

Université de Clermont II

D. E. A.

de

BIOLOGIE FONDAMENTALE et APPLIQUEE

MODELE D'ETUDE IN VITRO

DE BONAMIA OSTREAE (ASCETOSPORA),

PARASITE INTRAHEMOCYTAIRE D'OSTREA EDULIS.

ETUDE D'INTERACTIONS CELLULAIRES

HOTE-PARASITE.

Chantal MOURTON.

Octobre 1987.

S O M M A I R E

INTRODUCTION.....	1
I - RAPPELS DES CONNAISSANCES SUR <u>BONAMIA OSTREAE</u> ET PRESENTATION DES AXES ACTUELS DE RECHERCHES.....	3
II - MATERIEL ET METHODES.....	8
1 - Animaux.....	8
2 - Parasites.....	8
a) Protocole de purification.....	8
b) Test de viabilité.....	9
c) Comptage des parasites.....	9
d) Test de contamination.....	9
e) Intégrité ultrastructurale.....	10
3 - Culture cellulaire.....	10
a) Prélèvement aseptique de l'hémolymphe.....	10
b) Mise en culture des hémocytes.....	11
c) Milieu de culture.....	11
d) Infection <u>in vitro</u> d'hémocytes par <u>Bonamia</u>	11
4 - Histologie.....	12
a) Microscopie photonique.....	12
b) Microscopie électronique.....	12
5 - Immunodosage enzymatique.....	13
III - RESULTATS.....	15
1 - Elaboration d'un protocole d'infection <u>in vitro</u>	15
a) Mise en culture des hémocytes.....	15
b) Infection <u>in vitro</u> des hémocytes.....	15
c) Cinétique de pénétration de <u>Bonamia</u>	16
d) Protocole expérimental.....	16
2 - Etude des interactions hémocyte- <u>Bonamia</u>	17
a) Description ultrastructurale des cellules infectées.....	17
b) Mécanismes de reconnaissance et de pénétration..	18
3 - Etude de la cinétique de développement de <u>Bonamia ostreae</u> dans les hémocytes d' <u>Ostrea edulis</u> et de <u>Crassostrea gigas</u>	19
a) Analyses histologiques.....	19
b) Analyses immunoenzymatiques.....	20
IV - DISCUSSION - CONCLUSION.....	21
V - BIBLIOGRAPHIE	

ANNEXES

A l'issue de ce stage, je tiens à remercier Monsieur GRIZEL, Directeur de la Station IFREMER de La Tremblade, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire.

J'exprime ma très vive reconnaissance à toute l'équipe de Pathologie et de Génétique des Invertébrés marins, pour son aide tant sur le plan technique que lors de l'exploitation des résultats.

Je remercie également Olivier RAILLARD de sa disponibilité pour l'étude statistique des résultats.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma gratitude à Geneviève BONHOMME et Sylvie TAILLADE qui ont assuré la frappe de ce mémoire.

INTRODUCTION

L'ostréiculture est l'élément prépondérant de l'aquaculture marine. Cette activité est traditionnellement implantée dans plusieurs pays et fait l'objet actuellement de programmes de développement dans diverses régions du monde.

Dans tous les cas, les élevages se caractérisent par leur nature intensive et par des transferts d'animaux à l'échelle nationale et internationale. De tels paramètres créent des conditions favorables au déclenchement et à l'expansion d'épizooties.

De fait, des maladies infectieuses sont connues et constituent un aléa majeur, comme le montre l'histoire de l'ostréiculture française (Annexe I). Ainsi, au cours de ces vingt dernières années, l'élevage de l'huître creuse portugaise Crassostrea angulata a été définitivement anéanti suite à une virose (Comps et al., 1976) ; simultanément l'huître plate Ostrea edulis subissait l'impact de deux parasitoses, provoquant une chute notable de la production dont les pertes ont été évaluées à 1.6 Milliards de Francs par Meuriot et Grizel (1984) pour la période de 1972-1983.

En ce qui concerne les autres pays, la situation apparaît très similaire puisque des maladies à caractère épizootique affectent les stocks des différentes espèces d'huîtres élevées (Ann.II).

L'étiologie infectieuse de ces maladies a été souvent précisée. Les agents pathogènes identifiés appartiennent aux différents groupes de microorganismes et parasites connus en pathologie animale (Ann.III).

Les plus importants, quant à leur impact sur les populations de bivalves, sont incontestablement les protozoaires du phylum des Ascetospora (Kinne, 1983) qui regroupent les genres Marteilia, Haplosporidium, Minchinia et Bonamia. Les connaissances acquises sur ces parasites sont limitées et concernent essentiellement la description morphologique des agents et anatomopathologique des syndromes associés.

Cependant, des protocoles d'isolement et de purification de ces protozoaires ont été récemment élaborés et permettent maintenant de franchir l'étape descriptive de leur étude. Les recherches développées par l'équipe de pathologie des invertébrés marins (IFREMER, La Tremblade) sont axées sur Bonamia ostreae, responsable chez l'huître plate de la maladie hémocytaire ou bonamiose.

I - RAPPELS DES CONNAISSANCES SUR BONAMIA OSTREAE

ET PRESENTATION DES AXES ACTUELS DE RECHERCHES

Suite à des mortalités estivales d'huîtres plates Ostrea edulis en 1979 à l'île Tudy (Bretagne Sud), un protozoaire intrahémocytaire fut mis en évidence.

Taxonomie

Ce parasite, sur la base de ses caractéristiques ultrastructurales (Ann.IV, fig.1b), et notamment par la présence d'haplosporosomes (Hp), est apparenté aux protozoaires de la classe des Stellatospora (Phylum des Ascetospora) (Levine et al., 1980). Celle-ci est divisée en deux ordres, Occlusosporida (g. Marteilia, g. Marteilioides) et Balanosporida (g. Haplosporidium, g. Minchinia, g. Urosporidium) qui se différencient par l'organisation de la spore. En raison de la non observation de la spore, le parasite intrahémocytaire d'O.edulis fut considéré comme représentant d'un genre nouveau, Bonamia, dont il constitue à ce jour, la seule espèce, B.ostreae (Pichot et al., 1980).

Anatomopathologie

B.ostreae se trouve dans les hémocytes de l'huître et pour la plupart des auteurs, seuls les granulocytes sont parasités (Elston et al., 1986). Dans la cellule hôte, les parasites sont présents dans une vacuole parasitophore au sein de laquelle ils

se multiplient, apparemment par simple scissiparité. Cependant, des plasmodes contenant 4 à 6 noyaux sont très rarement observés (Brehelin 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 mort de la cellule hôte (Comps, 1983). Dans des stades avancés de la maladie, de nombreux parasites extracellulaires sont observables.

D'un point de vue anatomopathologique, l'infection s'accompagne d'ulcérations branchiales et d'accumulation d'hémocytes dans les lacunes de tous les tissus conjonctifs (Comps, 1983).

Epidémiologie

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'huîtres parasitées.

Depuis 1979, la bonamiose s'est propagée rapidement à presque toutes les zones d'élevage de Bretagne, faisant chuter la production dans cette région d'environ 90 %. Actuellement, et suite aux nombreux transferts nationaux et internationaux, la bonamiose affecte les principaux centres ostréicoles européens. Récemment, ce parasite a été identifié chez la même espèce hôte aux U.S.A. (Elston et al., 1986), et chez Tiostrea lutaria en Nouvelle-Zélande (Dinamani et al., sous presse).

Axes actuels de recherches

Face à l'extension mondiale de cette maladie, il importe d'améliorer les méthodes de diagnostic pour les contrôles zoosanitaires. Dans cette optique, à partir de parasites purifiés, des anticorps monoclonaux spécifiques ont été produits (Mialhe et al., 1987) et l'un d'eux, couplé à une phosphatase alcaline a été utilisé pour mettre au point un immunodiagnostic enzymatique (Cochennec et al., 1987), disponible sous forme de "kit rustique".

Ces anticorps monoclonaux constituent un outil original en pathologie des mollusques aussi bien en épidémiologie qu'en taxonomie. Ainsi, la comparaison de différentes souches géographiques de B.ostreae associé à O.edulis a permis de mettre en évidence qu'il s'agissait d'un seul sérotype (Mialhe et al. en préparation). Par contre, le parasite de T.lutaria constitue un autre sérotype. Une étude comparative plus exhaustive de ces parasites est nécessaire pour préciser leur statut taxonomique respectif.

Sur le plan expérimental, l'obtention de parasites purifiés 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'huîtres O.edulis et C.gigas, afin de déterminer leur sensibilité à Bonamia. Des parasites ont été uniquement observés chez O.edulis, les taux et les degrés d'infection

étant variables en fonction de la dose inoculée mais aussi en fonction des individus (Vuillemin, 1987). Il peut donc être supposé que c'est au niveau des hémocytes que se situe la barrière de spécificité. Ainsi les hémocytes, en tant que cellules immunitaires, doivent être directement impliqués dans l'élimination des parasites chez C.gigas mais aussi dans les variations des infections initiées chez O.edulis.

Dans ce contexte, 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.

Il apparaît important de souligner la similitude de ce modèle Bonamia-hémocyte avec certains étudiés en pathologie humaine et vétérinaire.

En effet, des agents pathogènes, tels que les trypanosomes, les leishmanies ou les mycobactéries sont, au moins à certains stades de leur développement, parasites intracellulaires de macrophages. Compte tenu de l'importance de ces maladies, de nombreux travaux ont été développés pour comprendre les mécanismes de reconnaissance, de pénétration et de survie d'un parasite dans une cellule hôte spécialisée dans la phagocytose (Mauel, 1984), (Moulder, 1985).

L'ensemble de ces recherches repose essentiellement sur des expérimentations réalisées in vitro, les systèmes d'études étant d'autant plus faciles à établir qu'il existe des lignées de cellules hôtes et des cultures de parasites (Jensen, 1983), (Trager, 1983).

Le modèle Bonamia-hémocyte, s'avère à priori plus difficile à mettre en oeuvre en raison de l'absence de lignée cellulaire d'hémocytes établie et de la nécessité d'isoler et de purifier les parasites à partir d'huîtres malades. Par contre, de nombreux protocoles expérimentaux pourront être extrapolés à partir de ceux élaborés pour ces différents parasites de vertébrés.

Il faut noter enfin que l'intérêt de telles études dépasse le cadre strict des mollusques et concerne celui plus général de la pathologie et l'immunologie comparées.

Dans le cadre de mon stage de DEA, je me suis attachée à la mise au point d'un modèle d'étude in vitro de B.ostreae.

Initialement, il a été nécessaire de déterminer les modalités d'infection expérimentale d'hémocytes cultivés in vitro. Différentes méthodes d'analyses ont ensuite été conçues. Elles ont permis d'aborder l'étude des relations cellules hôte-parasite notamment pour les phases précoces de l'infection.

II - MATERIEL ET METHODES

1 - Animaux

Des huîtres plates O.edulis parasitées sont pêchées par dragage dans la baie de Quiberon. Ce site est atteint par la bonamiose, les taux d'infection variant de 0 % à 30 % en fonction de l'âge et de la période (Grizel, 1985).

Des huîtres plates exemptes de Bonamia, âgées de 2 à 3 ans, proviennent de l'étang de Thau. Cette population a été contrôlée par examens histologiques effectués dans le cadre du suivi épidémiologique depuis plusieurs années. En outre, des contrôles sont réalisés lors de chaque expérience. Des huîtres creuses C.gigas (2 ans) sont récoltées dans les élevages surélevés situés dans le bassin de Marennes-Oléron.

2 - Parasites

a) Protocole de purification

Les parasites sont purifiés selon le protocole établi par Mialhe et al. (en préparation) et schématisé sur l'annexe V. Suite à la centrifugation isopycnique sur gradient discontinu de Percoll, les parasites sont localisés aux interfaces 50-60 % et 60-70 %. Seule, cette dernière est prélevée en raison de sa moindre contamination par des microorganismes. Cette fraction 60-70 % est alors diluée dans de l'eau de mer filtrée (0.22 µm), puis centrifugée (3000g, 30mn, 4°C) sur coussin de sucrose 20 % afin d'éliminer le Percoll résiduel.

b) Test de viabilité

La viabilité des cellules parasites est vérifiée en fin de purification selon un test à l'acridine orange (0.1mg/100ml eau de mer stérile) et au bromure d'éthidium (0.1mg/100ml eau de mer stérile) (Parks et al., 1979). Lors de l'examen au microscope à épifluorescence, les cellules vivantes émettent une fluorescence verte (acridine) alors que les cellules mortes apparaissent orange (bromure d'éthidium) (Ann. VI, fig.2a).

c) Comptage des parasites

La cellule de Malassez est une cellule à numération globulaire de 0.2mm de profondeur. Chaque quadrillage de la grille correspond à un volume de 0.01µl dans lequel on dénombre X cellules. A partir d'une valeur moyenne X établie sur 20 comptages, il est possible de quantifier le nombre de cellules présentes dans un volume donné. Le comptage de B.ostreae est effectué par examen au grossissement 480. Le parasite est reconnaissable à l'état frais par ses granules réfringents (Ann.VI, fig.2b).

d) Test de contamination

La contamination microbienne des suspensions de parasites purifiés est estimée par dépôt sur milieu nutritif gélosé (T.S.A., Difco) d'une série de dilutions. Les colonies bactériennes sont comptées après 24h de culture. Les valeurs obtenues sont toujours inférieures à 1 colonie pour 100 parasites.

e) Intégrité ultrastructurale

L'examen en microscopie électronique de parasites purifiés montrent que leur morphologie est tout à fait similaire à celle décrite pour des formes intracellulaires observées sur des coupes de tissus (Ann.IV, fig.1a, 1b).

3 - Culture cellulaire

a) Prélèvement aseptique de l'hémolymphe

L'environnement des bivalves, dans le milieu naturel ou au laboratoire, est relativement contaminé par divers types de microorganismes (bactéries, levures) et de protozoaires (amibes, ciliés). La majorité des tissus de ces animaux étant en contact direct avec l'environnement, une désinfection efficace doit nécessairement précéder la mise en culture des tissus afin d'éviter le développement ultérieur de ces contaminants. Le protocole retenu consiste à effectuer une série de lavages des organes de l'huître avec de l'eau de mer stérile à laquelle est additionné du détergent Tween 80 à raison de 1%. Les huîtres sont préalablement ouvertes avec soin par section du ligament et du muscle adducteur, la cavité péricardique ne devant absolument pas être lésée.

Une ponction lente de l'hémolymphe est alors effectuée directement dans la cavité péricardique en évitant l'obstruction de l'aiguille par le coeur. Dans ces conditions, 200 à 500 μ l d'hémolymphe sont assez régulièrement prélevés. Les hémocytes sont comptés à la cellule de Malassez.

b) Mise en culture des hémocytes

La mise en culture des hémocytes (50 000) est effectuée soit sur lamelle déposée dans une boîte de culture (Nunc, 35mm), soit dans un tube type Eppendorf.

c) Milieu de culture

La composition du milieu de culture (Ann.VII) a été établie par Boulo V. (comm. pers.) sur la base des caractéristiques physicochimiques de l'hémolymphe des bivalves.

d) Infection in vitro d'hémocytes par Bonamia

L'élaboration du protocole d'infection in vitro et les différentes expérimentations sont présentées en détails dans la partie "résultats" de ce document.

