

EB.

Contrat C.N.E.X.O. - I.S.T.P.M.

n° 82/2787

MISE AU POINT DE TECHNIQUES D'ISOLEMENT
DE PARASITES

COMPTE RENDU D'ACTIVITE

par

BACHERE Evelyne

GAGNERAUD Sylvie

AUDIC Guylaine

Chef de thème responsable : GRIZEL Henri

Laboratoire de Pathologie

I.S.T.P.M.

B.P. 26

12, rue des Résistants

56470 LA TRINITE SUR MER

1. INTRODUCTION

2. OBJECTIFS DU CONTRAT

3. RESULTATS

3.1. Maintenance des huîtres en laboratoire

3.2. Biopsie

3.3. Techniques de contrôle des maladies

3.4. Reproductibilité des maladies en laboratoire

3.4.1. Méthodes

3.4.2. Résultats

3.5. Isolement de Bonamia ostreae

3.5.1. Isolement par centrifugation en gradient de densité

3.5.1.1. Technique d'isolement

3.5.1.2. Contrôle des parasites isolés

3.5.1.3. Résultat

3.5.1.4. Discussion

3.5.2. Culture in vitro de Bonamia ostreae

3.5.3. Contrôle de la pathogénicité de Bonamia ostreae isolé

3.5.3.1. B. ostreae isolé sur gradient de densité

3.5.3.2. B. ostreae produit in vitro

3.5.3.3. Conclusions

4. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

RESUME

Les recherches faisant l'objet de ce contrat ont porté sur la mise au point de techniques adaptées aux Bivalves marins et à l'étude du parasite Bonamia ostreae responsable de la maladie hémocytaire de l'huître plate, Ostrea edulis.

Au terme d'essais entrepris depuis plus d'un an, nous avons vérifié que la maladie est reproductible en laboratoire. La méthode de contamination par injection de parasites dans la masse viscérale des huîtres semble plus efficace et rapide que la méthode de contamination par proximité d'huîtres parasitées et d'huîtres saines : par la suite, elle a donc été retenue.

Dans ce contrat, nous nous sommes proposés d'isoler Bonamia ostreae afin de contrôler les conditions expérimentales (quantité de parasites injectés...) et de déterminer les mécanismes d'infestation.

Des suspensions cellulaires riches en parasites, obtenues par broyage d'huîtres parasitées, sont centrifugées sur gradient de densité discontinu de Percoll. Bonamia ostreae se concentrerait préférentiellement dans des solutions de 50 % et 60 % de Percoll, soit à des densités de 1,073 et 1,084 g/l pour 30 minutes de centrifugation à 1 300 g. Toutefois, l'isolement n'est pas total : de nombreux parasites restent mêlés aux éléments cellulaires et débris de la suspension, accumulés au dessus du gradient. Ceci peut s'expliquer par un manque de fluidité et d'homogénéité des suspensions cellulaires obtenues. Le problème devra faire l'objet de recherches complémentaires.

Des injections de Bonamia ostreae isolé par cette technique ont conduit à la contamination des huîtres montrant donc que le pouvoir pathogène du parasite n'est pas altéré par les diverses phases de l'isolement.

La technique de culture "in vitro" de Bonamia ostreae mis au point à l'I.S.T.P.M. de Sète par Monsieur COMPS (1983) est rapportée. Des

injections effectuées avec ce parasite n'ont pas donné lieu à ce jour à des contaminations.

Une étude ultrastructurale comparative de Bonamia ostreae "naturel" et isolé à partir de ces deux techniques (centrifugation et culture "in vitro") est entreprise en collaboration avec le laboratoire de Sète. Elle devrait permettre de préciser les facteurs responsables de la pathogénicité de Bonamia ostreae.

Enfin, l'utilisation de suspensions riches et pures en B. ostreae devrait être un support pour des recherches sur la sensibilité des huîtres et leurs mécanismes de défense face à ces agents pathogènes.

