étude prolongée du devenir intracellulaire du parasite au cours du temps. En outre, ce système de maintien en survie des cellules sur lames a pu entraîner une sélection de certains types hémocytaires, en raison de leur capacité différente d'adhérence sur ce support. En effet, Hervio (1992) rapporte que certains hémocytes, et notamment les hémocytes parasités ont tendance à se détacher du support et de ce fait sont perdus au cours des étapes de fixation et coloration des lames avant leur observation, entraînant ainsi un biais dans l'évaluation des types hémocytaires présents. Ceci pourrait expliquer les résultats contradictoires de Mourton *et al.* (1992).

4.3. Caractérisation fonctionnelle des hémocytes parasitées

En complément de ces études, l'analyse des activités enzymatiques renforcent cette hypothèse.

Les résultats obtenus à l'aide des galeries API ZYM ont montré des différences entre les hémocytes provenant d'animaux sains et les hémocytes provenant d'animaux parasités. En particulier, trois activités, celles de la phosphatase alcaline, la naphthol-AS-BI-phosphohydrolase et la β glucuronidase, sont quantitativement plus importantes pour les hémocytes totaux provenant d'animaux parasités. Ceci peut être en partie dû à l'activité enzymatique propre du parasite *Bonamia ostreae*. En effet, ce type d'identification enzymatique a été réalisé sur le parasite *B. ostreae* purifié (Hervio, 1992). Neuf activités ont été alors détectées. Ainsi, il a été montré que la phosphatase acide, la phosphatase alcaline et l'estérase correspondent aux activités les plus importantes. Nos résultats concernant l'activité de la phosphatase alcaline dans les cellules provenant d'animaux parasités peuvent aussi correspondre à l'activité enzymatique des cellules hôtes stimulées par la présence du parasite.

Noël (1992) rapporte treize activités enzymatiques dans des hémocytes quiescents de la moule *Mytilus edulis* dont celles de la naphthol-AS-BI-phosphohydrolase et de la β -glucuronidase. Cet auteur mentionne que les activités de ces deux enzymes sont relativement faibles, de l'ordre de 10 nanomoles libérées. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour les hémocytes provenant d'animaux sains. Cependant, ces données sont à utiliser avec précaution, car des variations interspécifiques peuvent être observées. Toutefois, au vue des résultats obtenus, il semble probable que l'augmentation de l'activité des enzymes Naphtol AS-BI phosphohydrolase et β -glucuronidase dans la population parasitée, reflète une activation des cellules parasitées en réponse à l'infection par *Bonamia ostreae* avec accumulation intracytoplasmique d'enzymes.

Une activité importante de la β -glucuronidase a d'ailleurs été localisée en microscopie photonique dans les granulations des cellules granuleuses parasités. Cette activité a été également décrite dans les granulations des hémocytes de la palourde, *Ruditapes decussatus*, associée à un rôle de dégradation de matériels phagocytés (Lopez Gomez, 1995). La présence de cette enzyme dans les cellules provenant d'animaux infectés, et dans les granulocytes en particulier, peut laisser suspecter une activité élevée de dégradation post-phagocytaire de ce type cellulaire en réponse à l'internalisation du parasite.

Jusqu'alors les recherches d'activités enzymatiques avaient été essentiellement menées sur hémocytes sains, sans tenir compte des modifications associées à la présence du parasite. En outre, il est intéressant de noter que le métabolisme oxydatif des hémocytes d' *Ostrea edulis* ne semble pas impliqué dans les réactions de défense de l'hôte vis-à-vis du parasite *Bonamia ostreae* (Hervio *et al.*, 1989 ; Bachère *et al.*, 1991a). Ces données renforcent l'intérêt d'étudier les productions d'enzymes intracellulaires pouvant être impliqués dans les phénomènes de dégradation post-phagocytaire.

Les résultats obtenus en microscopie photonique et en microscopie électronique montrent qu'il est possible de détecter un plus grand nombre d'activités enzymatiques dans les cellules granuleuses provenant d'animaux infectés. En particulier, ce type cellulaire est particulièrement riche en hydrolases. Cette présence d'activité confirme les données établies pour les granulocytes de l'huître *Tiostrea lutaria* infecté par *Bonamia sp.* (Hine et Wesney, 1995).

De même, l'équipement enzymatique réduit des cellules agranuleuses infectées est en accord avec les résultats obtenus par Hine and Wesney (1995) pour les hémocytes agranuleux parasités de *T. lutaria*. Une interprétation possible est que l'équipement enzymatique réduit puisse être associé à une incapacité ou à une capacité réduite de destruction du parasite *Bonamia ostreae* après phagocytose.

Conclusion générale
Perspectives

CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES

Le travail réalisé dans cette étude a été entrepris dans une triple perspective, d'une part, contribuer à une meilleure connaissance du parasite *Bonamia ostreae* pour lequel les données sont essentiellement morphologiques et épidémiologiques, d'autre part, contribuer à l'analyse des constituants du système de défense de l'huître plate, *Ostrea edulis*, dans le modèle d'étude hémocyte-*Bonamia ostreae*, et enfin contribuer à la compréhension des mécanismes par lesquels le protozoaire s'établit dans l'hôte et induit la maladie.

Cette approche représente une analyse simultanée des différents compartiments de ce modèle de parasitisme intracellulaire. Elle a été inspirée par les recherches effectuées en médecine humaine sur des protozoaires parasites intracellulaires tels que *Leishmania donovani* ou *Toxoplasma gondii*, capables de survivre dans des macrophages. Les axes de recherche développés au cours de cette étude ont été liés à la disponibilité et la définition de méthodologies adaptées.

La première partie de ce travail a été focalisée sur le parasite lui-même, indépendamment de son hôte. Il était en effet primordial de le caractériser de façon précise afin de comprendre les stratégies qu'il utilise pour s'établir dans les cellules de son hôte *Ostrea edulis*. Les protéines constitutives du parasite ont été caractérisées. Ce type de caractérisation est largement utilisé en protistologie et en pathologie infectieuse. Toutefois, des études complémentaires devront être réalisées par l'identification d'isoenzymes qui sont utiles en taxonomie des parasites protozoaires de Vertébrés.

Les analyses entreprises ont permis également de mettre en évidence des glycoprotéines à la surface des parasites, mais également à la surface des hémocytes suggérant des interactions de type récepteur-ligand dans les processus de reconnaissance et d'internalisation du parasite par les hémocytes. Les récepteurs et les ligands qui sont impliqués restent à définir et à étudier.

Dans cette optique, les anticorps préparés, en particulier ceux dirigés contre la protéine de 44 kDa semble présenter un intérêt certain. Des essais d'inhibition du

processus d'internalisation sont à envisager d'autant qu'à l'issue de cette étude nous disposons d'un système d'étude *in vitro*.

D'une manière plus générale, les signatures électrophorétiques, antigéniques et moléculaires de *B. ostreae*, définies au cours de ce travail, vont permettre de compléter les critères morphologiques qui étaient, à l'heure actuelle, les seules bases de comparaisons taxonomiques.

Les réactifs et les méthodes mis au point ont été appliqués à la comparaison avec un parasite intracellulaire décrit chez l'huître chinoise, *Crassostrea rivularis*. Les résultats obtenus ont permis de classer ce parasite dans le genre *Bonamia*. Ils sont d'autant plus intéressants qu'ils remettent en cause la spécificité stricte de parasites du genre *Bonamia* pour les huîtres appartenant au genre *Ostrea*.