Les différentes expériences ont été réalisées avec des lots de 10 huîtres des deux espèces à partir desquelles ont été préparées deux ou trois séries de primocultures d'hémocytes. Ainsi l'hémolymphe de chaque huître est répartie en cultures témoin et expérimentales.

L'analyse histologique de ces cultures s'effectue par identification et comptage des différents types hémocytaires et des parasites intracellulaires. Pour chaque culture une centaine d'hémocytes est examinée et le nombre de parasites par type cellulaire est noté. Les comptages cumulés sur un lot de 10 huîtres sont exprimés selon l'histogramme modèle (Ann.XIII). L'analyse des cultures par immunodosage enzymatique est décrite dans le paragraphe 5.

4 - Histologie

a) Microscopie photonique

Les cellules cultivées sur lamelle histologique ou prélevées dans le surnageant de culture, sont lavées avec du tampon HN (Hepes 20mM, NaCl 0.5M, pH 7.8), séchées à l'air puis fixées soit par le méthanol pour une coloration hématologique (kit Hémacolor Merck), soit par l'acétone (10 mn) pour une préparation en immunofluorescence indirecte.

Dans ce dernier cas, les lames sont incubées en chambre humide (30mn, T°labo) avec une solution d'anticorps monoclonal 20B2, spécifique de B.ostreae, dilué (100µg/ml) dans un tampon phosphate (Diagnostic Pasteur). Après lavage avec le même tampon, les lames sont incubées comme précédemment avec une solution d'anticorps de chèvre (anti IgG de souris) couplés à l'isocyanate de fluorescéine (Diagnostic Pasteur) (dilution 1/100 dans le même tampon, Bleu Evans 0.1%). Les lames sont lavées à nouveau, montées dans un tampon glycérine et examinées au microscope à épifluorescence.

b) Microscopie électronique

Les cellules en suspension sont fixées (vol/vol) dans un mélange contenant du glutaraldéhyde (1.75%) et du paraformaldéhyde (2%) tamponné par du cacodylate (HCl 0.1 M, pH 7.4-7.6). L'osmolarité est ajustée à 1000 mOsm par du sucrose. Une post-fixation est effectuée par du tétraoxyde d'osmium à 1%. Après fixation, les cellules sont incluses dans un culot d'agarose, puis successivement déshydratées et

imprégnées d'épon par passage dans un automate (Ultraprocesseur, LKB). Des coupes d'épaisseur 600 à 900 Å sont contrastées à l'aide d'un automate (Ultrastainer LKB) par l'acétate d'uranyle aqueux et le citrate de plomb. Les observations sont effectuées au microscope électronique Jeol 1200 CX.

5 - Immunodosage enzymatique

La présence et la quantité d'antigènes parasitaires dans une culture peuvent être estimées par immunodosage enzymatique de type direct (Ann.VIII). Les cultures (600µl) sont congelées aux différents temps de l'expérience, puis diluées dans de l'eau distillée (1ml) au moment du dosage.

Dans ces conditions, les hémocytes subissent des altérations irréversibles des membranes qui favorisent l'accessibilité des anticorps aux parasites intracellulaires.

Les suspensions cellulaires sont ensuite déposées dans les puits de plaque de microtitration de type GV (Millipore), puis concentrées et adsorbées par aspiration sur la membrane Durapore (0.22µm) qui constitue le fond des puits.

Après séchage à l'étuve (37°C), et afin d'éviter les fixations non spécifiques ultérieures des anticorps, la plaque est saturée pendant 2 heures, à température ambiante (Tris 10mM, NaCl 90mM, Tween 20 à 1%, BGG 1%, BSA 1%). Pour chaque expérience, une culture d'hémocytes témoin est incubée avec la solution de saturation (1 heure, température ambiante). Les autres puits sont incubés avec une solution de l'anticorps monoclonal 20B2 spécifique d'un épitope

membranaire de B.ostreae (Boulo et al., en préparation). Cet anticorps, couplé à la phosphatase alcaline est utilisé après dilution au 1/1000ème dans un tampon (Tris 10mM, NaCl 90mM, Tween 20 0.5%, BGG 1%). Plusieurs lavages sont ensuite effectués (NaCl 90mM) pour éliminer l'anticorps non fixé. Enfin, chaque puit est incubé avec une solution de substrat soluble, le NPP (nitrophenyl phosphate), dilué dans le tampon diéthanolamine (5%, pH=9.8). La présence d'anticorps spécifiques de B.ostreae couplés à l'enzyme et fixés sur les parasites, est révélée par la coloration du produit de transformation du NPP. La densité optique (DO), mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques Titertek est proportionnelle à la quantité de parasites.

III - RESULTATS

1 - Elaboration d'un protocole d'infection in vitro

a) Mise en culture des hémocytes

Les hémocytes d'O.edulis et de C.gigas, prélevés aseptiquement, se fixent assez rapidement (15 minutes environ) sur la lamelle de verre placée dans la boîte de culture. Cette observation directe au microscope inversé à contraste de phase est confirmée lors de l'examen des préparations fixées et colorées. Par cette technique, les différents types d'hémocytes (Chagot, comm.pers.) sont aisément identifiés : petits hyalinocytes (pH), grands hyalinocytes (gH), granulocytes (G) et granulocytes dégranulés (Gd) (Ann.IX, fig.4).

b) Infection in vitro des hémocytes

L'infection des cultures in vitro d'hémocytes avec des parasites purifiés a été réalisée initialement avec des multiplicités d'infection de 1, 5 et 10 parasites par hémocyte (p/h).

Les cultures d'hémocytes d'O.edulis ont été examinées deux heures après l'infection.

Au microscope à contraste de phase, il est impossible d'identifier de façon sûre les parasites (Ann.VI, fig.3).

Par contre, les préparations colorées permettent de reconnaître les parasites et de préciser leur localisation extra ou intracellulaire (Ann.IX, fig.4).

Ainsi, il apparaît qu'une multiplicité d'infection de 5 parasites par hémocyte soit à retenir pour des quantifications fiables de parasites. En effet, pour une multiplicité d'infection de 1 p/h, très peu de cellules parasitées sont présentes par champ d'observation. Pour une multiplicité d'infection de 10 p/h, le nombre de parasites dans certaines cellules est trop important pour être estimé sûrement.

L'examen des échantillons équivalents en immunofluorescence s'avère plus délicat pour préciser la localisation de certains parasites. De plus, l'identification des différents types d'hémocytes est pratiquement impossible (Ann.IX, fig.5)

c) Cinétique de pénétration de Bonamia

Le délai de contact hémocyte-parasite nécessaire à la pénétration de ce dernier a été déterminé expérimentalement chez O.edulis et C.gigas. Deux durées ont été comparées, 30mn et 2h. Les résultats sont présentés dans les annexes XII (expérience 1) et XIV.

Au sein de chaque espèce, et pour chaque type cellulaire, les taux d'infection n'évoluent pas de façon significative entre 30mn et 2h (selon un test de comparaison de séries appariées, STAT. ITCF). Seul le nombre de parasites augmente très faiblement dans quelques rares cellules.

d) Protocole expérimental

Sur la base de ces observations, plusieurs paramètres expérimentaux ont été retenus :

- Mise en culture de 50 000 hémocytes (environ 50µl)
- Infection expérimentale des hémocytes une 1/2 heure au minimum après leur mise en culture in vitro (temps de fixation des hémocytes)
- Multiplicité d'infection de 5 parasites par hémocyte
- Incubation des hémocytes avec les parasites pendant 2h
- Elimination du surnageant de culture, deux heures après l'infection
- Lavage des cultures pour éliminer les parasites et les microorganismes libres
- Addition de milieu de culture
- Examen des cultures aux différents temps expérimentaux, lavage, fixation et coloration (Hémacolor)

2 - Etude des interactions hémocyte-Bonamia

a) Description ultrastructurale des cellules infectées

Des cultures d'hémocytes infectées expérimentalement ont été fixées aux temps 30mn et 2h, puis traitées pour la microscopie électronique.

Les examens confirment la réceptivité des différents types hémocytaires chez les deux espèces.

De nombreuses images des différentes étapes de phagocytose sont observées chez les granulocytes. Des pseudopodes englobent progressivement la cellule parasitaire (Ann.X, fig.6). Finalement, celle-ci se trouve à l'intérieur d'une vacuole parasitophore qui est dans certains cas accolée à des lysosomes (Ann.X, fig.7). Parfois, des parasites présentant des figures de dégénérescence sont

reconnaissables au sein des vacuoles (Ann.X, fig.8).

Des hyalinocytes parasités ont été observés chez les deux espèces (Ann.XI, fig.9). Les parasites intracellulaires sont généralement inclus dans une vacuole de la cellule hôte (Ann.XI, fig.10), bien que certains apparaissent libres dans le cytoplasme (Ann.XI, fig.11).

b) Mécanismes de reconnaissance et de pénétration

- Incubation de Bonamia ostreae avec les anticorps monoclonaux 20B2 et 15C2

Préalablement à sa mise en contact avec des hémocytes, le parasite est incubé pendant 1h avec une solution des deux anticorps monoclonaux 20B2 et 15C2 (100mg/ml eau de mer stérile) spécifiques d'épitopes membranaires de Bonamia ostreae. Les résultats des taux d'infections obtenus dans ces conditions sont présentés dans les annexes XII (expérience 2) et XV.

La réduction des taux d'infection hémocytaires est significative chez O.edulis et non significative chez C.gigas (même test que précédemment).

- Traitement des hémocytes par la cytochalasine B

Des cultures d'hémocytes d'O.edulis et de C.gigas ont été traitées par la cytochalasine B en solution dans du DMSO, diluée dans de l'eau de mer stérile (10 µg/ml). Un témoin DMSO seul à la même concentration (1 %) a été réalisé. Après incubation des hémocytes avec les différentes solutions (1h, 18°C) les cellules sont infectées avec des parasites purifiés.

La cytochalasine B se fixe sur les molécules d'actine et inhibe la locomotion cellulaire et la phagocytose (Stuart et al., 1985). Le DMSO est utilisé comme solvant de ce produit. Comparativement aux témoins les taux d'infection hémocytaires, suite à ce traitement, sont chez les deux espèces, considérablement réduits pour les hyalinocytes et nuls pour les granulocytes, (Ann.XII, expérience 3), (Ann. XVI). Les mêmes tests statistiques montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les témoins et les cultures traitées par le DMSO. Par contre, la différence est significative entre les témoins et les cultures traitées par la cytochalasine B. Les résultats des tests sont comparables quelle que soit l'espèce considérée. Il n'y a pas de différences d'effet du traitement entre les deux espèces.

3 - Etude de la cinétique de développement de Bonamia ostreae dans les hémocytes d'Ostrea edulis et de Crassostrea gigas

a) Analyses histologiques

Deux expériences ont été effectuées dans le but de décrire la cinétique de développement du parasite dans chaque type hémocytaires des deux espèces d'huître.

La première série d'infections (expérience 4) a été analysée aux temps 2h, 24h et 48h ; la deuxième série (expérience 5) aux temps 24h, 72h et 96h.

Les résultats, présentés dans les annexes XII (expérience 4 et 5), XVII et XVIII, appellent les commentaires suivants.

Au temps $t=2h$, les différents types d'hémocytes sont présents en proportion équivalente chez les deux espèces.

Par contre, les taux d'infection des grands hyalinocytes sont plus importants chez O.edulis et à l'inverse les taux d'infection des granulocytes sont plus élevés chez C.gigas. Une diminution nette et progressive du pourcentage de cellules parasitées est observée chez les deux espèces après 24h de culture, cette disparition pouvant s'expliquer par la mise en suspension des cellules parasitées.

L'examen microscopique des surnageants de culture, soit directement en contraste de phase, soit après dépôt sur lame histologique et coloration, révèle effectivement la présence de nombreuses cellules. Toutefois, selon ces techniques, il n'est pas possible de déceler la présence de parasites intracellulaires.

L'utilisation de la technique d'immunofluorescence indirecte sur ces mêmes frottis montre, elle, des parasites intracellulaires en nombre variable de 1 à 10 par cellule. La mauvaise qualité des images obtenues par cette technique rend cependant impossible la quantification des parasites.

b) Analyses immunoenzymatiques

La mise en suspension des hémocytes parasités observée dans les expériences 4 et 5 rend impossible l'analyse de la cinétique de développement de Bonamia par des techniques histologiques. Une expérience similaire a été effectuée par immunodosage enzymatique des parasites présents dans les cultures aux temps 2h, 24h, 48h et 72h.

Les résultats obtenus sur ces durées n'indiquent aucune variation de la quantité d'antigènes quelle que soit l'espèce considérée.

IV - DISCUSSION - CONCLUSION

Le travail exposé dans ce document a conduit à l'élaboration d'un système d'étude in vitro fiable pour le modèle hémocyte-Bonamia. En effet, les techniques de primoculture d'hémocytes, le protocole d'infection par des parasites purifiés sans contamination ultérieure par des microorganismes et les méthodes d'analyses histologiques et immunoenzymatiques des infections, constituent autant de paramètres expérimentaux établis.

L'utilisation de ce modèle in vitro a permis l'étude d'interactions de B.ostreae avec les hémocytes d'O.edulis et de C.gigas.

La réceptivité à B.ostreae de tous les types hémocytaires a été démontrée. Les taux d'infection des grands hyalinocytes sont plus élevés chez O.edulis (27%/20%) alors que chez C.gigas les petits hyalinocytes (13%/3%) et les granulocytes (65%/45%) sont plus fréquemment parasités.

L'incubation des parasites avec des anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes membranaires provoque une réduction de ces taux d'infection significative uniquement chez O.edulis. L'hypothèse de récepteurs spécifiques impliqués dans la reconnaissance Bonamia-hémocyte d'O.edulis peut donc être avancée.

Des observations similaires chez différents parasites de vertébrés, (Plasmodium (Hollingdale et al., 1984), Trypanosoma (Zingales et al., 1985), (Alves et al., 1986) ou Leishmania (Alexander et al., 1985) ont été suivies par la purification de molécules impliquées (Chang et al., 1986) (immunoprécipitation par anticorps monoclonaux). Des études biochimiques de ces récepteurs ont montré leur nature glycoprotéique. Les anticorps monoclonaux spécifiques de B.ostreae permettent d'entreprendre ce type de travail.

D'autre part, l'étude des récepteurs membranaires, spécifiques et non spécifiques à l'aide de lectines doit être envisagée.

En effet ce type de molécules a été mis en évidence à la surface des hémocytes de plusieurs espèces de bivalves (Sminia et al., 1987)

Les taux d'infection sont fortement réduits pour les hyalinocytes et annulés pour les granulocytes des deux espèces à la suite de leur traitement par la cytochalasine B.