1. INTRODUCTION

En France, depuis une quinzaine d'années, la production ostréicole a été gravement perturbée par une succession d'épizooties. Ainsi, l'huître plate, Ostrea edulis, produite essentiellement en Bretagne, a été atteinte d'abord par Marteilia refringens (Grizel et al., 1974) puis par Bonamia ostreae (Pichot et al., 1979).

Suite à ces maladies, des travaux de pathologie ont été entrepris, notamment par l'I.S.T.P.M., et des notions de prophylaxie sanitaire ont pu être appliquées au milieu marin. Ces mesures sont encore cependant insuffisantes et doivent être affinées en fonction des connaissances spécifiques à un parasite donné. Parmi celles-ci, la compréhension des mécanismes d'infestation, du déroulement du cycle et de la reproduction de la maladie s'avère nécessaire pour atteindre le but recherché.

Toutefois, le développement de ces recherches se trouve freiné par l'insuffisance de techniques adaptées et par le manque de connaissances sur la biologie et la physiologie des Mollusques bivalves. Les difficultés inhérentes à ces espèces peuvent permettre d'expliquer le retard accumulé par rapport à d'autres espèces de moindre importance économique. En effet, de par leur morphologie et leur anatomie, les Mollusques bivalves sont difficiles à travailler, présentant des réponses souvent banalisées et nécessitant toujours sur le plan expérimental des mises en oeuvre lourdes et fastidieuses. Si la littérature comprend de nombreux travaux descriptifs, peu de recherches analytiques leur ont été consacrées.

Ce constat et la situation ostréicole actuelle nous ont conduit à élaborer un programme général sur la pathologie des mollusques en vue de définir, à terme, des mesures prophylactiques fiables et adaptées aux élevages.

2. OBJECTIFS DU CONTRAT

Un des objectifs du programme général est de mieux comprendre les mécanismes d'infestation par B. ostreae voire M. refringens. Nous essaierons d'analyser l'importance respective des caractères quantitatifs et qualitatifs des formes infestantes, de la réceptivité des huîtres et des conditions

de l'environnement (température, densité des animaux, stress...) dans la dynamique de la maladie. A terme, le deuxième objectif sera d'étudier les réactions de défense de l'huître face à ces agressions parasitaires.

Pour parvenir à ceux-ci, il est tout d'abord indispensable de maîtriser l'obtention de suspensions purifiées de parasites et de définir les conditions expérimentales les plus performantes et fiables. Ces recherches font l'objet du présent contrat.

3. RESULTATS

3.1. Maintenance des huîtres en laboratoire

Des huîtres plates sont gardées en stabulation au laboratoire durant plusieurs mois dans des bacs de 50 litres d'eau de mer filtrée.

L'alimentation est assurée par un apport journalier de phytoplancton produit en masse. Quatre espèces d'algues unicellulaires sont élevées :

- Tetraselmis suecica
- Dunaliella sp.
- Phaeodactylum tricornatum
- Isochrysis galbana

Nous disposons, en réserve et pour nos essais, des huîtres plates de secteurs parasités par B. ostreae et M. refringens ainsi que d'huîtres de secteurs indemnes des deux ou d'un parasite : Belle Isle, La Rochelle, Odet, Cancale (Pied de Cheval) et Méditerranée.

3.2. Biopsie

Des techniques visant à maintenir les huîtres en vie ont été recherchées. Elles sont applicables uniquement pour le diagnostic de B. ostreae ; celui de M. refringens nécessitant obligatoirement le sacrifice des huîtres.

- Ainsi, l'ouverture d'une fenêtre dans la valve supérieure des huîtres permet de prélever de petits morceaux de feuillets branchiaux pour analyse sans que des mortalités anormales soient constatées. Les tissus ont cicatrisé et, après quelques semaines, les huîtres ont reconstitué leur coquille.

- Par ailleurs, des ponctions d'hémolymphe ont été effectuées sans ouverture des huîtres à partir d'un trou, percé sur la valve droite, ou à partir d'une légère cassure des bordures intervalvaires.

3.3. Techniques de contrôle des maladies

Les maladies dues à B. ostreae et M. refringens sont dépistées couramment sur coupes histologiques de glandes digestives et de branchies. Cette méthode de diagnostic, utilisée en routine nécessite toutefois un temps de préparation de plusieurs jours et le sacrifice des animaux.