Ces réactifs pourront être également étendus au diagnostic. Notamment la séquence du gène codant pour la petite sous unité de l'ARN ribosomal (18S) va permettre de dessiner des amorces spécifiques de ce parasite et ainsi développer une technique de diagnostic par PCR.

Dans la connaissance du système de défense de l'huître plate, *Ostrea edulis*, et dans la compréhension des mécanismes cellulaires de défense, les ouvertures de ce travail sont certainement les plus nombreuses. Les bases expérimentales et méthodologiques qui ont été établies au cours de ce travail, notamment la séparation des différents types hémocytaires et le système d'étude, *in vitro*, permettront une poursuite efficace des études concernant les interactions parasite-hémocyte.

D'autres travaux devront cependant être dévolus à l'immunoséparation des hémocytes. Il est en effet primordial de séparer ces populations pour préciser leurs fonctions, mais aussi pour étudier la filiation des populations hémocytaires qui jusqu'à présent reste inconnue. L'importance des progrès réalisés dans le domaine de la culture, *in vitro*, de cellules de mollusques apparaît primordiale.

A l'échelle de l'immunologie des mollusques, il faut noter le caractère original de ces travaux qui sont susceptibles de déboucher sur des applications dans le domaine de la génétique et notamment dans la sélection quantitative de populations résistantes au parasite *B. ostreae*. En effet, l'identification de paramètres biologiques quantifiables (par exemple la formule hémocytaire) caractéristiques d'un état de résistance, pourra servir de marqueur de résistance dans le programme de sélection actuellement mené à l'IFREMER de la Tremblade.

En outre, les résultats obtenus permettent d'émettre plusieurs hypothèses pour expliquer le tropisme marqué du parasite *Bonamia ostreae* pour les cellules agranuleuses :

- les parasites se lient sur des molécules de la membrane plasmique des cellules agranuleuses principalement exprimées par ces cellules,
- le processus de phagocytose de ces parasites est plus efficace pour les cellules agranuleuses,
- les cellules agranuleuses possèdent un milieu intracytoplasmique favorable à la survie et à la multiplication des parasites.

Les deux autres types cellulaires, les cellules granuleuses et les petits hyalinocytes sont également parasités par le parasite, mais leur survie et/ou leur multiplication dans ces dernières semblent très limitées.

L'étude des enzymes lysosomales dans les hémocytes sains et infectés apportent une ébauche d'explication à ce tropisme. En effet, les parasites sembleraient plus aptes à se multiplier dans les cellules agranuleuses du fait d'un équipement enzymatique réduit. En conséquence, ces cellules posséderaient une capacité moindre voire une incapacité à détruire les parasites après phagocytose.

Des analyses des phénomènes de cytotoxicité ont montré que le parasite ne déclenchait pas l'activation métabolique respiratoire des hémocytes (Chagot, 1989). Une des hypothèses émises par cet auteur était que le parasite était capable d'inhiber la production de radicaux libres de l'oxygène. De ce fait, il évitait les conséquences létales des phénomènes post-phagocytaires et notamment la fusion des lysosomes avec

le phagosome. Nos résultats apportent une autre explication : les parasites ne semblent pas survivre à l'environnement lysosomal en réduisant l'activité et/ou la quantité des hydrolases acides de la cellule hôte, mais ils se multiplient dans des cellules dont les activités enzymatiques sont réduites.

Pour comprendre les stratégies développées par le parasite *Bonamia ostreae* pour échapper ou résister aux mécanismes de défense de l'hôte l'huître plate *O. edulis* de nombreux travaux restent à réaliser. En particulier, l'étude des différentes étapes de reconnaissance et d'internalisation du parasite sont indispensables. La compréhension des mécanismes post-phagocytaires devra être approfondie en tenant compte des différents compartiments intracellulaires de la cellule hôte et notamment de la vacuole parasitophore. La connaissance de ces compartiments semble une étape clé dans la compréhension des mécanismes d'installation et de développement du parasite.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- ABDUL-SALAM J.M. and MICKELSON E.H., 1980.** *Biomphalaria glabrata* amoebocytes : effect of *Schistosoma mansoni* infection on in vitro phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.*, 35,241.
- ADEMA C.M., VAN DER KNAAP W.P.W. and SMINIA T. 1991.** Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity : the role of reactive oxygen intermediates. *R. Aquat. Sc*; 4(2) : 201-223.
- ADEMA C.M., VAN DEUTEKOM-MULDER E.C., VAN DER KNAAP W.P.W., MEULEMAN E.A. and SIMIA T., 1991.** Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.*, 15 : 17-26.
- ADLARD R.D. and LESTER R.J.G. 1995.** Development of a diagnostic test for *Mikrocytos roughleyi*, the aetiological agent of Australian winter mortality of the commercial rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley). *J. Fish diseases*. 18 : 609-614
- ALEXANDER J. and RUSSEL D.G., 1985.** Parasite antigens, their role in protection, diagnosis and escape : the leishmaniasis. *Corr. Top. Microbiol. Immunol.*, 120 : 43-67.
- ALVAREZ M.R., FRIEDL F.E., and ROMAN F.R. 1995.** *In vivo* chemoactivation of oyster hemocytes induced by bacterial secretion products. *J. Invertebr. Pathol* 66:287-292.
- ANDERSON R.S., 1977.** Biochemistry and physiology of Invertebrate macrophages *in vitro* in L.A. Bulla and T.C. Cheng (eds), « Comparative Pathology », Plenum New York/London, 3 : 1-20.
- ANDERSON R.S., OLIVER L., and JACOBS D. 1992.** Immunotoxicity of cadmium for the eastern oyster (*Crassostrea virginica* [GMELIN,1791]) : effects on hemocyte chemiluminescence. *J. Shellfish Res.* 11:31-35.
- ANDERSON R.S., PAYNTER K.T., and BURRESON E.M. 1992.** Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected by *Perkinsus marinus*. *Biol. Bull.* 476-481.
- ANDERSON, R.S., ADLARD, R.D., and LESTER R.J.G. 1995.** Molecular diagnosis of *Marteilia sydneyi* (Paramyxia) in Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis* (Angas). *J. Fish disease*. 18 : 507-510.
- ANDERSON R.S., BURRESON E.M. and PAYNTER K.T. 1995.** Defense responses of hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *J. Invertebr. Pathol.* 66 : 82-89.