Ces résultats suggèrent un mode de pénétration de type "Host-mediated endocytose" (Moulder, 1985).

Des expériences complémentaires seront nécessaires en éliminant la cytochalasine B avant l'incubation avec le parasite.

Par ailleurs, des inhibiteurs de phagocytose plus efficaces, telle que la cytochalasine D, pourront être utilisés.

L'examen ultrastructural des phases précoces de l'infection révèle que dans les granulocytes, les parasites sont toujours inclus dans une vacuole parasitophore, souvent associée à des lysosomes. Certaines images suggèrent d'une part, qu'il y ait

une fusion phagolysosomiale, et d'autre part, que des parasites subissent une lyse intravacuolaire.

La compréhension de l'évolution de l'infection dans les granulocytes nécessite maintenant une expérimentation plus détaillée. Dans ce but, des infections de granulocytes purifiés sur gradient de Percoll (Bachère, comm. pers.) et traités avec des inhibiteurs de la fusion phagolysosomiale (Osuna et al., 1986) devront être analysées en microscopie électronique et par immunodosage. Selon les résultats de telles investigations, le rôle immunitaire de type "macrophage" des granulocytes vis à vis de B.ostreae pourra être établi, ou bien l'adaptation de B.ostreae à survivre dans une cellule phagocyte professionnel devra être analysée.

Dans ce dernier cas, les données établies sur la survie des leishmanies dans les phagolysosomes de macrophages (Alexander et al., 1985), (Mauel, 1984), (Moulder, 1985) serviront de base d'étude.

Les premiers résultats, obtenus pour des périodes allant de 2 heures à 4 jours après l'infection, ne permettent pas de mettre en évidence de différence d'évolution de l'infection ni en fonction de l'espèce, ni en fonction de l'individu. Cette stabilité de la quantité d'antigènes parasitaires devra être analysée pour des durées plus importantes. Un manque de sensibilité peut aussi être supposé compte tenu des microquantités de cellules utilisées.

Ces expériences seront donc poursuivies, dans un premier temps, sur des pools d'hémolymphe de chaque espèce. En effet, il est indispensable de préciser la cinétique de développement de B. ostreae chez O.edulis et de vérifier l'élimination du parasite par les hémocytes de C.gigas in vitro.

Ultérieurement, la variabilité individuelle, mise en évidence chez des huîtres O.edulis infectées expérimentalement (Vuillemin, 1987) pourrait être analysée in vitro. Des études similaires chez la souris montre que le caractère de résistance à un agent pathogène, observé chez l'animal était exprimé à l'échelle du macrophage cultivé in vitro. (Olivier et al., 1987) (Lissner et al., 1983). Par ce type de modèle, la nature génétique du caractère de résistance peut être étudiée.

L'étude des relations d'un parasite intracellulaire avec son hôte repose sur une maîtrise optimale des modalités d'infection in vitro. Dans le domaine de la pathologie des mollusques, une telle approche était pratiquement impossible en l'absence de protocoles adaptés pour la purification de parasites et pour l'établissement fiable de cultures cellulaires.

Les progrès récemment acquis dans ces méthodologies, le rôle majeur des Ascetospora en tant qu'agents pathogènes et l'impact de la bonamiose sur l'ostréiculture, conféraient au modèle hémocyte-Bonamia un intérêt incontestable.

Le travail exposé dans ce mémoire présente un caractère original en pathologie des mollusques et ouvre la voie à des recherches

sur leurs réactions immunitaires vis à vis d'agents pathogènes.

Il faut noter cependant que pour acquérir un caractère de reproductibilité équivalent aux modèles connus en pathologie humaine et vétérinaire, il sera nécessaire, entre autres, de disposer de lignées cellulaires stables. Dans cette optique, des travaux de transformation cellulaire par cancérogénèse chimique sont menés au laboratoire.

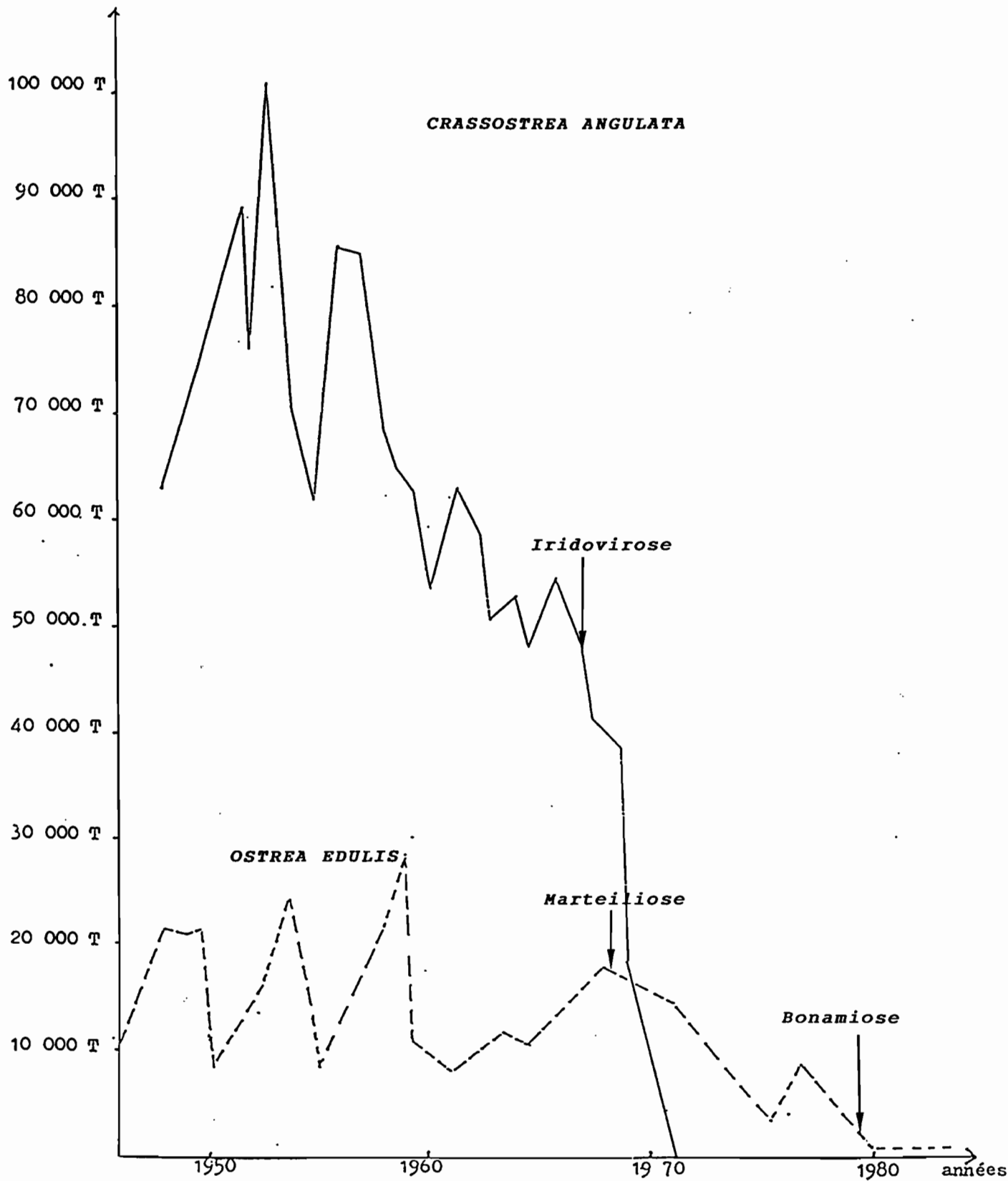
V - BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER, J. and RUSSEL, D.G., 1985. Parasite antigens, their role in protection, diagnosis and escape : the leishmaniasis. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 120 : 43-67
- ALVES, M.J.M., ABUIN, G., KUWAJIMA, V.Y. and COLLI, W., 1986. Partial inhibition of trypanomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi. *Mol. Bioch. Parasitol.*, 21 : 75-82
- BREHELIN, M., BONAMI, J.R., COUSSERANS, F. et VIVARES, C.P., 1982. Existence de formes plasmodiales vraies chez Bonamia ostreae parasite de l'huître plate Ostrea edulis. *C.R. Acad. Sciences Paris*, 295, III : 45-48
- BOULO, V., MIALHE, E., ROGIER, H., PAOLUCCI, F. and GRIZEL, H.. Immunodiagnostic method of Bonamia ostreae (Asctospora) parasite of epitopes by monoclonal antibodies. (in preparation)
- CHANG, C.S. and CHANG, K.P., 1986. Monoclonal antibody affinity purification of a Leishmania membrane glycoprotein and its inhibition of Leishmania-macrophage binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83 : 100-104
- COCHENNEC, N., BOULO, V., MIALHE, E., GRIZEL, H., ROGIER, H., CLAVIES, C., HERVAUD, E., PAU, B., PUYGRENIER, M. and PAOLUCCI, F., 1987. Use of a monoclonal antibody in an enzyme immunoassay of the detection of Bonamia ostreae in the hemolymph of flat oysters Ostrea edulis. European Association of fish pathologists conference, Bergen Norway, August 31 -September 3
- COMPS, M., 1983. Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. Thèse, Doct. Etat Sci. Nat. Montpellier, 128 pp.
- COMPS, M. et DUTHOIT, J.L., 1976. Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huître portugaise Crassostrea anquilata Lmk. *C.R. Acad. Sci. Paris* 283 D : 1595-1596
- DINAMANI, P., HINE, P.M. and JONES, J.B.. The occurrence and characteristics of the hemocyte parasite, Bonamia ostreae, in New Zealand dredge oyster, Tiostrea lutaria. In press.
- ELSTON, R.A., FARLEY, C.A. and KENT M.L., 1986. Occurrence and significance of bonamiosis in European flat oysters Ostrea edulis in North America. *Diseases of aquatic organisms*, 2 : 49-54

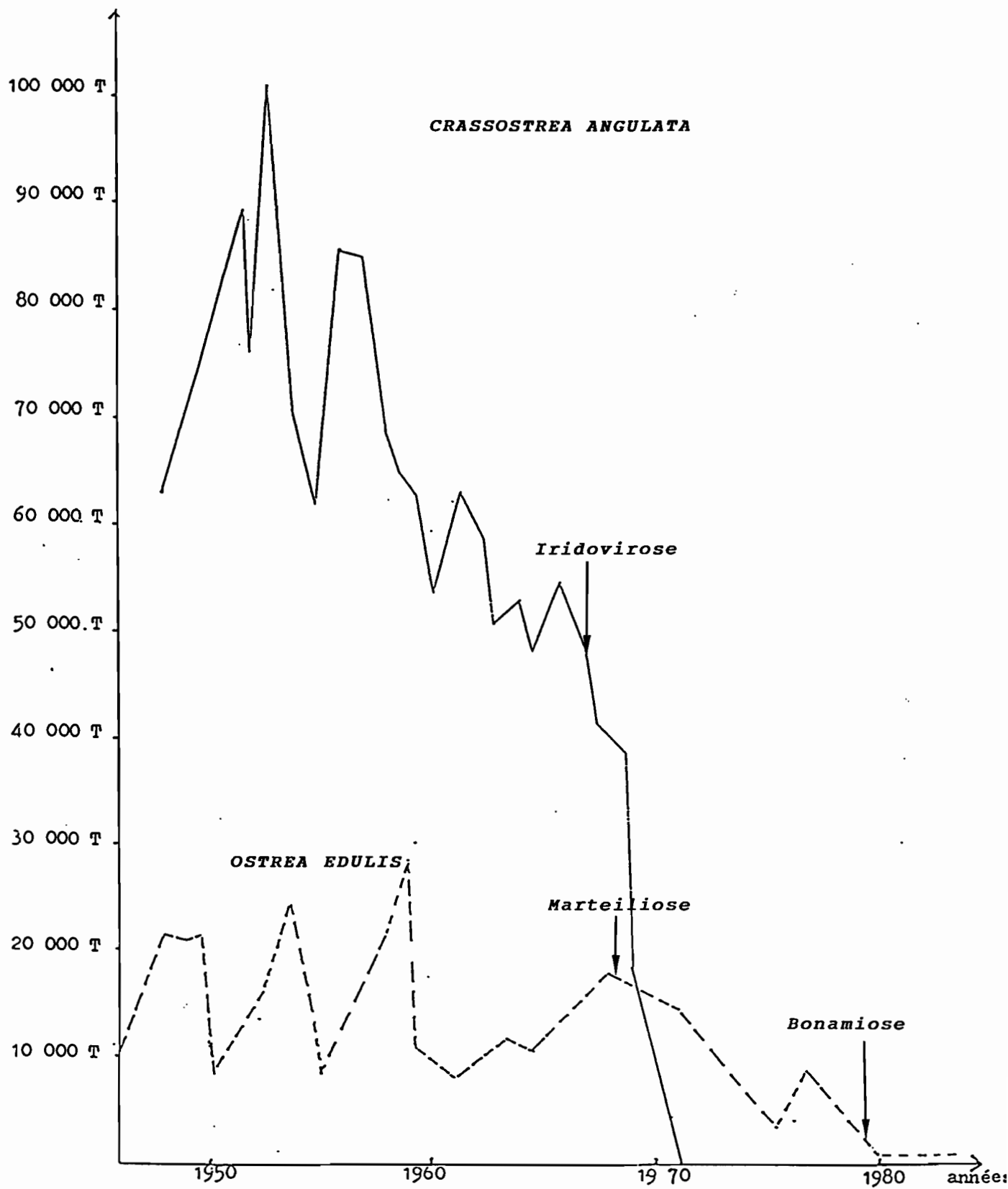
- HOLLINGDALE, M.R., NARDIN, E.M., THARAVANIJ, S., SCHWARTZ, A.L. and NUSSENZWEIG, R.S., 1984. Inhibition of entry of Plasmodium falciparum and P.vivax sporozoites into cultured cells ; an in vitro assay of protective antibodies. J. Immunology, 132 : 909-913
- GRIZEL, H., 1985. Etude des récentes épizooties de l'huitre plate Ostrea edulis Linné et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse, Doct. Etat sci. Nat. Montpellier, 145 pp
- JENSEN, J.B., 1983. In vitro cultivation of protozoan parasites. C.R.C Press, 251 pp
- KINNE, O., 1983. In "Diseases of marine animals. Volume II. Introduction, Bivalvia to Scaphopoda". Biologische anstalt helgoland. Hamburg, Fédéral République of Germany, 477-789
- LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E.G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R., LOM III, J., LYNN, D., MERINFIELD, E.G., PAGE, F.C., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J. and WALLACE, F.G., 1980. A Newly Revised Classification of the Protozoa. J. Protozool., 27 : 37-58
- LISSNER, C.R., SWANSON, R.N. and O'BRIEN, A.D., 1983. Genetic control of the innate resistance of mice to Salmonella typhimurium : expression of the I_{ty} gene in peritoneal and splenic macrophages isolated in vitro. J. Immunol., 131 : 3006-3013
- MAUEL, J., 1984. Mechanisms of survival of protozoan parasites in mononuclear phagocytes. Parasitology, 88 : 579-592
- MEURIOT, E., GRIZEL, H., 1984. Note sur l'impact économique des maladies de l'huitre plate en Bretagne. Rapport ISTPM n°12, 1-20
- MIALHE, E., BACHERE, E., CHAGOT, D., GRIZEL, H.. Isolation and purification of the protozoan Bonamia ostreae (Pichot and coll., 1979), a parasite affecting the flat oyster Ostrea edulis L. (in preparation)
- MIALHE, E., BOULO, V., COCHENNEC, N., GRIZEL, H., ROGIER, H., CLAVIES, C., HERVAUD, E., PAU, B., PUYGRENIER, M. and PAOLUCCI, F., 1987. Monoclonal antibodies against Bonamia ostreae protozoan parasite of the flat oyster Ostrea edulis. European Association of fish pathologist conference, Bergen Norway, August 31 - September 3, 1987
- MIALHE, E., BOULO, V., ELSTON, R.A., HILL, B., HINE, P.M., MONTES, J., VAN BANNING, P. and GRIZEL, H.. Serological analysis of Bonamia in Ostrea edulis and Tiostrea lutaria using polyclonal and monoclonal antibodies. In preparation
- MOULDER, J.W., 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. Microbiological Rev. 49 : 298-337