La technique des frottis a permis l'obtention rapide des résultats (Bachère et al., 1982) et la conservation des animaux (cf. paragraphe 3.2.).

M. refringens peut être diagnostiqué sur empreintes de glandes digestives. Des appositions de sections de glande sont réalisées sur lame, séchées et colorées par la "coloration rapide" à l'azur - éosine - bleu de méthylène utilisée couramment pour les frottis de sang.

Des empreintes de feuillets branchiaux colorées par la même méthode permettent de dépister rapidement Bonamia ostreae.

3.4. Reproductibilité des maladies en laboratoire

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la reproductibilité des maladies en laboratoire. Diverses techniques de contamination ont été expérimentées.

3.4.1. Méthodes

- Méthode de "feeding"

Des broyats d'huîtres parasitées par M. refringens et B. ostreae ont été mélangés à l'eau de mer renfermant des huîtres saines.

- Contiguïté d'huîtres saines et parasitées

Des huîtres saines ont été mises en stabulation avec des huîtres parasitées dans des bacs de 50 litres d'eau de mer filtrée, non renouvelée durant les essais.

- Injection de parasites

Des suspensions cellulaires riches en parasites ont été obtenues par broyats d'huîtres parasitées. Entre 0,1 ml et 0,2 ml sont injectés dans des huîtres saines au niveau de la zone d'insertion glande digestive - branchies, par un trou pratiqué sur la valve droite. Les huîtres sont placées en aquarium dont la température et la salinité de l'eau sont contrôlées.

3.4.2. Résultats

Techniques d'infestation	Méthode de feeding		Contiguïté		Injection de parasites	
	<u>M.</u> <u>refringens</u>	<u>B.</u> <u>ostreae</u>	<u>M.</u> <u>refringens</u>	<u>B.</u> <u>ostreae</u>	<u>M.</u> <u>refringens</u>	<u>B.</u> <u>ostreae</u>
Date d'apparition de la maladie	/	/	/	84 jours	/	55 jours ± 13
Durée de l'expérimentation moyenne	Mort des huîtres sans infestation au bout de quelques jours		/	180 jours	21 jours	76 jours ± 15 (34 à 154 j)
Taux moyens d'infestation observés	0	0	/	13,3 %	0	22 %

Devant les difficultés de reproductibilité de la maladie due à M. refringens, nous nous sommes consacrés dans cette étude plus particulièrement à B. ostreae.

La technique d'injection de parasites conduit plus rapidement à des infestations, avec un taux de contamination sensiblement plus élevé que par contiguïté.

Une importante variabilité de réponses individuelles a pu toutefois être observée entre les divers lots d'huîtres injectées. Elle peut être due à l'état physiologique des animaux mais également à l'état de maturité et à la quantité de parasites injectés.

L'isolement du parasite devrait permettre d'étudier et de maîtriser certains facteurs pouvant intervenir dans les processus de contamination tels que la quantité de B. ostreae nécessaire, l'existence de stades infestants, ainsi que les facteurs pouvant être responsables de la virulence du parasite.

3.5. Isolement de Bonamia ostreae

3.5.1. Centrifugation en gradient de densité

Comme il l'a été spécifié dans le projet de contrat, la mise au point de cette technique était assujettie à l'acquisition d'une centrifugeuse à haute vitesse. Du fait de délais de commande et de livraisons anormalement longs, le matériel n'a été reçu, au laboratoire de La Trinité Sur Mer, qu'en Septembre 83 avec une couronne horizontale. La couronne angulaire a été livrée en Décembre 83. Pour ces raisons, nous n'avons pas pu aborder le travail prévu dans sa totalité.

La technique de centrifugation en gradient de densité est employée couramment depuis plusieurs années pour la séparation et la purification de cellules, virus et organites cellulaires. Ainsi elle a été utilisée pour les cellules sanguines chez l'homme (Segal et al., 1980), pour les spores de microsporidies (Undeen et Avery, 1983) pour les stades endoerythrocytaires de la Malaria (Nillni et al., 1981). Cheng et al. (1980) ont également séparé des hémocytes d'huîtres sur gradient de sucrose, alors que Schmitz et al. (1981) ont isolé des espèces de zooplancton.