- ANTONA M., 1993.** Données économiques sur la conchyliculture française. In Coquillages, ed. par Informations Techniques des Services Vétérinaires Français, 129-133.
- ARROWOOD M. J. and STERLING C.R., 1987.** Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. J. Protozool., 73 : 314-319.
- AUFFRET M., 1985.** Morphologie comparative des types hémoctaires chez quelques Mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse Doctorat de spécialité en Océanographie, Univ. Bret. Occ. Brest, 153 pp.
- AUFFRET, M., 1988.** Bivalve hemocyte morphology. Am. Fish Soc. Sp. Pub., 18 : 169-177.
- BACHERE E., CHAGOT D. and GRIZEL H., 1988.** Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. Dev. Comp. Immunol., 12 : 549-559.
- BACHERE E., HERVIO D., MIALHE E. and GRIZEL H., 1990.** Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. Dev. comp. Immunol. 14 : 261-268.
- BACHERE E., HERVIO D. and MIALHE E., 1991 a.** Luminol dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Org., 11 : 173-180.
- BADWEY J.A. and KARNOSKY M.L., 1988.** Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. Ann. Rev. Bioch. 49 : 695-726.
- BANG F.B., 1961.** Reaction of injury in the oyster (*Crassostrea virginica*). Biol. Bull., 121 : 57-68.
- BANNISTER C. and KEY D. 1982.** *Bonamia*, a new threat to the native oyster fishery. Fish. Not., MAFF direct. Fish. Res. Lowestoft, 9pp.
- 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., 1968.** Molluscan organ culture. Malacological Review 1 : 125-135.
- BECKMANN N., MORSE M., and MOORE C.M. 1992.** Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. J. Invertebr. Pathol 59:124-132.
- BOUGRIER S., TIGE G., BACHERE E. and GRIZEL H., 1986.** *Ostrea angasi* acclimatization to french coasts. Aquaculture, 58 : 151-154.

- BOULO V., MIALHE E., ROGIER H., PAOLUCCI F. and GRIZEL H., 1989.** Immunodiagnosis of *Bonamia ostreae* (Acetospora) infection of *Ostrea edulis* L. and subcellular identification of epitopes by monoclonal antibodies. *J. Fish dis.* 12 : 257-262.
- BRAY R.S., 1983.** Attachment and uptake of promastigotes to and by macrophages *in vitro*. *J. Protozool.*, 30 : 221-223.
- BRERETON J.D. and ALDERMAN D.J., 1979.** Wound healing in the european oyster, *Ostrea edulis* L. *Aquaculture*, 16 : 147-151.
- BRILLOUET C., DELAMOTTE F., LUQUET G., KADER J.C., BINAGHI R.A. et LECLERC M., 1985.** Mise en évidence et purification d'un facteur de type anticorps chez l'étoile de mer *Asterias rubens* (L.). *Symbioses*, 2(2) : 99-115.
- CACERES-MARTINEZ J., ROBLEDO J.A.F., and FIGUERAS A. 1995.** Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth rates and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ria de Vigo, Galicia (NW Spain). *Aquaculture* 15-23.
- CHAGOT D., 1989.** Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Acetospora). Thèse EPHE Sciences de la Vie et de la Terre. Univ. Montpellier.
- CHAGOT D., BOULO V., HERVIO D., MIALHE E., MOURTON C. and GRIZEL, H. 1992.** Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa : Acetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca : Bivalvia) : entry mechanisms. *J. Invertebr. Pathol.* 51 : 207-214.
- CHANG K.P., NACY C.A. and PEARSON R.D., 1986.** Intracellular parasitism of macrophages in Leishmaniasis : *in vitro* systems and their applications. In Sabato G. and Everse J. (eds). "Methods in enzymology". Academic Press, New-York, 132 : 603-626.
- CHENG T.C., 1983.** The role of lysosomes in molluscan inflammation. *Ann. Zool.* 23 : 129-144.
- CHENG T.C., 1988.** *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica* : Total and differential cell counts. *J. Invertebr. Pathol* 51:207-214.
- CHENG T.C., 1989.** Bivalves. In *Invertebrate blood cells*. Anonymous N.A. Ratcliff and A.F. Rowley eds. London. 233-301.
- CHEN J. and BAYNE C. 1994.** The roles of carbohydrates in aggregation and adhesion of hemocytes from the California mussel (*Mytilus californianus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 109A:117-125.

- CHENG, T.C., 1981.** Bivalves. In N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley (eds), « Invertebrate blood cells », Academic Press, London, pp 233-300.
- CHENG, T.C. 1988.** *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica* : total and differential cells counts. *J. Invertebr. Pathol.* 51 : 207-214.
- CHENG, T.C., 1983.** The rôle of lysosomes in molluscan inflammation. *Am. Zool.*, 129-144.
- CHENG, T.C., HUANG, J.W., KARADOGAN, H., RENWRANTZ, L.R. and YOSHINO, T.P., 1979.** Separation of oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors. *J. Invertebr. Pathol.*, 36 : 35-40.
- CHENG, T.C. and DOWNS, J.C.V., 1988.** Intracellular acid phosphatase and lysosome levels in subpopulation of oyster, *Crassostrea virginica* hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 52 : 163-167.
- CHENG T.C., MANZI J.J., and BURRELL V.G. 1995.** Differences in lectin-binding by hemocytes of oysters (*Crassostrea virginica*) from three regions and further evidence for the correlation between the presence of lathyrin and the absence of *Haplosporidium nelsoni*. *J. Shellfish Res.* 14:477-481.
- CHINTALA, M.M., FORD, S.E., FISHER, W.S. and ASHTON-ALCOX, K.A., 1994.** Oyster serum agglutinins and resistance to protozoan parasites. *J. Shellfish. Res.* 13(1) : 115-121.
- COCHENNEC, N., HERVIO, D., PANATIER, B., BOULO, V., MIALHE, E., ROGIER, H., GRIZEL, H. and PAOLUCCI, M., 1992.** A direct monoclonal antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (Ascomycota) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca : Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.*, 12 : 129-134.
- COMPS, M., 1983.** Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des Mollusques bivalves marins. Thèse Doctorat d'Etat en Sciences Naturelles, Université de Montpellier, 128 pp.
- COMPS, M. et DUTHOIT, J.L. 1976.** Infection virale associée à la "maladie des branchies" de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. *C.R. Acad. Sc., D*, 283 : 1595-1596.
- COMPS, M., TIGE, G. and GRIZEL, H., 1980.** Etude ultrastructurale d'un protiste de l'huître *Ostrea edulis* L.. *C.R. Acad. Sc. Paris, Série D*, 290 : 383-384.
- COOPER, E.L. and ROCH, P., 1986.** Second set allograft responses in the earthworm *Lumbricus terrestris* : kinetics and characteristics. *Transplantation*, 41(4) : 514-520.

- DIANO M., LE BIVIC C. and HIRN M., 1987.** A method for the production of highly specific polyclonal antibodies. *Anal. Bio.*, 166 : 224-229.
- DIKKEBOOM, R., VAN DER KNAAP W.P.W., MEULEMAN, E.A. and SMINIA T., 1985.** A comparative study on the internal defence system of juvenil and adult *Lymnea stagnalis*. *Immunology* 85,547.
- 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., BAYNE, C.J., VAN DER KNAAP, W.P.W. and TIJNAGEL, J.M.G., 1988.** Possible role of reactive forms of oxygen in in vitro killing of *schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. *Parasitol. Rev.*, 75 : 148-154.
- DINAMANI, P., HINE, P.M., and JONES, J.B., 1987.** The occurrence and characteristics of the hemocyte parasite *Bonamia sp.* in New Zealand dredge oyster, *Tiostrea lutaria*. *Dis. Aquat. Org.*, 3 : 37-44.
- DOONAN I.J., CRANFIELD H.J., and MICHAEL K.P. 1994.** Catastrophic reduction of the oyster, *Tiostrea chilensis* (Bivalvia : Ostreidae), in Fuveaux Strait, New Zealand, due to infestation by the protistan *Bonamia sp.*. *New Zealand Journal of Marine Freshwater Research* 28:335-344.
- DRINNAN, R.E., 1967.** Rehabilitation of disease depleted oyster populations in eastern Canada by large scale transplants. *Int. Council for the Exploration of the Sea*, CM 1967/E : 14.
- DUBRAY, G. and BEZARD, G., 1982.** A highly sensitive peridic acid-silver stain for 1,2-Diol groups of glycoproteins and polysccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 119 : 325-329.
- ELSTON R., FARLEY C.A., and KENT M.L. 1986.** Occurence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Dis. aquat. Org.* 2:49-54.
- FARLEY C.A., WOLF P.H., and ELSTON R. 1988.** A lont-term study of "microcell" disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g.n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp. n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fishery Bulletin* 86:581-593.
- FENG S.Y. 1965 b.** Heart rate and leucocyte circulation in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Bio. Bull.* 128 : 198-210.
- FISHER W. 1986.** Structure and functions of oyster hemocytes. In Anonymous *Immunity of Invertebrates*, 25-35.