- OLIVIER, M. and TANNER, C.E., 1987. Susceptibilities of macrophage populations to infection in vitro by Leishmania donovani. Infect. Immunity, 55 : 467-471
- OSUNA, A., GAMARRO, F., CASTANYS, S. and RUIZ-PEREZ, L.M., 1986. Inhibition of lysosomal fusion by Trypanosoma cruzi in peritoneal macrophages. International J. for Parasito. 16, 6 : 629-632
- PARKS, D.R., BRYAN, V.M., OI, V.T. and HERZENBERG, L.A., 1979. Antigen specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence activated cell sorter (FACS). Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A), 76 : 1962
- PICHOT, Y., COMPS, M., TIGE, G., GRIZEL, H. et RABOUIN, M.A., 1980. Recherches sur Bonamia ostrea, gen. n. sp. n., parasite nouveau de l'huître plate Ostrea edulis L. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43 : 131-140
- SMNINIA, T. and VAN DER KNAAP, W.P.W., 1987. Cells and molecules in molluscan immunology. Dev. Comp. Immunol. 11 : 17-28
- STUART, J., Mc ROBBIE and NEWELL, P.C., 1985. Effects of Cytochalasin B on cell movements and chemoattractant-elicited actin changes of Dictyostelium. Exp. Cell Res., 160 : 275-286
- TRAGER, W., 1983. In vitro growth of parasites, in "Molecular Biology of Parasites", GUARDIOLA J., LUZZATO L. and TRAGER W., Eds, Raven Press, 39-51
- VUILLEMIN, V., 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 pp 29, U.E.R. d'Aix-Marseille II.
- ZINGALES, B. and COLLI, W., 1985. Trypanosoma cruzi : interaction with host cells. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 117 : 129-152

A N N E X E S



Impact des épizooties
sur les productions ostréicoles françaises.



Impact des épizooties
sur les productions ostréicoles françaises.

Exemples d'épizooties
ANNEXE II

ANNEE	ESPECE	AGENT	PAYS	IMPACT ECONOMIQUE pertes en %
1945-1955	<i>C.gigas</i>	?	Japon	60
1961→	<i>C.gigas</i>	?	Japon	40-60
1963-1969	<i>C.gigas</i>	?	Amér.Nord,côte W	50-60
1957→	<i>C.virginica</i>	<i>Minchinia nelsoni</i> (<i>Ascetospora</i>)	Amér.Nord,côte E	
1960→	<i>C.virginica</i>	<i>Haplosporidium costale</i> (<i>Ascetospora</i>)	Amér.Nord,côte E	50
1967-1973	<i>C.angulata</i>	Iridovirus	France	100
1969→	<i>O.edulis</i>	<i>Marteilia refringens</i> (<i>Ascetospora</i>)	France	} >90
1979→	<i>O.edulis</i>	<i>Bonamia ostreae</i> (<i>Ascetospora</i>)	France Europe,Am.Nord côte W Nouvelle-Zélande	

GROUPES

ESPECES-HOTES

- VIRUS	Papovaviridae	C. gigas, C. commercialis O. edulis, O. lurida
	Herpetoviridae	O. edulis, C. virginica
	Togaviridae	O. lurida
	Retroviridae	C. virginica
	Iridoviridae	C. angulata, C. gigas
- PROCARYOTES	Rickettsies	C. virginica, C. gigas O. edulis
	Chlamydies	C. angulata
	Mycoplasmes	C. virginica
	Bactéries	C. virginica
- PROTOZOAIRE	Perkinsus	C. virginica
	Marteilia	O. edulis, C. commercialis
	Minchinia	C. virginica
	Haplosporidium	C. gigas, O. edulis, O. angasi
	Bonamia	O. edulis, Tiostrongia lutaria
- METAZOAIRE	Mytilicola	C. gigas

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

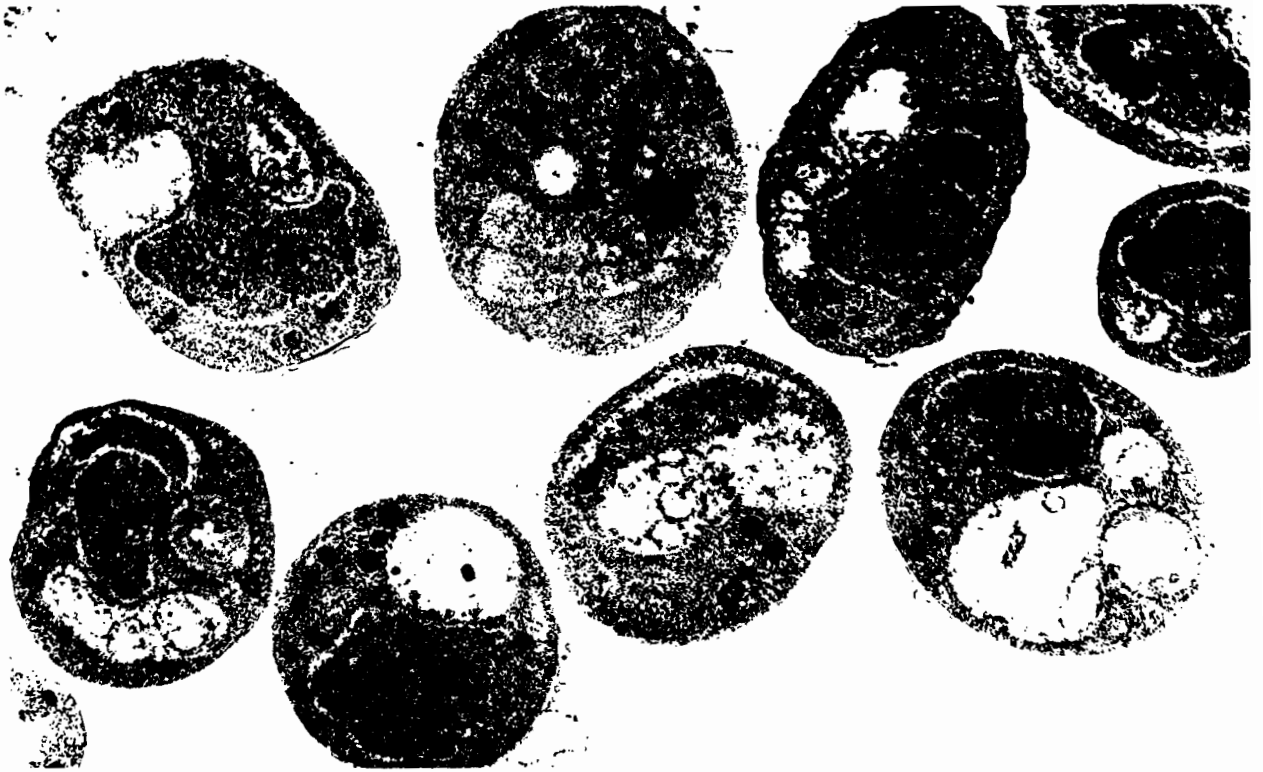
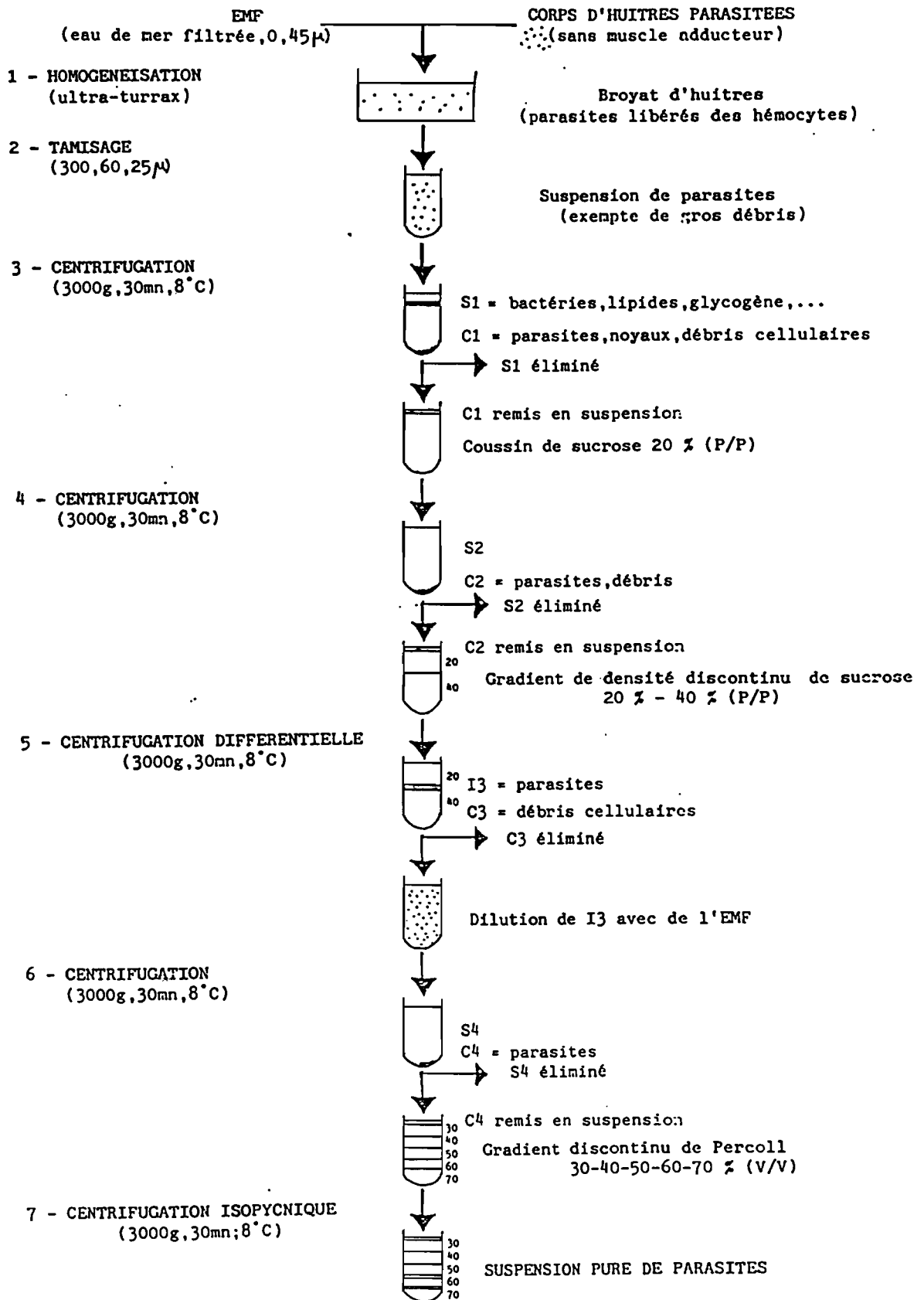


Fig. 1a: *Bonamia ostreae*: cellules purifiées (X 20000)



Fig. 1b: ultrastructure du parasite (cellules purifiées); corps denses (cd) haplosporosomes (h); mitochondries (mt); (X 33000)



PROTOCOLE DE PURIFICATION DE BONAMIA OSTREAE

☐ Localisation des parasites

(Si = surnageant ; Ii = interface ; Ci = culot)

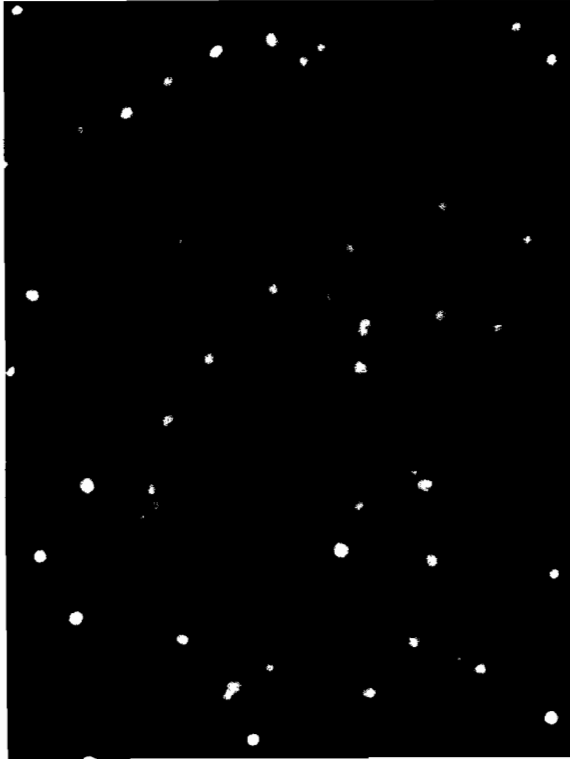


Fig. 2a: test de viabilité de Bonamia ostreae (X 1000)

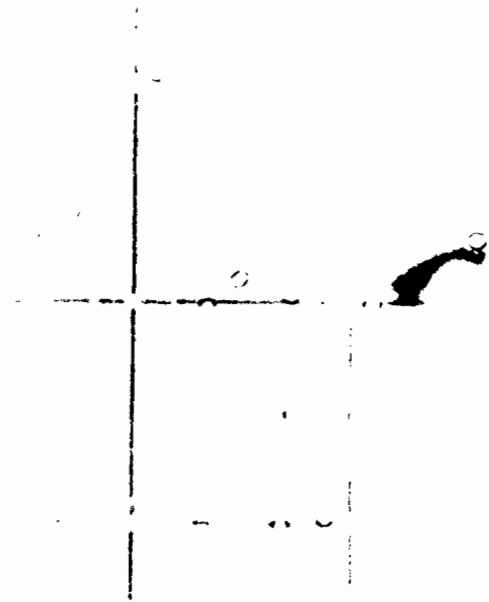


Fig. 2b: comptage de B. ostreae à la cellule de Malassez (X 1000)