3.5.1.1. Technique d'isolement

Le Percoll a été utilisé pour nos essais. Cette solution colloïdale de silice (Pharmacia Fine Chemicals) possède des propriétés intéressantes par rapport au sucrose : une faible viscosité (10 ± 5 cl à 20° C), une densité de $1,13 \pm 0,005$ g/ml et une basse osmolarité pouvant donc être réajustée à toute valeur désirée. De plus le Percoll, centrifugé à haute vitesse pendant quelques minutes permet l'obtention de gradients continus.

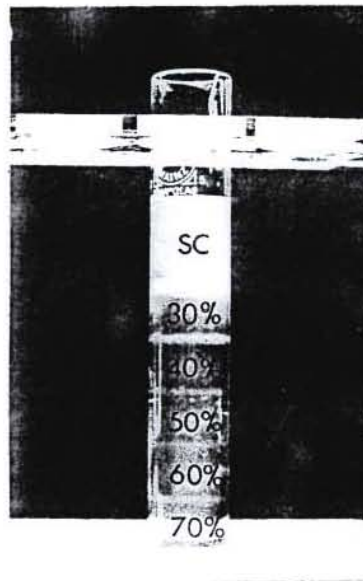
Une solution isotonique de Percoll, de densité de 1,132 g/l, a été diluée par du NaCl 0,4 M ou de l'eau de mer filtrée pour obtenir des solutions de densités variables.

Divers gradients discontinus ont été formés dans des tubes de 12 ml ou de 30 ml, en superposant des volumes égaux de solutions de Percoll, de densité décroissante. Les suspensions cellulaires riches en parasites, obtenues comme décrit au paragraphe 2.4.1., ont été déposées soit au-dessus du gradient, soit au-dessous ou encore ont été diluées avec le Percoll pour obtenir les diverses fractions du gradient.

Nous avons fait varier au cours des essais, la durée de centrifugation (tableau en annexe).

3.5.1.2. Contrôle des parasites isolés

Après centrifugation, le gradient a été entièrement prélevé, à la seringue, en fractions correspondant aux diverses concentrations de Percoll et à leurs interfaces au niveau desquelles, le plus souvent des bandes étaient bien individualisées (voir figure 1).



Tube de 13 ml après centrifugation à 1 300 g pendant 30 minutes d'une suspension cellulaire sur gradient discontinu.

SC : suspension cellulaire

◀ Bande la plus riche et la plus pure en B. ostreae

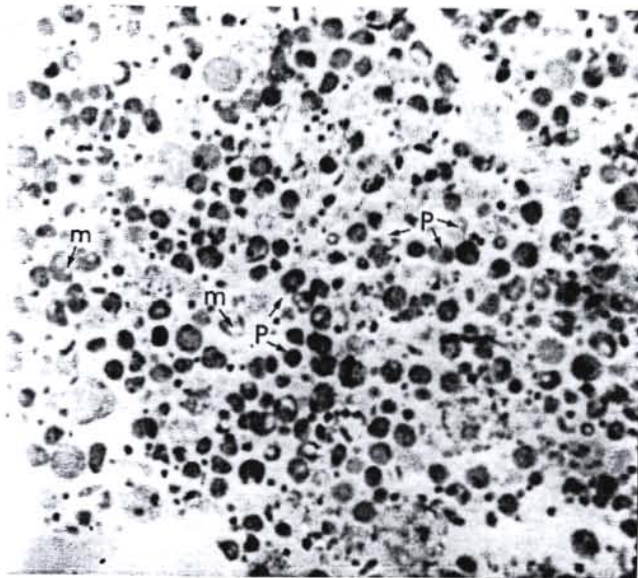
Figure 1

Le Percoll a été éliminé par 3 ou 4 lavages à l'eau de mer filtrée. Les cellules étaient recueillies entre chaque lavage par centrifugation de 5 minutes à 1 300 g. B. ostreae a pu être identifié sur frottis coloré sans risque d'erreur.