- FLANDRE O., 1971.** Cell culture of molluscs. In *Invertebrate Tissue Culture* (C. Vago, Ed.) pp 361-383. New York : Academic Press.
- FLO R.W., NAESS A., LUND-JOHANSEN F., MAELHE B.O. SJIRSEN H., LEHMAN E. and VAN SOLBERG C.O., 1991.** Negative selection of human monocytes using magnetic particles covered by anti-lymphocyte antibodies. *J. Immunol. Methods*, 137 : 89-94.
- FOLEY Y. and CHENG T.C., 1975.** A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 25 : 189-197
- FORD S.E., KANALEY S., and LITTLEWOOD D.T.J. 1993.** Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni* : Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *J. Invertebr. Pathol* 61:49-57.
- FORD S.E., ASHTON-ALCOX K., and KANALEY S. 1994.** Comparative cytometric and microscopic analyses of oyster hemocytes. *J. Invertebr. Pathol* 64:114-122.
- FRIEBEL B. and RENWRANTZ L. 1995.** Application of density gradient centrifugation for separation of eosinophilic and basophilic hemocytes from *Mytilus edulis* and characterization of both cell groups. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A:81-90.
- FRIEDMAN C.S. and PERKINS F.O. 1994.** Range extension of *Bonamia ostreae* to Maine, U.S.A. *J. Invertebr. Pathol* 64:179-181.
- FRYER S.E., HULL C.J., and BAYNE C. 1989.** Phagocytosis of yeast by *Biomphalaria glabrata* : carbohydrate specificity of hemocyte receptors and a plasma opsonin. *Developmental and Comparative Immunology* 9-16.
- 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.
- GLEW, R.H., CZUCZMAN, M.S., DIVEN, W.F., BERENS, R., POPE, M.T. and KATSOVLIS, D.E., 1982.** Partial purification and characterization of particulate acid phosphatase of *Leishmania donovani* promastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B : 581-590.
- GOMBINER, B.M., 1993.** Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. *Neuron* II, 551-564.
- GOTTLIEB, M. and DWYER, D.W., 1981.** Protozoan parasite of humans surface membrane with externally disposed acid phosphatase of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mos. Cell. Biol.*, 2 : 76-81.

- GRANATH W.O.J.R. and YOSHINO T.P., 1983.** Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzyme markers. *J. Exp. Zool.*, 205-210.
- GRIZEL H., COMPS M., RAGUENES D., LE BORGNE Y., TIGE G. and MARTIN A.G., 1983.** Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les côtes de Bretagne. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 46 (3) : 209-225.
- GRIZEL H., 1985.** Etude des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse Doctorat d'Etat en Sciences Naturelles, Université de Montpellier, 145 pp.
- HASKIN H.H. and FORD S.E., 1979.** Development of resistance to *Minchinia nelsoni* (MSX) mortalities in laboratory-reared and native oyster stocks in Delaware Bay. *Mar. Fish. Rev.* 54-63.
- HENRY M., 1987.** La glande digestive de la palourde méditerranéenne *Ruditapes decussatus* L.. Recherches ultrastructurales, cytochimiques, écophysiologiques. Thèse, Doct es Sciences, Université Aix Marseilles, 439 pp.
- HERVIO D., 1992.** Contribution à l'étude de *Bonamia ostreae* (Ascetospora), protozoaire parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* (Bivalvia), et à l'analyse des interactions hôte-parasite. Thèse de 3ème cycle en Biologie fondamentale et appliquée (Spécialité : Protistologie), Université de Clermont Ferrand, 170 pp.
- HERVIO D., BACHERE E., MIALHE E. and GRIZEL H., 1989.** Chemiluminescent responses of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* hemocytes to *Bonamia ostreae* (Ascetospora). *Dev. Comp. Immunol.*, 13 : 449.
- HERVIO D., CHAGOT D., GODIN P., GRIZEL H. and MIALHE E. 1991.** Localization and characterization of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* (Ascetospora), an intrahemocytic protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). *Dis. aquat. Org.* 12 : 33-36.
- HERVIO D., BACHERE E., BOULO V., COCHENNEC N., VUILLEMIN V., LE COGUIC Y., CAILLETAUX G., MAZURIE J. and MIALHE E., 1995.** Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *Ostrea edulis* with the intrahaemocytic protozoan parasite *Bonamia ostreae* : application in the selection of parasite-resistant oyster. *Aquaculture* 132 : 183-194.
- HINE P.M., and WESNEY B., 1994.** Interaction of phagocytosed *Bonamia sp.* (Haplosporidia) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.* 20(3) : 219-229.
- HINSCH G. and HUNTE M. 1990.** Ultrastructure of phagocytosis by hemocytes of the american oyster. *Pathology in Marine Science* 479-487.

- HOWLAND, K.H. and CHENG, T.C., 1982.** Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 39 : 123-132.
- HUBERT F, VAN DER KNAAP W, NOEL T. and ROCH P., 1996.** Cytotoxic and antibacterial properties of *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (bivalve molluscs) hemolymph. *Aquat. Living Res.* 9 (2) : 115-124
- HUFFMAN, J.E. and TRIPP, M.R. 1982.** Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clam (*Mya arenaria*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 40 : 68-74.
- HUGUES T.K., SMITH E.M., CHIN R., CADET P., SINISTERRA J., LEUNG M.K., SHIPP M.A., SCHARRER B., and STEFANO G.B. 1990.** Interaction of immunoactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4426-4429
- HUGUES T.K., CHIN R., SMITH E.M., LEUNG M.K., and STEFANO G.B. 1991a.** Similarities of signal systems in vertebrates and invertebrates : detection, action, and interactions of immunoreactive monokines in the mussel, *Mytilus edulis*. *Advance in Neuroimmunology* 59-69.
- HUGUES T.K., SMITH E.M., BARNETT J.A., CHARLES R., and STEFANO G.B. 1991b.** LPS stimulated invertebrate hemocytes : a role for immunoreactive TNF and IL-1. *Developmental and Comparative Immunology* 117-122.
- JEONG, K.H., LIE, K.J. and HEYNEMAN, D., 1983.** The ultrastructure of the amoebocyte Producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.*, 7 : 217-228.
- KANALEY, S.A. and FORD, S.E., 1990.** Lectin binding characteristics of haemocytes and parasites in the oyster *Crassostrea virginica*, infected with *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *Parasite Immunol.*, 12 : 633-646.
- KAPLAN, J. and BUYS, S.S., 1985.** Macrophage surface receptors for soluble macromolecules. In R.T. Dean and W. Jessup (eds) "Mononuclear phagocytes : physiology and pathology". Elsevier Amsterdam, New York, Oxford, 79-88.
- KLEINSCHUSTER S.J. and SWINK S.L., 1992.** In vitro culture of presumptive nervous tissue of *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791). *J. Shellfish Res.* 11 : 349-361.
- LA PEYRE J.F., CHU F.L., and MEYERS J.M. 1995.** Haemocytic and humoral activities of Eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish and Shellfish Immunology* 5:179-190.