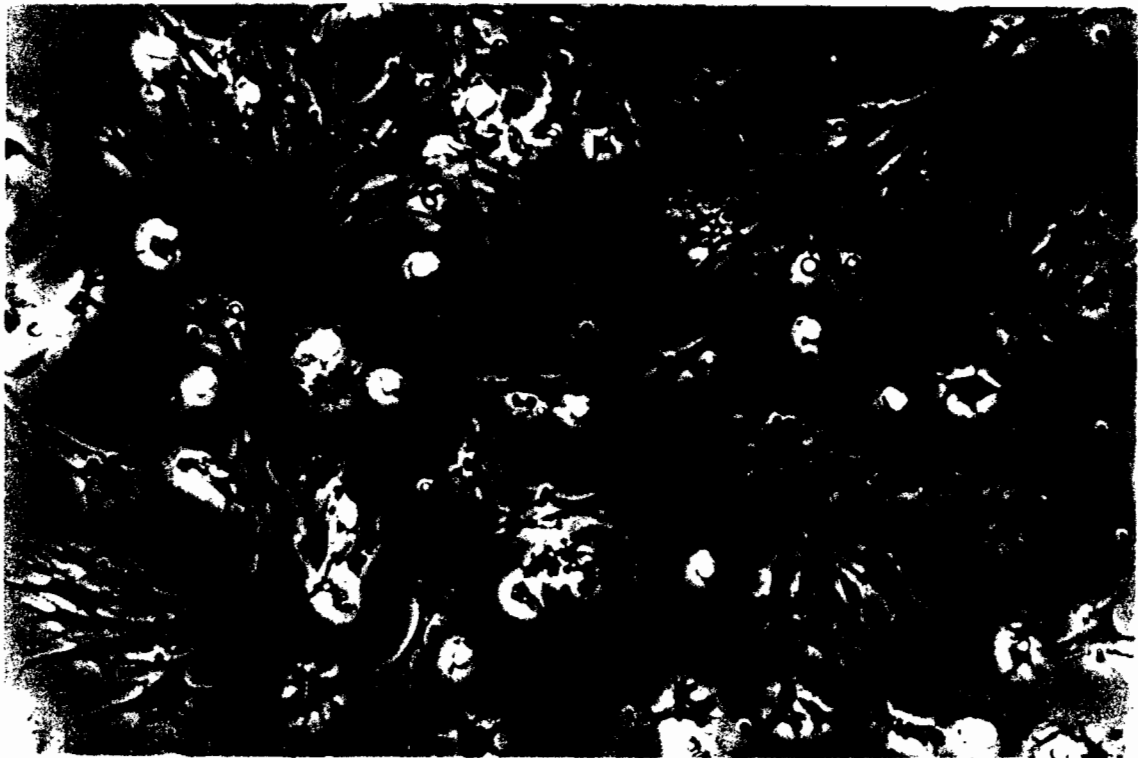
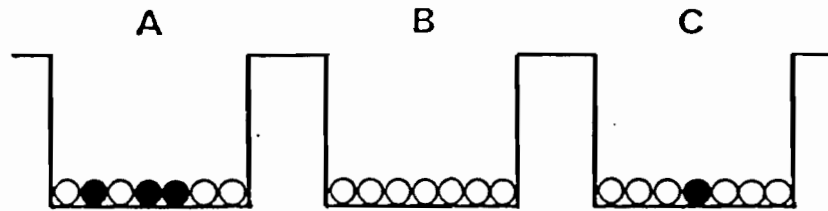


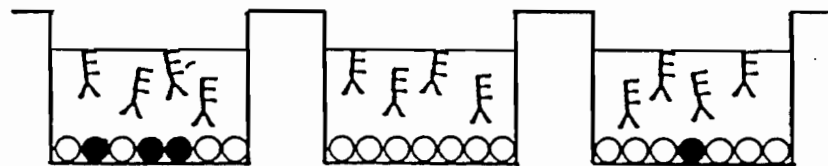
Fig. 3: primoculture d'hémocytes de Crassostrea gigas, contraste de phase (X 800)

MILIEU DE CULTURE

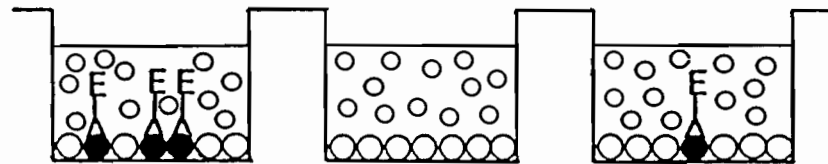
Composants	Concentrations / L.
milieu RPMI 1640	7,5 g
milieu 199 avec sels de Earle	7,5 g
taurine	2,5 mg
glucose	5 g
galactose	1 g
tréhalose	1 g
NaHCO ₃	850 mg
sea salts	22,25 g
CaCl ₂	580 mg
lactalbumine	4,5 g
yeast autolysate	440 mg
sérum de veau foetal	150 ml
pénicilline	150 mg
ampicilline	150 mg
kanamycine	150 mg
pression osmotique: 1000 mOsm.	
pH: 7,8	



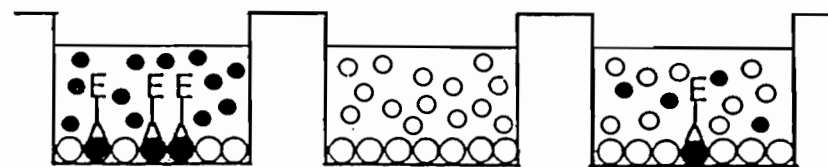
1. Dépôt de l'échantillon



2. Addition d'anticorps monoclonaux (MAB) couplés à l'enzyme



3. Lavage pour éliminer les MAB non fixés
Addition du substrat de l'enzyme



4. La quantité de substrat transformé en produit coloré est proportionnelle à la quantité de parasites présents dans l'échantillon

PRINCIPE D'IMMUNODOSAGE ENZYMATIQUE
DE B.OSTREAE (TYPE DIRECT).



Fig. 4: primoculture d'hémocytes de C. gigas, coloration Hémacolor
(X 1200)

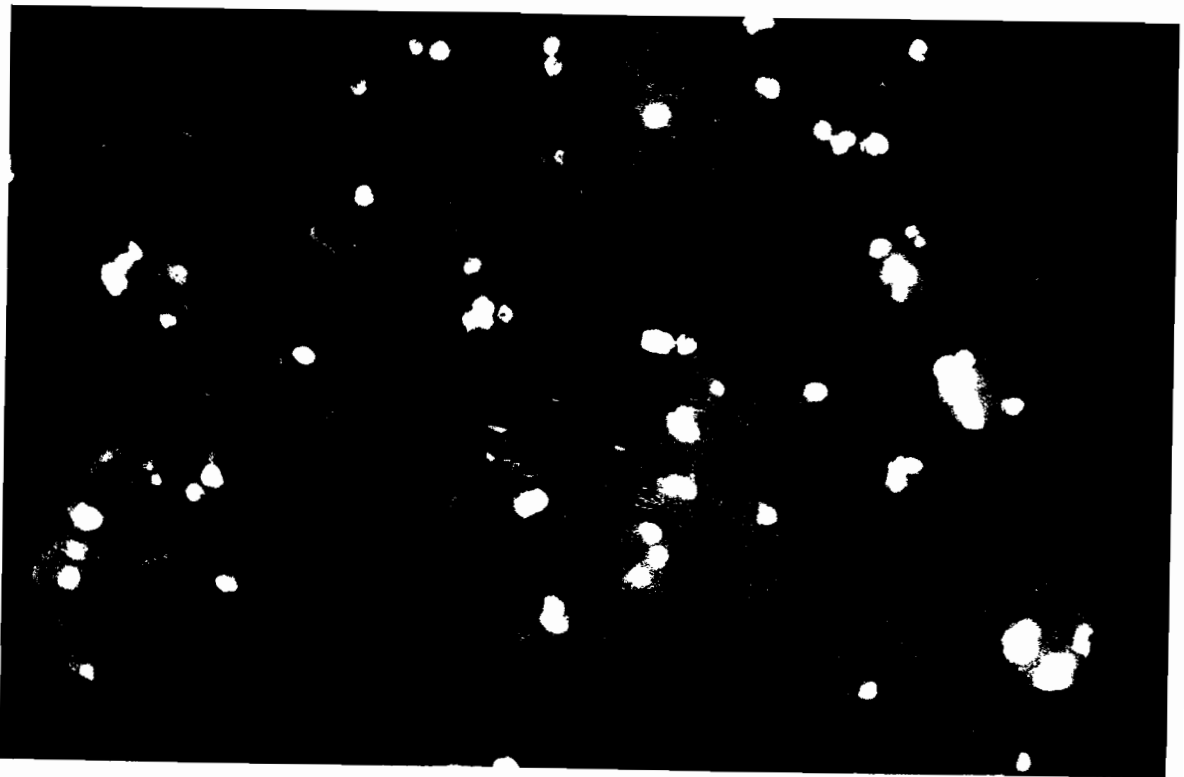


Fig. 5: primoculture d'hémocytes d'O. edulis, immunofluorescence
(X 1000)

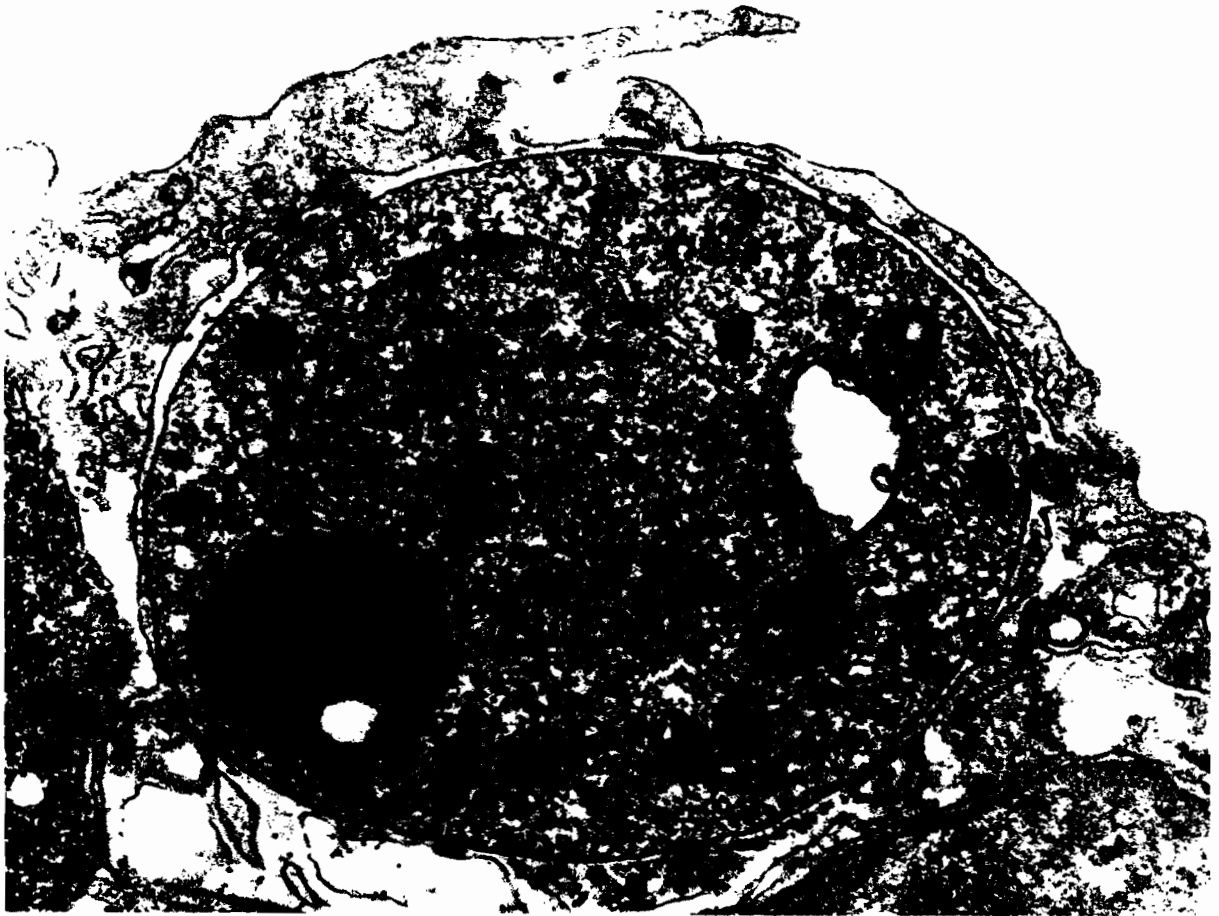


Fig. 6: phagocytose d'un parasite (B. o.) par un granulocyte (G)(X 40000)



Fig. 7: lysosomes (L) accolés au phagosome (P)(X 150000)



Fig. 8: dégénérescence du parasite (B. o.)(X 37000)

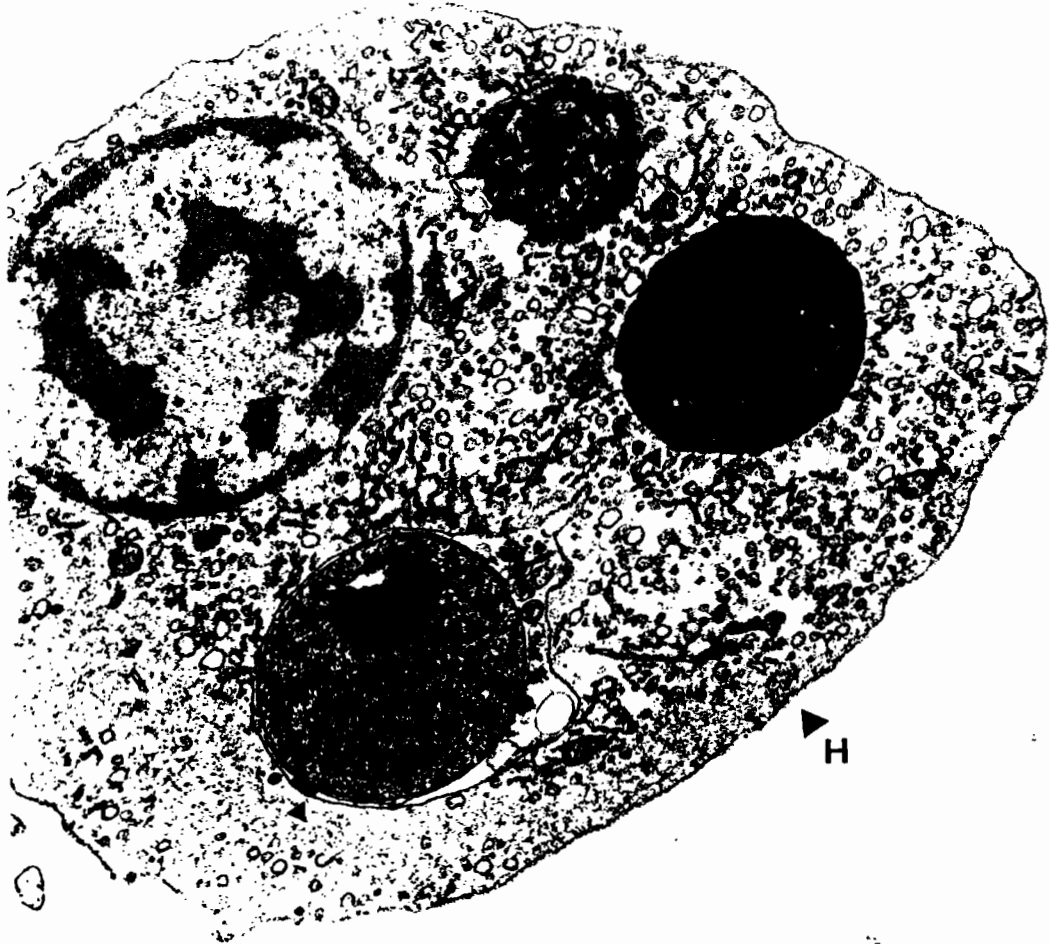


Fig. 9: hyalinocyte (H) parasité par B. ostreae (B. o.), (2 h.)
(X 16000)



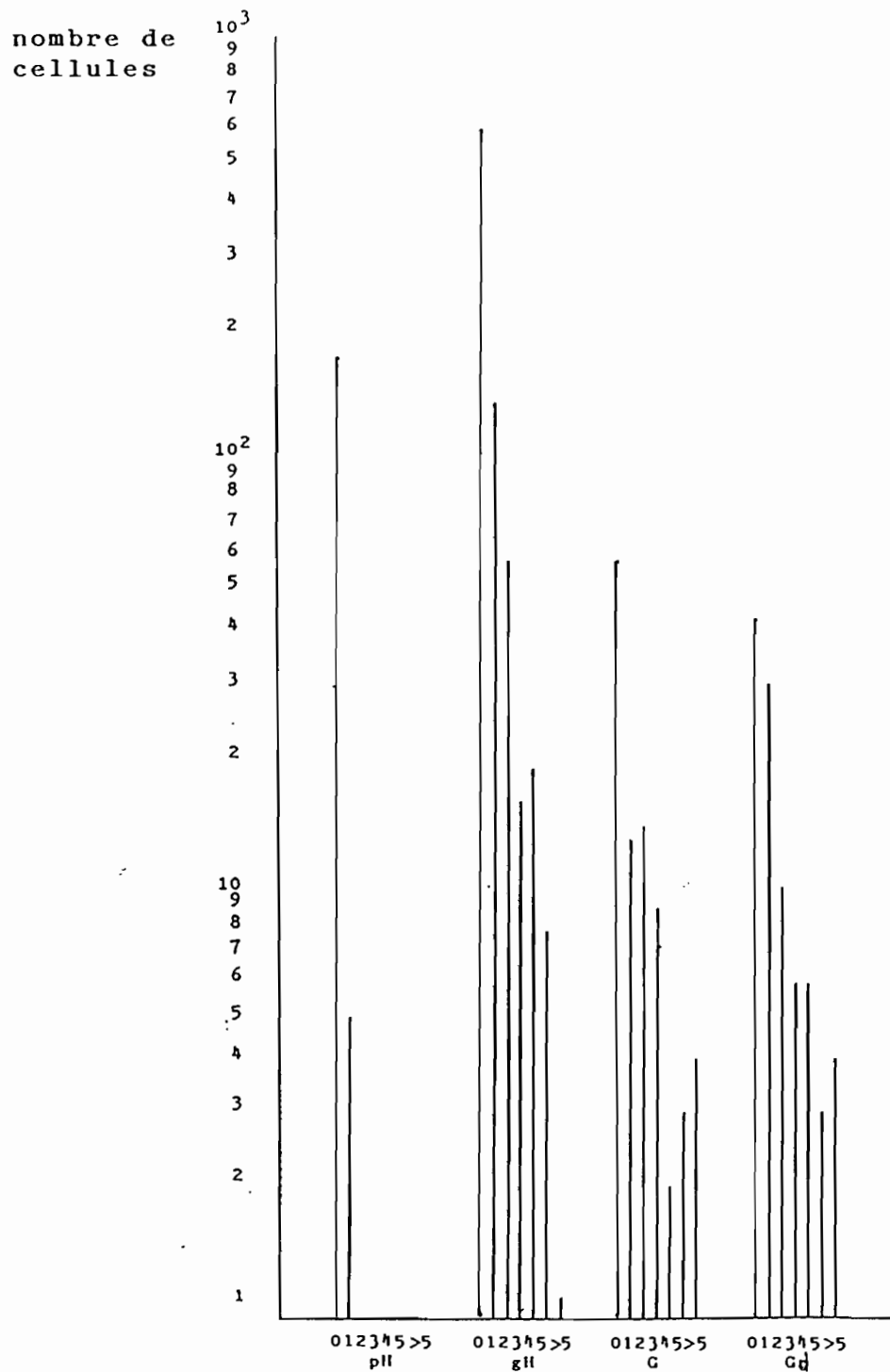
Fig. 10: B. ostreae (B. o.)
dans vacuole para-
sitophore (V) (X 25000)



Fig. 11: B. ostreae (B. o.)
libre dans le cyto-
plasma (C) (X 25000)

OSTREA EDULIS										
N° de l'expérience	Titre de l'expérience	Durée de l'expérience	Cellules d'un type en % Cellules totales				Cellules parasitées en % Cellules du même type $\left(\frac{\text{Cellules parasitées}}{\text{Cellules totales}} \right)$			
			petits hyalinocytes	grands hyalinocytes	granulocytes	granulocytes dégranulés	petits hyalinocytes	grands hyalinocytes	granulocytes	granulocytes dégranulés
1	Cinétique de pénétration	30 mn	18	62	16	2	0 (0)	21 (13)	19 (3)	5 (0)
		2 h	14	65	19	2	1 (0)	17 (12)	39 (7)	44 (1)
2	Traitement Anticorps Monoclonaux	Témoin 2 h	10	77	13	1	3 (0,3)	25 (19)	57 (7)	87 (1)
		2 h	18	73	9	0	0 (0)	13 (9)	17 (2)	66 (0)
3	Traitement Cytochalasine B	Témoin 2 h	12	78	6	4	8 (1)	36 (28)	57 (3)	65 (3)
		Témoin avec DMSO 2 h	15	68	9	9	3 (0)	27 (18)	45 (4)	58 (5)
		2 h	15	83	1	1	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)
4	Cinétique de développement	2 h	17	52	26	5	1 (0,2)	33 (17)	36 (9)	51 (3)
		24 h	24	66	6	4	2 (0,5)	38 (2)	39 (1)	29 (1)
		48 h	15	84	0	1	0 (0)	8 (7)	0 (0)	22 (0)
5	Cinétique de développement	2 h	17	72	8	2	2 (0,3)	23 (16)	37 (3)	83 (2)
		72 h	25	70	1	3	1 (0,3)	18 (13)	0 (0)	45 (1)
		96 h	9	88	1	3	0 (0)	6 (5)	0 (0)	40 (1)

CRASSOSTREA GIGAS										
N° de l'expérience	Titre de l'expérience	Durée de l'expérience	Cellules d'un type en % Cellules totales				Cellules parasitées en % Cellules du même type $\left(\frac{\text{Cellules parasitées}}{\text{Cellules totales}} \right)$			
			petits hyalinocytes	grands hyalinocytes	granulocytes	granulocytes dégranulés	petits hyalinocytes	grands hyalinocytes	granulocytes	granulocytes dégranulés
1	Cinétique de pénétration	30 mn	12	68	12	8	12 (1)	15 (10)	73 (9)	70 (6)
		2 h	13	64	17	6	10 (1,3)	19 (12)	67 (11)	62 (4)
2	Traitement Anticorps Monoclonaux	Témoin 2 h	6	88	3	3	11 (1)	29 (26)	66 (2)	42 (1)
		2 h	6	89	4	1	2 (1)	21 (19)	50 (2)	55 (0,5)
3	Traitement Cytochalasine B	Témoin 2 h	8	78	10	4	22 (2)	24 (19)	72 (7)	69 (3)
		Témoin avec DMSO 2 h	12	68	10	9	25 (3)	19 (13)	70 (7)	62 (6)
		2 h	7	87	1	5	1 (7)	7 (6)	0 (0)	0 (0)
4	Cinétique de développement	2 h	10	61	17	12	8 (0,8)	16 (10)	62 (11)	68 (8)
		24 h	11	82	7	0	9 (1)	10 (9)	30 (2)	0 (0)
		48 h	16	80	3	1	0 (0)	9 (9)	33 (1)	62 (0,6)
5	Cinétique de développement	2 h	5	75	18	2	14 (0,7)	20 (15)	59 (11)	62 (1)
		72 h	8	84	8	0	1 (0,3)	7 (6)	50 (4)	0 (0)
		96 h	3	93	4	0	0 (0)	2 (2)	55 (2)	0 (0)



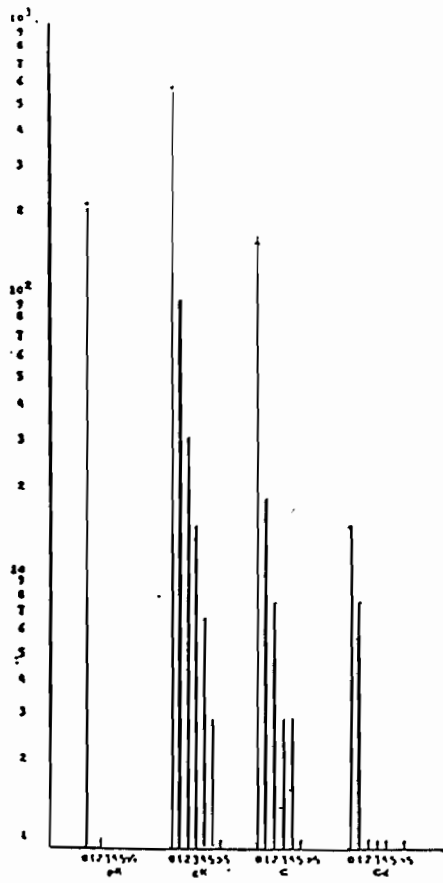
pH : petits hyalinocytes

gH : grands hyalinocytes

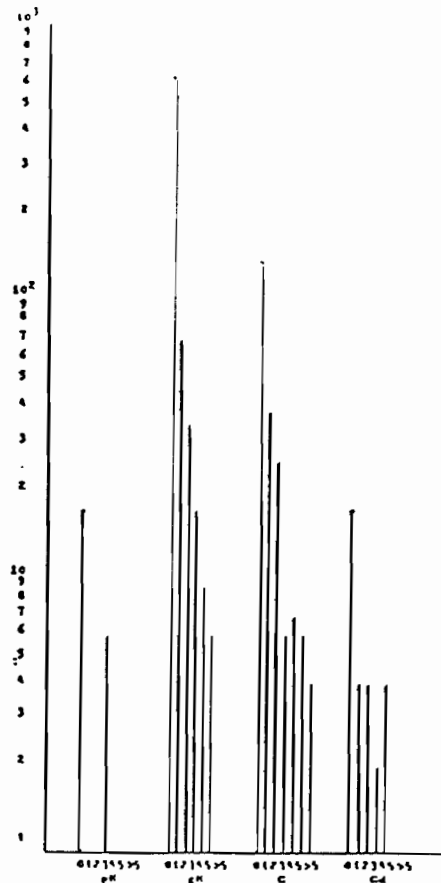
G : granulocytes

Gd : granulocytes dégranulés

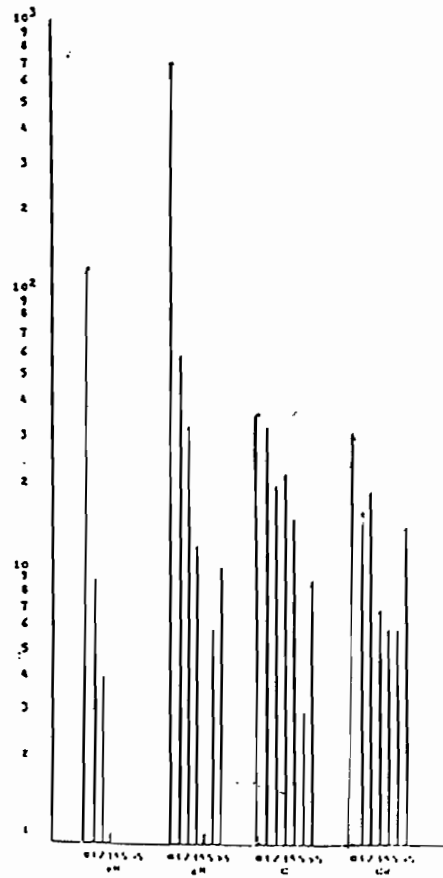
0, 1, 2, 3, 4, 5 et >5 : nombre de parasites par cellule