- LAEMMLI, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685.
- LAMA A. and MONTES J. 1993.** Influence of depth of culture in the infection of the european flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 13:17-20.
- LAURIERE, M., 1985.** Les techniques d'empreintes, principe et application. Recherche n°100. 13 : 31-37.
- LE DEUFF, R.M., LIPART, C. and RENAULT, T., 1994.** Primary culture of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, heart cells. *J. Tiss. Cult. Meth.*, 16 : 67-72.
- LE GALL, G., MOURTON, C., BOULO, V., MIALHE, E., PAOLUCCI, F. and PAU, B.,** Monoclonal antibodies against gill Rickettsiales-like organism (RLO) of *Pecten maximus* (Bivalvia) : application to indirect immunofluorescence (IIF) diagnostic.
- LE GALL, G., BACHERE, E., and MIALHE, E., 1991.** Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific Rickettsiales-like organisms. *Dis. Aquat. Org.*, 11 : 181-186.
- LEGER, R.J.S.T., CHARNLEY, A.K. and COOPER, R.M. 1986.** Enzymatic characterization of entomopathogens with the Api Zym system. *J. Invertebr. Pathol.*, 48 : 375-376.
- LEIPPE M. and RENWRANTZ L., 1988.** Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. *Dev. comp. Immunol.* 12 : 297.
- LIE, K.J., HEYNEMAN D. and YAU P., 1975.** The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, 61,574.
- LING, Y.J., 1990.** Cellular and humoral responses of resistant and susceptible oyster, *Crassostrea virginica*, infected with *Haplosporidium nelsoni* (MSX). Master of Science. University of Connecticut, Avery Pt., C.T. 102 pp.
- LIS, H. and SHARON, N., 1986.** Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.*, 55 : 35-67.
- LOPEZ GOMEZ, C., 1995.** Estudio patológico de la almeja *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) cultivada en Galicia y sus mecanismo de defensa. Thesis doctoral de la facultad de biológica de Santiago de Compostela.
- LORTEAU, C., AUFFRET, M. et LE BRIS, H., 1995.** Le système d'immuno-défense des Mollusques bivalves. *Rec. Méd. Vet.*, 171(6/7), 415-422.

- LOWE, D.M., and MOORE M.N., 1978.** Cytology and quantitative cytochemistry of a proliferative atypical hemocytic condition in *Mytilus edulis* (Bivalvia : Mollusca). *J. Natl. Cancer Inst.* 60 : 1455-1459.
- LOWRY, O.H., ROZEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- MARTIN, A.G., GERARD, A., COCHENNEC, N. and LANGLADE, A., 1993.** Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostrea* : assessment of the resistance of a first selected generation. European Aquaculture Society, Special Publication, Ghent, Belgium, 18 : 545-554.
- Mc KERROW, J.H., JEONG, K.H. and BECKSTEAD, J.H., 1985.** Enzymo-histochemical comparison of *Biomphalaria glabrata* amebocytes with human granuloma macrophages. *J. Leuk. Biol.*, 37 : 341-347.
- McCORMICK-RAY M.G. and HOWARD T. 1991.** Morphology and mobility of oyster hemocytes : evidence for seasonal variations. *J. Invertebr. Pathol* 58:219-230.
- MEDLIN L., ELWOOD, H.J., STICKEL S. and SOGIN M.L., 1988.** The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71: 491-499.
- 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.
- MONGET, D. 1975.** Comparaison des profils enzymatiques de deux lignées cellulaires d'insectes *Antheraea eucalypti* et *Malacosoma disstria* (Lepidoptera). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 281 : 651-657.
- MONTES J., ANADON R., and AZEVEDO C. 1994.** A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J. Invertebr. Pathol* 1-6.
- MOORE M. and LOWE D. 1977.** The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *J. Invertebr. Pathol* 29:18-30.
- MOORE, C.A., and GELDER,S.R., 1985.** Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca : Bivalvia). *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 104 : 242-249.
- MORI, K., MURAYAMA, K., KANNO, N., NAKAMURA, M., OHIRA, E., KATO, Y. and NOMURA T., 1984.** Occurrence and characterization of the defense factors in the Japanese oyster *C. gigas*. *Tohoku J. Agr. Res.* 35 : 55-61.

- MORTENSEN S.H. and GLETTE J. 1996.** Phagocytic activity of scallop (*Pecten maximus*) haemocytes maintained *in vitro*. *Fish and Shellfish Immunology* 111-121.
- MOURTON, C., BOULO, V., CHAGOT, D., HERVIO, D., MIALHE, E. and GRIZEL, H., 1992.** Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa : Ascetospora) and haemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca : Bivalvia) : *in vitro* system establishment. *J. Invertebr. Pathol.*, 59 : 235-240.
- NACIRI Y., 1994.** Sélection des mollusques : Bilan et nouvelles perspectives concernant la croissance, la qualité et les résistances aux maladies. Bordeaux Aquaculture, 54-61.
- NAKAMURA, M., MORI, K., INOOKA, S. and NOMURA, T., 1985.** *In vitro* production of hydrogen peroxyde by the amoebocytes of the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Dev. Comp. Immunol.* 9 : 407-417.
- NARDON, P., MONGET, D., DIDIER-FICHET, M.L., de THE, G. 1976.** Comparison of zymogram of three lymphoblastoid cell lines with a new microtechnique. *Biomedicine* 24, 3 : 183-190.
- NEUFELD D.S. and WRIGHT S.H. 1996.** Response of cell volume in *Mytilus* gill to acute salinity change. *Journal of Experimental Biology* 199:473-484.
- NOEL, D. 1992.** Etude des hémocytes et d'une néoplasie hémocytaire chez les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus trossulus* (Mollusca : Bivalvia). Thèse de l'Université de Bordeaux II. 169 pp.
- NOEL, D., BACHERE, E. and MIALHE, E., 1993.** Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Dev. Comp. Immunol.*, 17 : 483-493.
- ODINTSOVA N.A. and KHOMENKO A.V., 1991.** Primary cell culture from embryos of the Japanese scallop *Mizchopecten yessoensis* (Bivalvia). *Cytotechnology* 6 : 49-54.
- OFEK, I. and SHARON, N., 1988.** Lectinophagocytosis : a molecular mechanisms of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect. 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.
- OLAFSEN, J.A., 1988.** Role of lectins in invertebrate humoral defenses. *Am. Fish. Soc. Sp. Publ.*, 18 : 189-205.

- OLAFSEN, J.A., FLETCHER, T.C. and GRANT, P.T., 1992.** Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev. Comp. Immunol.*, 16 : 123-138.
- OLIVER L. and FISHER W. 1995.** Comparative form and function of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes from Chesapeake Bay (Virginia) and Apalachicola Bay (Florida). *Dis. aquat. Org.* 22:217-225.
- OUBELLA, R., MAES, P., PAILLARD, C. and AUFFRET M. 1993.** Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Dis. aquat. Org.* 15 : 193-197.
- PAILLARD C., ASHTON ALCOX K.A. and FORD S.E., 1996.** Changes in bacterial densities and hemocyte parameters in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, affected by juvenile oyster disease . *Aquat. Living Resour.*, 1996, 9 : 145-158.
- PICHOT, Y., COMPS, M., GRIZEL, H. et RABOUIN M.A., 1980.** Recherches sur *Bonamia ostreae*, gen. n. sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 43 : 131-140.
- PIPE, R.K, 1990.** Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocyte of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.*, 22 : 595-603.
- PODER, M., 1980.** Les réactions hémyocytaires inflammatoires et tumorales chez *Ostrea edulis* (L.). (Essais de classification des hémyocytes des Mollusques bivalves). Thèse 3ème cycle. Univ. Bret. Occ. U.E.R. Sci. Tech., 95 pp.
- POLANCO, E., MONTES, J., OUTON, M.J. and MELENDEZ, M.I. 1984.** Situation pathologique du stock d'huîtres plates en Galice (Espagne) en relation avec *Bonamia ostreae*. *Haliotis*, Paris. 14 : 91-95.
- READE, P. and READE, E., 1976.** Phagocytosis in invertebrates : studies on the hemocytes of the clam *Tridacna maxima*. *J. Invertebt. Pathol.* 28 : 281-290.
- RENAULT, T., FLAUJAC, G. and LE DEUFF, R.M., 1995.** Isolation and culture of heart cells from the european flat oyster, *Ostrea edulis*, *Methods in Cell Sciences.* 17 : 199-205.
- RENAULT T., COCHENNEC N., and GRIZEL H. 1995.** *Bonamia ostreae*, parasite of the european flat oyster, *Ostrea edulis*, does not experimentally infect the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 15:78-80.
- RENWRANTZ L.R., 1986.** Lectins in molluscs and arthropods : their occurrence, origin and roles in immunity. *Symp. Zool. Soc. London* 56-81.

- RENWRANTZ L.R., 1990.** Internal defense system of *Mytilus edulis*. In : Neurobiology of *Mytilus edulis*, Stefano G.B. (Ed). Manchester University Press, Manchester, U.K., 256-275.
- RENWRANTZ, L.R., YOSHINO, T., CHENG,T.C. and AULD, K. 1979.** Size determination of hemocytes from the American oyster, *Crassostrea virginica*, and the description of a phagocytosis mechanisms. Zool. Jb. Physiol. 83 : 1-12.
- RENWRANTZ, L. and STAHLER, A., 1983.** Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. J. Comp. Physiol., 149 : 535-546.
- RENWRANTZ L., DANIELS J. and HANSEN P.D., 1985.** Lectin binding to hemocytes of *Mytilus edulis*. Dev. comp. Immunol., 9 : 203-210.
- ROBINSON J.M. and KARNOVSKY M.J., 1983.** Ultrastructural localisation of several phosphatases with cerium. J. Histochem. Cytochem. 31 : 1197-1208
- RODRIGUEZ-LEON J., 1994.** Contribution à l'étude du système immunitaire de la crevette pénéide *Penaeus japonicus* (Crustacea Decapoda) Thèse Doctorat de Spécialité en protistologie. Université de Montpellier 2, 193pp.
- ROGIER, H., HERVIO, D., BOULO, V., CLAVIES, C., HERVAUD, E., BACHERE, E., MIALHE, E., GRIZEL, H., PAU, B. and PAOLUCCI, F., 1991.** Monoclonal antibodies against *Bonamia ostreae* (Protozoa : Ascetospora), an intrahaemocytic parasite of flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca : Bivalvia). Dis. Aquay. Org. 11 : 135-142.
- ROITT I., BROSTOFF J. and MALE D., 1985.** Immunologie fondamentale et appliquée. (eds) MEDSI.
- RONDELAUD, D and BARTHE, D., 1981.** The development of the amoebocyte producing organ in *Lymnaea trunculata* Müller infected by *Fasciola hepatica* L.; Z. Parasitenkd., 65,331.
- RUDELL, C.L., 1969.** A cytological and histochemical study of wound repair in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Ph. D. Thesis, Univ. Washington, Seattle, 134 pp.
- SEVALA, V.M., SEVALA, V.L. and SALEUDDIN, A.S.M., 1993.** Hemolymph insulin-like peptides (ILP) titers and the influence of ILP and mammalian insulin on the amino acid incorporation in the mantle collar *in vitro* in *Helisoma* (Mollusca). Biol. Bull. 185 : 140-148.
- SMINIA, T., 1981.** Phagocytic cells in molluscs, in "Aspects of Developmental and Comparative Immunology". In Solomon J.B. (ed) Pergamon Press, Oxford.

- SMINIA T., VAN DER KNAAP, W.P.W and VAN ASSELT, L.A., 1983.** Blood cell types and blood cell formation in gasteropod molluscs. *Dev. Comp. Immunol.*, 7 : 667-668.
- SMINIA, T. and VAN DER KNAAP, W.P.W., 1987.** Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev. Comp. Immunol.*, 11 : 17-28.
- SMOLOWITZ, R.W., MIOSKY, D. and REINISCH, C.L., 1989.** Ontogeny leukemic cells of the soft clam. *J. Invertebr. Pathol.*, 53-41.
- STANLEY, H.A., LANGRETH, S.G., REESE, R.T. and TRAGER, W., 1982.** *Plasmodium falciparum* merozoites : isolation by density gradient centrifugation using Percoll and antigenic analysis. *J. Protozool.*, 68 : 1059-1067.
- SURESH K. and MOHANDAS A. 1990.** Effect of sublethal concentrations of copper on hemocyte number in bivalves. *J. Invertebr. Pathol* 55:325-331.
- TAKAHASHI, K., MORI, K. and NOMURA, T., 1986.** Occurrence and characterization of lysozyme in the marine bivalves. *Bull. Japan; Soc. Sci. Fisheries* 52 : 863-868.
- TUAN, T.L. and YOSHINO, T.P., 1987.** Role of divalent cations in plasma opsonin-dependant and independant erythrophagocytosis by hemocytes of the Asian clam, *Corbicula fluminea*. *J. Invertebr. Pathol.*, 50 : 310-319
- VAN DER KNAAP, W.P.W, BOERRIGTER-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 *Lymnea stagnalis*. *Cell tissue Res.*, 291-296.
- VASTA, G.R., CHENG, T.C. and MARCHALONIS, J.J., 1984.** A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cell Immunol.*, 83 : 475-488.
- VOLETY A. and CHU F.L. 1995.** Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Developmental and Comparative Immunology* 19:135-142.
- VUILLEMIN, G., 1987.** Mise au point d'un modèle expérimental de reproduction et d'étude de la bonamiose, maladie hémocytaire de l'huître plate *Ostrea edulis*. Rapport DEA, Université d'Aix Marseille II. 28 pp.
- WATSON, J.D., HOPKINS, N.H., ROBERTS, J.W., STEITZ, J.A. and WEINER, A.M., 1987.** Control of cell proliferation. In "Molecular biology of the gene". The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., California 1059-1108.