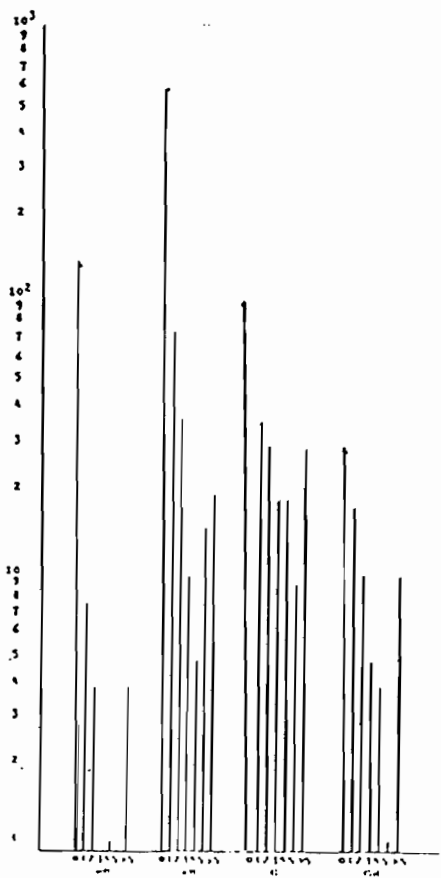
O. edulis: 30 mn



O. edulis: 2 h

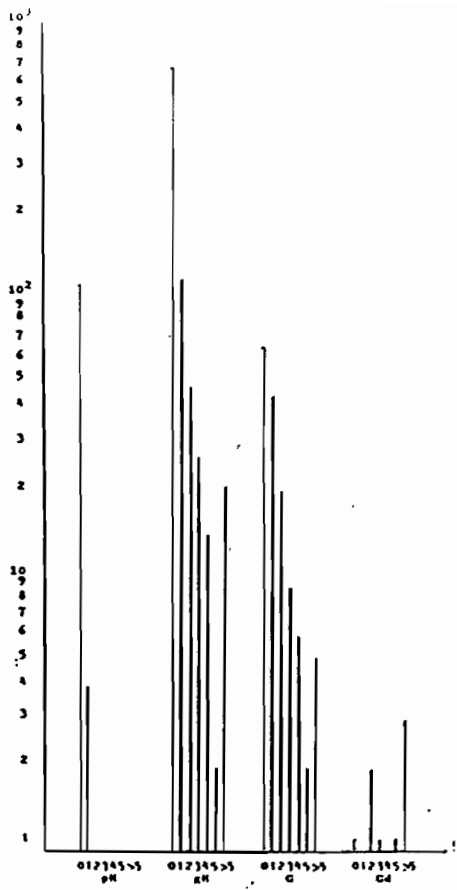


C. gigas: 30 mn

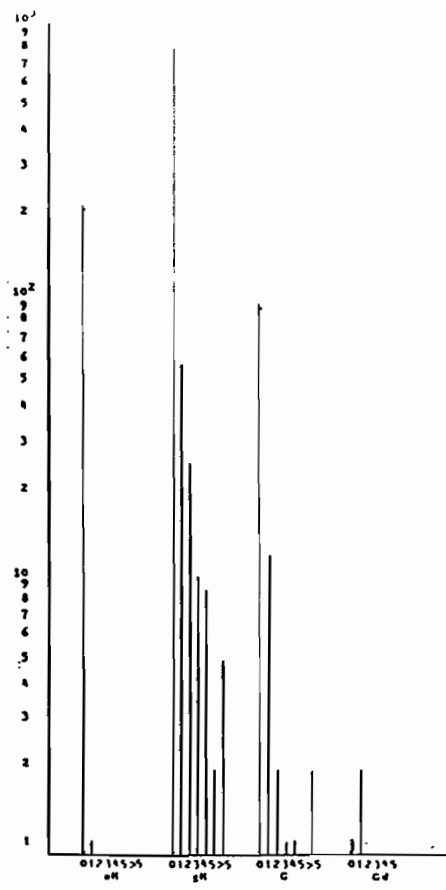


C. gigas: 2 h

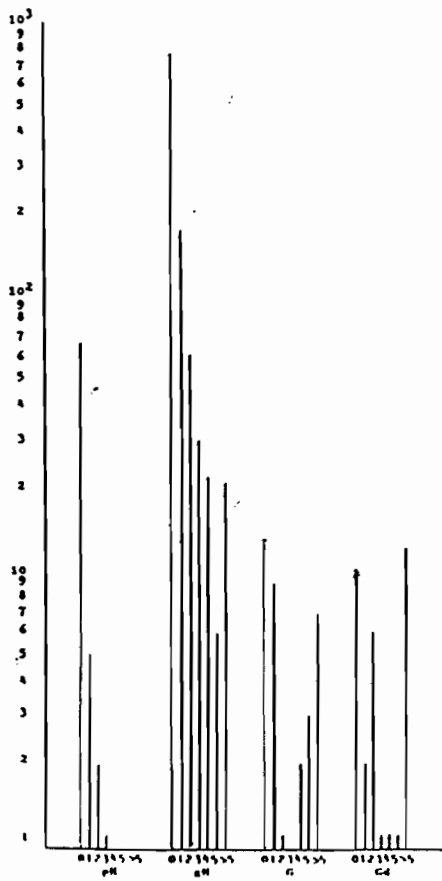
Exp 1, cinétique de pénétration



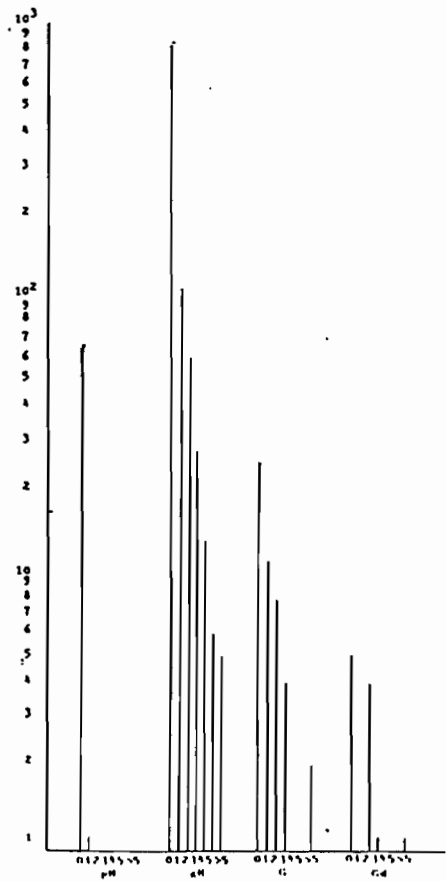
O. edulis: témoin



O. edulis: Ac mono

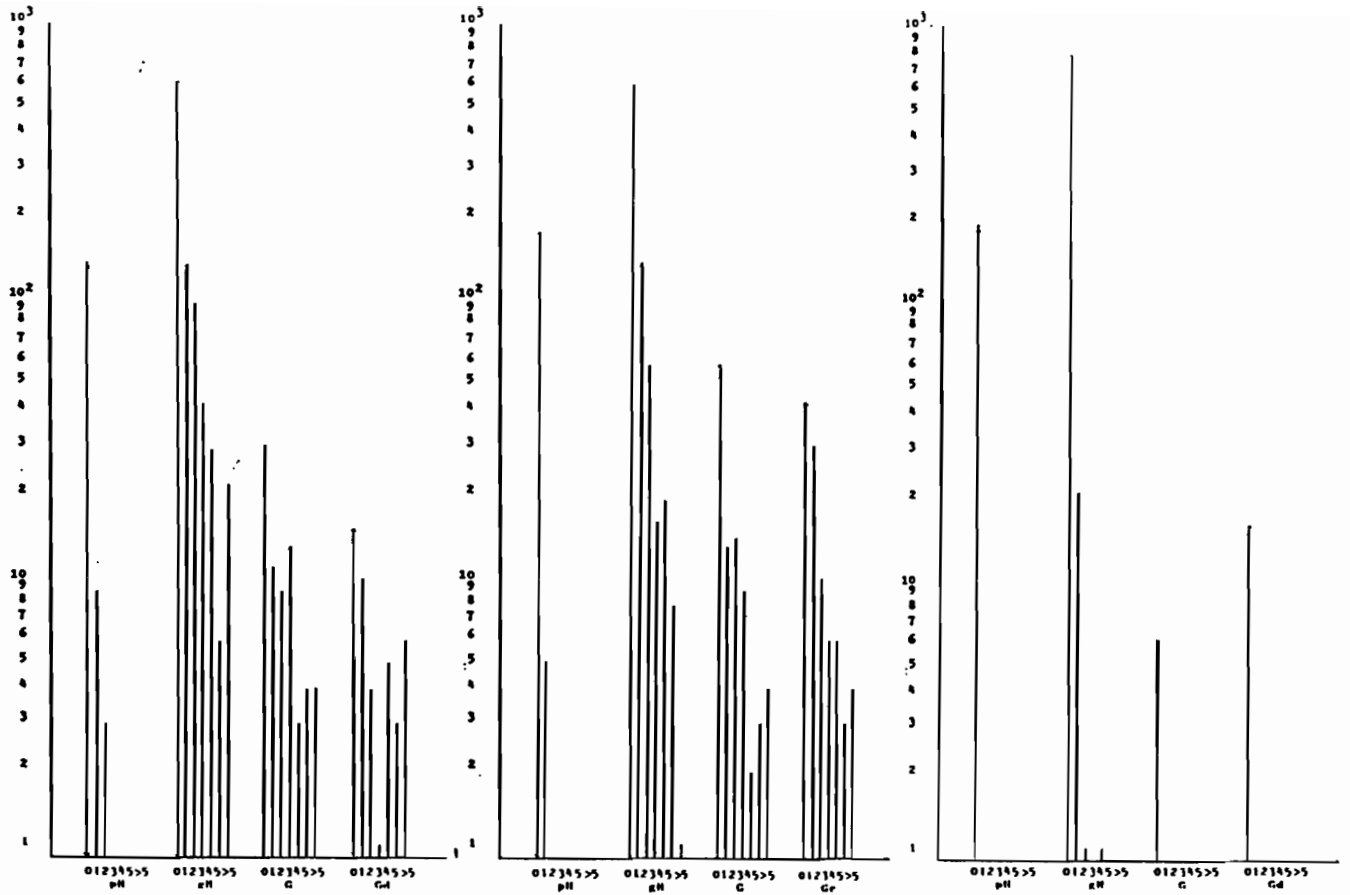


C. gigas: témoin



C. gigas: Ac mono

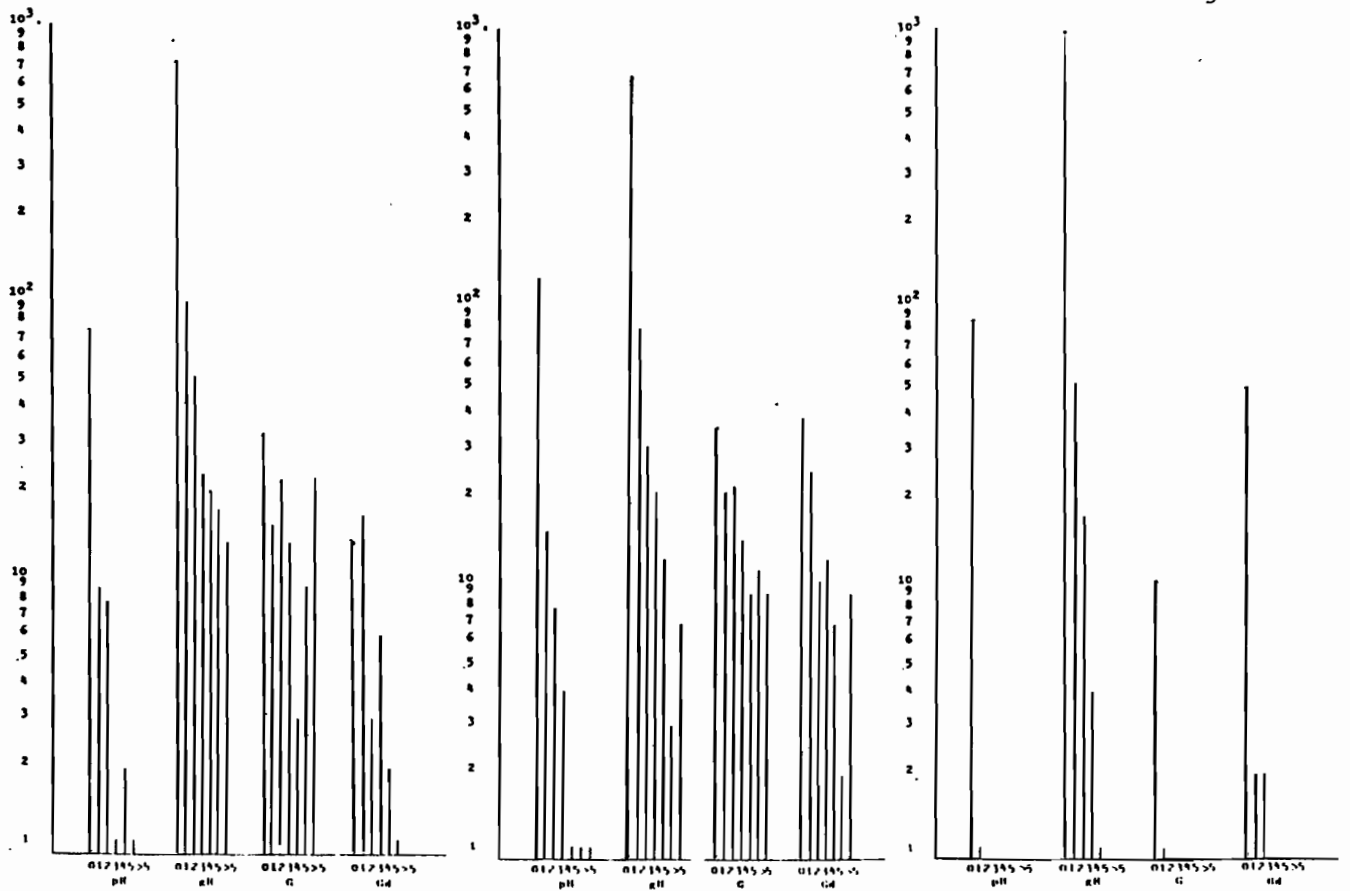
Exp 2: traitement anticorps monoclonaux



O. edulis: témoin

O. edulis: témoin DMSO

O. edulis: cyto. B

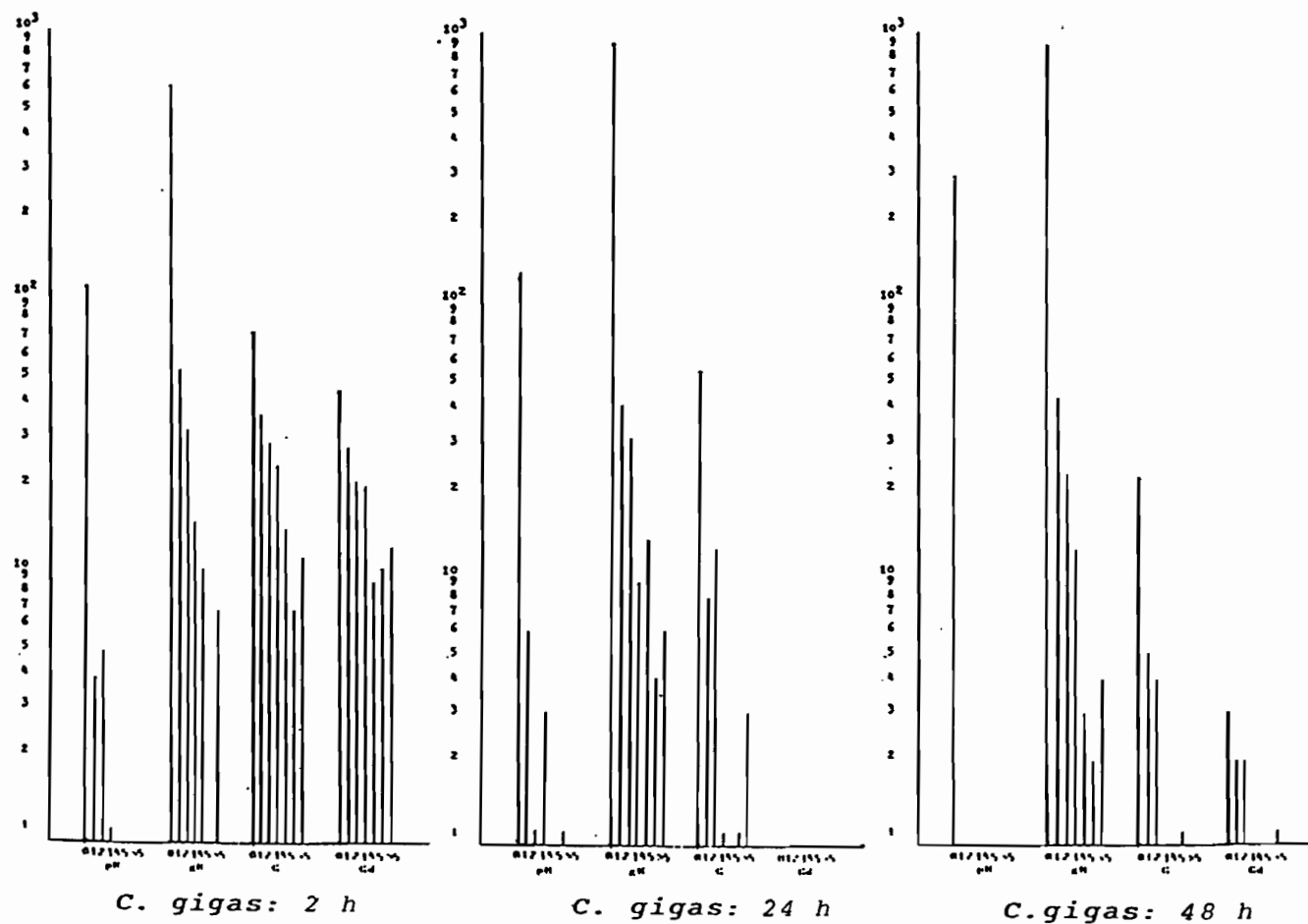
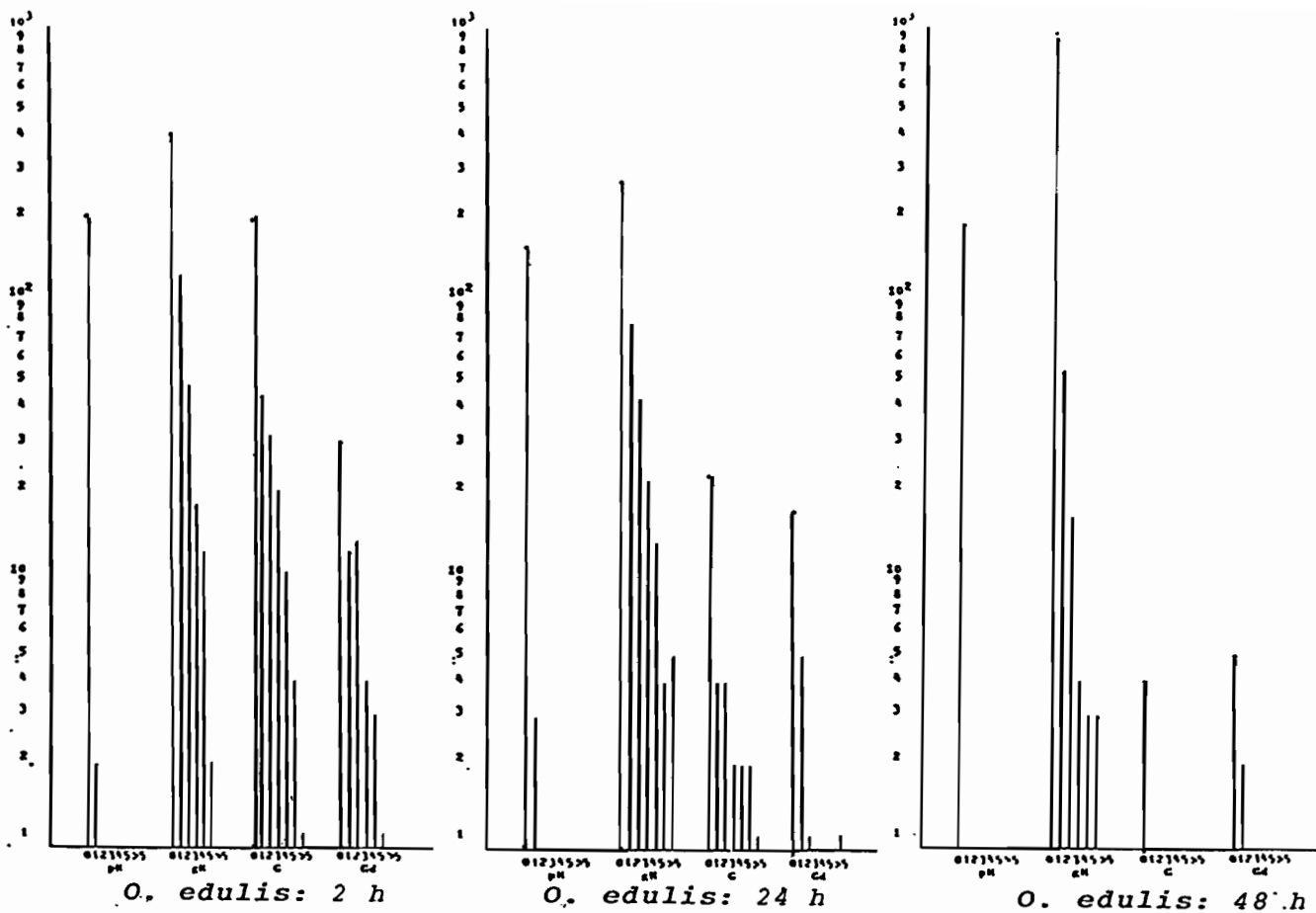


C. gigas: témoin

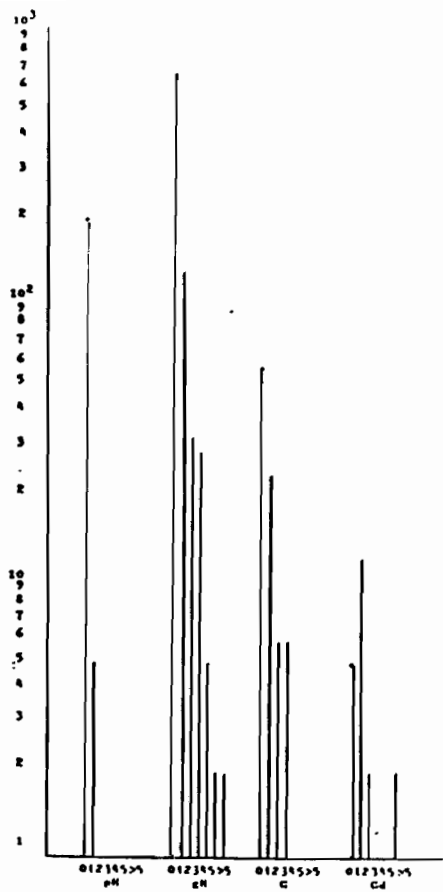
C. gigas: témoin DMSO

C. gigas: cyto. B

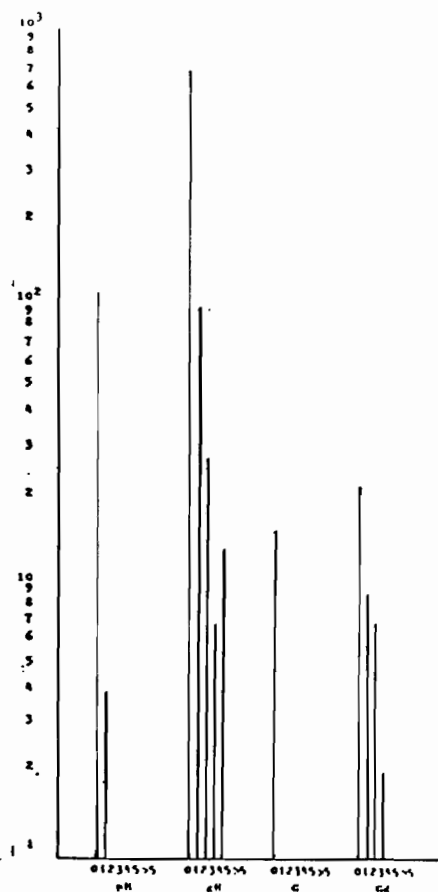
Exp. 3: traitement cytochalasine B



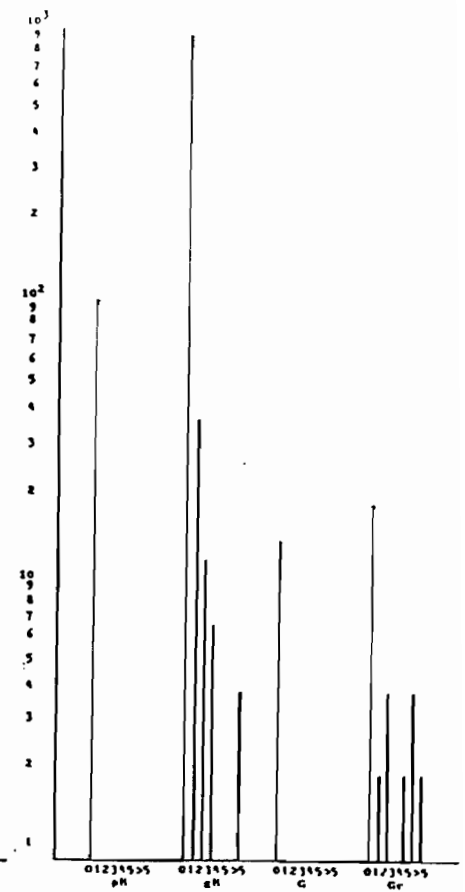
Exp. 4: cinétique de développement



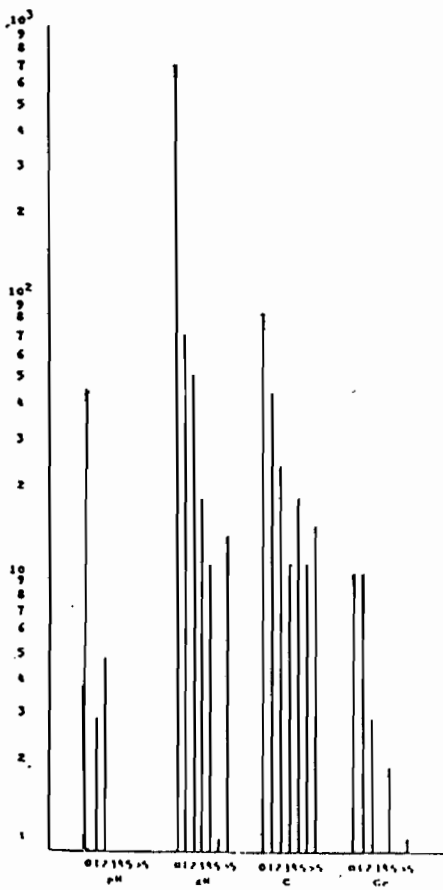
O. edulis: 2 h.



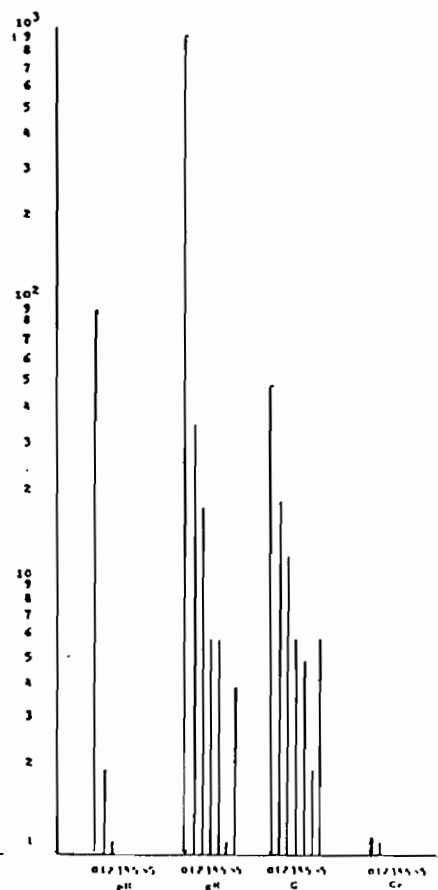
O. edulis: 72 h.



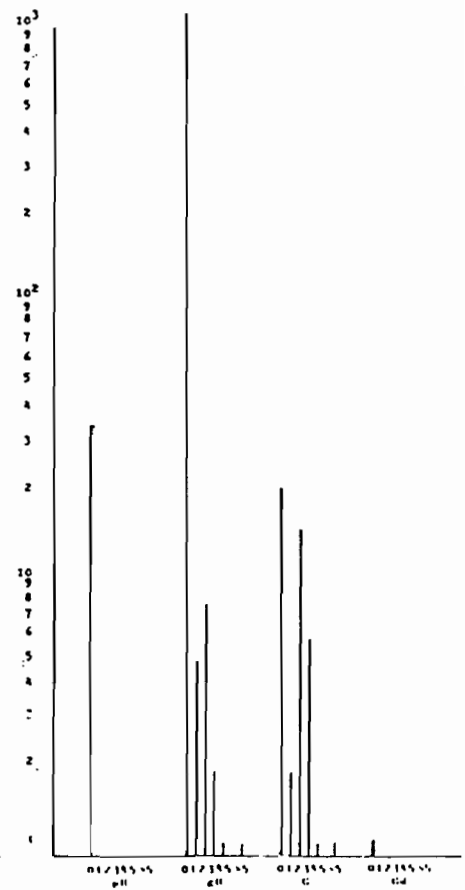
O. edulis: 96 h.



C. gigas: 2 h.



C. gigas: 72 h.



C. gigas: 96 h.

Exp. 5, cinétique de développement.

RESUME

L'ostréiculture mondiale subit l'impact de nombreuses épizooties, en majorité provoquées par des protozoaires du Phylum des Ascetospora. Parmi ceux-ci, Bonamia ostreae constitue un modèle de choix pour étudier, à l'échelle cellulaire, les relations