- YOSHINO T.P. and CHENG T.C. 1976.** Fine structural localization of acid phosphatase in granulocytes of the pelecypod *Mercenaria mercenaria*. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 95:215-220.
- YOSHINO, T.P., 1983.** Lectins and antibodies as molecular probes of molluscan hemocyte surface membranes. *Dev. Comp. Immunol.*, 7 : 641-644.
- ZABALETA, A. and BARBER, B.J., 1996.** Prevalence, intensity and detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* L : in the Damaniscotta River area, Maine. *J. Shellfish Res.* 15 : 395-400.

Annexes

ANNEXE 1 : PREPARATION DE L'HEMALUN-EOSINE

Hémalun

Hématoxyline	4 g
Alcool à 95°	200 ml
Potassium aluminium sulfat	11 g
Eau distillée	200 ml
Glycérol	200 ml
Acide acétique	20 ml
Iodate de Potassium	0.8 g

Dissoudre l'hématoxyline dans l'alcool.

Dissoudre l'alun de potassium dans l'eau distillée.

Mélanger les deux solutions et ajouter les autres constituants dans l'ordre énuméré.

Eosine

Eosine	2.5 g
Eau courante	250 ml

ANNEXE 2 : MELANGE EPON

Epon 812	12.32 g
Dodecyl succinic anhydre (DDSA)	6.2 g
Methylnorbornene-2,3-dicarboxylic anhydre (MNA)	6.2 g
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phénol (DMP30)	0.3 g

ANNEXE 3 : CONTRASTE DES GRILLES

Préparation des réactifs

Acétate d'uranyl

Solution stock à 5% en eau distillée

Solution pour contraste : v/v solution stock, Alcool à 50°

Citrate de Plomb

Dans un récipient très propre mélanger 16 ml d'eau distillée bouillie et 3 ml de citrate de sodium 1M (357 g/l).

Agiter très doucement et ajouter 2 ml de nitrate de plomb 1M (331 g/l).

Un précipité se forme, agiter pour obtenir une solution laiteuse, puis ajouter 4 ml de NaOH 1N (40 g/l), la solution doit devenir limpide.

Contraste

Les solutions d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb sont centrifugées deux fois 15 min à 12 000 g afin d'éliminer les éventuels précipités contenus dans ces réactifs avant utilisation.

- Acétate d'uranyle 10 min à l'obscurité
- Rinçages 10 passages de la grille dans une goutte d'alcool 25°
10 passages de la grille dans trois gouttes d'eau distillée
- Séchage 20 min à 37°C
- Citrate de plomb 3 min dans une boîte de Prédi contenant des pastilles de KOH afin d'assécher l'atmosphère et ainsi limiter la précipitation du citrate de plomb pendant le contraste
- Rinçages 10 passages dans une goutte de NaOH 0.1 N
10 passages dans trois gouttes d'eau distillée
- Séchage 20 min à 37°C

ANNEXE 4 : TAMPON DE LYSE

Tris-HCl pH8	50 mM
NaCl	150 mM
NaN ₃	0.02%

Ajouter extemporanément les antiprotéases :

Phénylméthylsulfonylfluoridél (PMSF) : une solution stock (10mg/ml) conservée à -20°C, préparées en diméthylsulfoxyde (DMSO). Ajouter 100 µl/10 ml, soit 100 µg/ml en concentration finale

Aprotinine : une solution stock (10 mg/ml) conservée à -20°C est préparée en eau distillée. Ajouter 1µl/10ml, soit 1 µg/ml en concentration finale.

ANNEXE 5 : DOSAGE DES PROTEINES

Solution A pour le dosage des protéines

Mélanger extemporanément :

19.6 ml d'une solution stock de Na₂CO₃ (2g Na₂CO₃ ; 0.4g NaOH ; 100 ml d'eau H₂O)

0.2 ml d'une solution stock de CuSO

0.2 ml d'une solution stock de CuSO₄ (1g CuSO₄ ; 100 ml H₂O)

0.2 ml d'une solution stock de tartrate de sodium et de potassium (2g tartrate de sodium et potassium ; 100 ml H₂O ; conserver à -20°C)

Solution B pour le dosage des protéines

Mélanger extemporanément :

1 ml de réactif phénolique de Folin Ciocalteu (Sigma)

1 ml H₂O

ANNEXE 6 : GEL SDS-PAGE

Réactifs

Tampon pour gel de séparation

Tris 1.5 M 90.82 g

SDS 0.4% 2 g

H₂O qsp 500 ml

Ajuster le pH à 8.8 par addition d'HCl

Conserver à -20°C

Acrylamide 40% et Bisacrylamide 20 % (Sigma)

Tampon pour le gel de concentration

Tris 1M 12.11 g

SDS 0.4% 0.4 g

H₂O 80 ml

Ajuster le pH à 6.8 par addition d'HCl

Compléter à 100 ml avec H₂O

Gel de séparation	Solution à 17.5%	Solution à 9%
Glycérol	0.4 ml	-
Tampon pour gel de séparation	0.7 ml	1.5 ml
Acrylamide 40%	1.35 ml	1.13 ml
Bisacrylamide 2%	0.74 ml	1.36 ml
Persulfate de NH ₄ (10%)	15 µl	30µl
Temed	1.5 µl	3 µl
H ₂ O	-	2 ml

Gel de concentration

H₂O 3.44 ml

Tampon pour gel de concentration 1.66 ml

Acrylamide 40%	0.84 ml
Bisacrylamide 2%	0.64 ml
Persulfate de NH ₄ (10%)	66 µl
Temed	6 µl

Tampon de dépôt

β-mercaptoéthanol	1 ml
Glycérol	2 ml
SDS	0.46g
Bleu de bromophénol à 0.1%	0.2 ml
Tampon de concentration qsp	10 ml

Tampon de migration (3x concentré)

Tris 0.15M	18 g
Glycine (glycocolle)	86.4 g
SDS 0.3%	3 g
H ₂ O qsp	1000 ml
Ajuster le pH à 8.3	
Stocker la solution concentrée 3x à 4°	
Diluer au 1/3 avec H ₂ O pour l'électrophorèse	

ANNEXE 7 : COLORATION A L'ARGENT DES GELS

Réactifs

1er liquide de fixation

Ethanol absolu	40%
Acide acétique glacial	10%

2ème liquide de fixation

Thiosulfate de sodium	1g/l
Acétate de sodium	3g/l
Ethanol absolu	30%
Glutaraldéhyde à 25%	0.5%

3ème liquide de fixation

Ethanol absolu	10%
Acide acétique glacial	5%

Nitrate d'argent

Nitrate d'argent à 0.4% à préparer extemporanément

Révélateur

Formaldéhyde à 38%	1.5%
Carbonate de sodium	25g/l

Liquide d'arrêt de la révélation

Thiosulfate de sodium	25g/l
Trizma (Tris-hydrochloride)	37g/l

Le protocole décrit ci-dessous a été adapté d'après Heukeshoven and Dernick (1988).