hôte-parasite mais aussi le rôle immunitaire des hémocytes. En effet ce parasite, qui se multiplie dans les hémocytes d'Ostrea edulis, ne se développe pas chez Crassostrea gigas. Dans ce travail, est décrite la mise au point d'un modèle d'étude in vitro hémocyte-Bonamia. Il repose sur l'élaboration et maîtrise de diverses méthodologies : établissement de primocultures, protocole d'infection par des parasites purifiés, analyses histologiques et immunoenzymatiques des infections. L'utilisation de ce modèle a permis l'étude des interactions hôte-parasite telles que reconnaissance, pénétration et survie intracellulaire.

SUMMARY

Oyster culture is, at a world scale, hit by various epizooties, which are mainly caused by protozoans of the Phylum Ascetospora. Among them, Bonamia ostreae constitutes an appreciated model in order to study, at the cell scale, host-parasite relationships, as well as the immune role of hemocytes. Indeed, this parasite, which reproduces in hemocyte of Ostrea edulis, but cannot develop in Crassostrea gigas.

Development of an in vitro model for hemocyte-Bonamia relationships is presented. This includes the development and implementation of various techniques : making primocultures, protocol for infection with purified parasites, histological and immunoenzymatic analyses of infection.

Such model allowed to study the interaction between host and parasites, such as recognition, penetration and intracellular survival.