1er fixateur	12 h
2ème fixateur, préchauffé à 50°C	12 min
3ème fixateur, préchauffé à 50°C	2x8 min
Rinçages en H ₂ O, préchauffée à 50°C	2x4 min
Nitrate d'argent 0.4%, préchauffé à 37°C	13 min
Rinçages en H ₂ O	4x30 sec
Révélation (dans la pénombre)	30 sec et 4 min
Arrêt de la révélation	2x4 min

Après la coloration, le gel est conservé en solution de glycérol à 10 %

ANNEXE 8 : TAMPON DE TRANSFERT

Glycine	39mM
Tris	48mM
SDS	0.035%
Méthanol	20%

ANNEXE 9 : TAMPON PHOSPHATE

NaCl	9g
Na ₂ HPO ₄ anhydre	1.48 g
Kh ₂ PO ₄	0.43 g
H ₂ O	1000 ml

ANNEXE 10 : SOLUTION STOCK D'ANTIBIOTIQUES

Solution de fluméquine

- peser 30 mg de fluméquine pour un volume final de 1 ml d'eau distillée
- dissoudre par ajout de NaOH
- filtrer sur 0.22 µm puis aliquoter stérilement

Conservation à -20°C

Solution d'antibiotiques

Pénicilline G.....0.75 mg/ml

Streptomycine sulfate.....1.50 mg/ml

Kanamycine.....0.1 mg/ml

Erythromycine.....0.1 mg/ml

Acide oxolinique.....0.1 mg/ml

Filtrer la solution sur 0.22 µm puis aliquoter. Conservation au congélateur à -20°C.

Les solutions utilisées au cours de cette étude sont diluées au 1/1000 ème.

ANNEXE 11 : MILIEUX DE CULTURE

Milieux de base

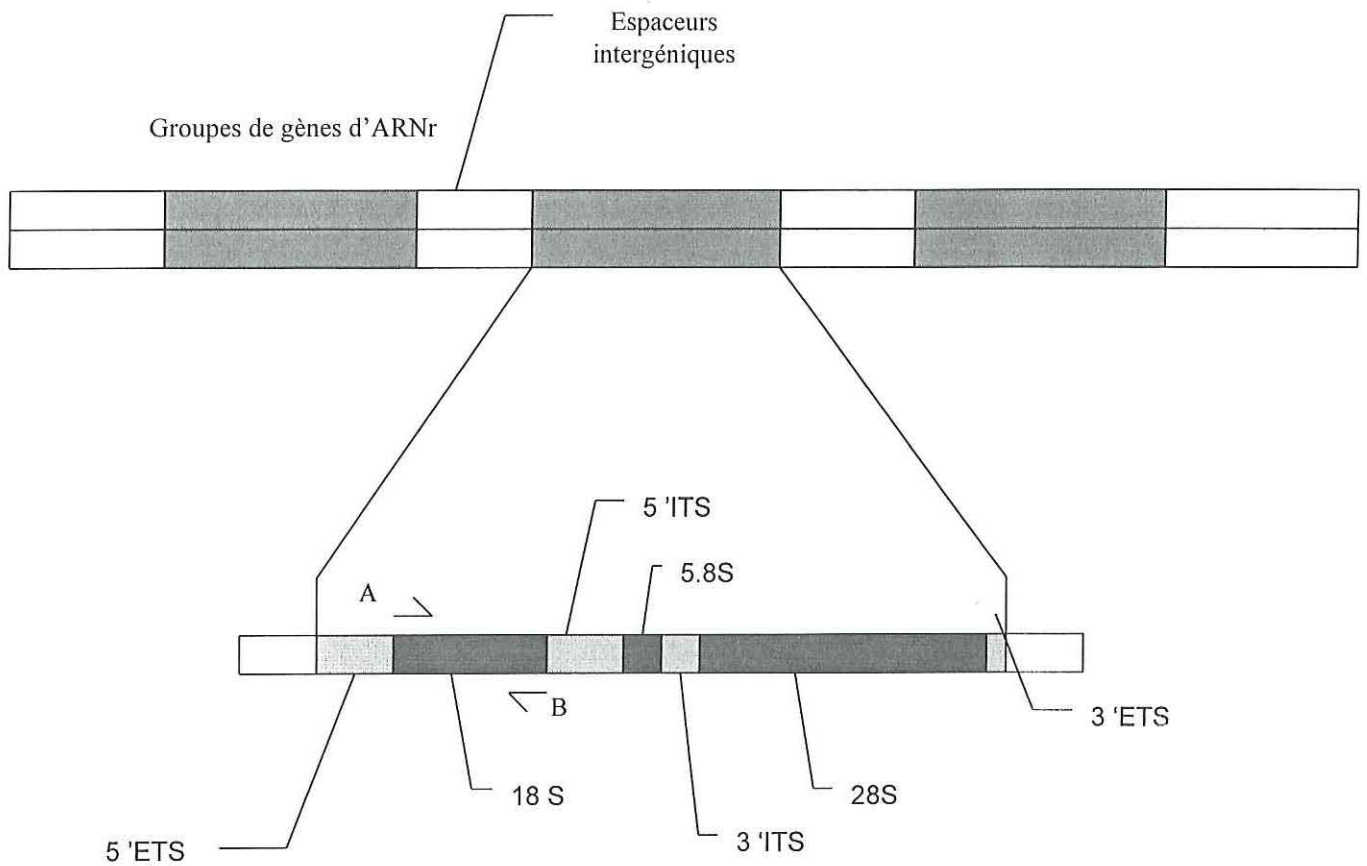
Solution d'Alsever : Avant son utilisation, la solution est préfiltrée sur 0.45µm puis filtrée sur 0.22µm sous une hotte à flux laminaire.

Hémolymphe : L'hémolymphe est ponctionnée sous la hotte à flux laminaire. Les hémocytes sont éliminés par centrifugation à 200 g pendant 15 min.

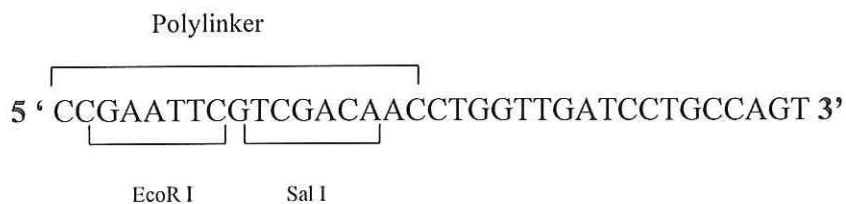
Milieux synthétiques

- *Milieu 199* commercialisé par GIBCO BRL
- *Milieu de Grace* commercialisé par GIBCO BRL
- *Milieu de Leibovitz (L15)* commercialisé par SIGMA

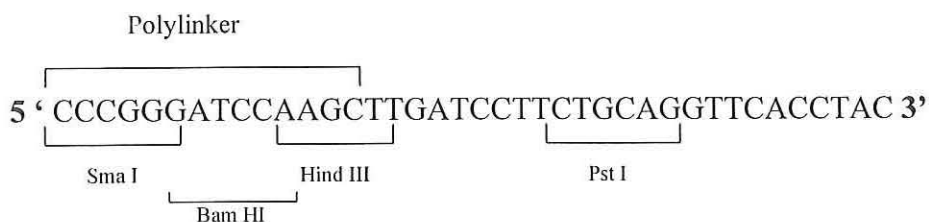
ANNEXE 12 : POSITIONS ET SEQUENCES DES AMORCES UNIVERSELLES



Amorce sens (A):



Amorce antisens (B):



Les positions des amorces se situent, selon Medlin, aux deux extrémités du gène codant pour l'ARN 18 S. Ces amorces contiennent des polylinkers afin de faciliter leur clonage dans des vecteurs plasmidiques. ETS: external transcript spacer; ITS : Internal transcript spacer

Annexe 13 : arbre phylogénique contenant le genre *Bonamia*