Enfin, une étude en microscopie électronique a été faite pour contrôler l'état de B. ostreae isolé sur gradient. Des culots riches en parasites ont été remis en suspension et fixés dans du glutaraldéhyde à 3 %, lavés dans du tampon cacodylate et post-fixés dans du tetroxyde d'osmium à 1 %. Les culots ont été inclus dans de la gélose à 5 % et dans l'Epon, les coupes contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

3.5.1.3. Résultats

Au cours de nos essais, les cellules de B. ostreae se sont concentrées préférentiellement dans les solutions de 50 et 60 % de Percoll, correspondant à des densités de 1,073 à 1,084 g/l, après 30 minutes de centrifugation à 1 300 g. Les meilleures séparations sont obtenues pour des suspensions cellulaires mélangées avant centrifugation aux diverses fractions de Percoll du gradient (figure 2).



Suspension de Bonamia ostreae isolés sur gradient de densité discontinu - coupe semi-fine

(Gr X 1000)

m : mitochondries

P : parasites

Figure 2

D'une façon générale, les résultats sont variables pour les mêmes conditions expérimentales. Le plus souvent, nous n'avons pas obtenu de bandes bien individualisées, ni de fractions totalement pures en B. ostreae. Des bactéries, des noyaux, des cellules d'huîtres, de petite taille sont souvent mélangés aux parasites, en plus ou moins grand nombre suivant les essais. D'autre part, une grande quantité de B. ostreae reste, dans les fractions supérieures du gradient, agglutiné aux débris et aux cellules de la suspension.

Le contrôle de l'ultrastructure a été fait sur du B. ostreae centrifugé et isolé à 1 300 g. L'observation des coupes semi-fines montre des cellules de tailles différentes qui peuvent être rapprochées des formes claires et des formes denses de B. ostreae décrites par Pichot et al., (1979).

Les parasites isolés présentent des caractéristiques ultrastructurales comparables pour l'essentiel aux formes observées dans les tissus d'huîtres (figures 3 et 4).

En effet, les formes denses arrondies, de 2 à 3 μ , ont également un cytoplasme dense et riche en grains d'aspect ribosomal. On y reconnaît, selon les plans de coupes, un noyau ou nucléoplasme homogène, des mitochondries de grande taille (jusqu'à 1 à 2 μ) et des haplosporosomes, encore appelés particules denses structurées. Ces cellules renferment des inclusions très denses, sans structure apparente, de 0,5 à 6 μ qui pourraient être de nature lipidique (Comps, 1983).

Les formes claires, au polymorphisme plus marqué dans les isolats, ont une taille variant de 3 à 5 μ , pouvant parfois atteindre 8 μ . Ces cellules ou cytoplasme moins dense, présentent 1 ou 2 noyaux, des mitochondries, des particules denses structurées à divers stades de morphogénèse comme l'a décrit Comps (1983), ainsi que des saccules de type golgien. Enfin, on observe très fréquemment, des inclusions, souvent de grande taille (1,5 à 2 μ) renfermant un matériel homogène non structuré peu dense aux électrons contrairement aux inclusions présentes dans les premières formes citées.

D'une façon générale, il semblerait donc que les diverses étapes de l'isolement n'aient pas profondément affecté la structure des deux types de cellules parasitées.

3.5.1.4. Discussion

Si l'isolement de B. ostreae s'avère possible, la quantité de parasite se concentrant aux densités de 1,073 et 1,084 g/l, est souvent trop faible pour être utilisée pour des infestations expérimentales. L'insuffisance de séparation des divers éléments pourrait être liée aux caractéristiques physico-chimiques du broyat cellulaire.

Figure 3 : Ultrastructure d'une forme dense de B. ostreae isolé

m : mitochondrie

id : inclusion dense

h : haplosporosome

n : noyau

Gr X 10 000

Figure 4 : Ultrastructure d'une forme claire de B. ostreae isolé

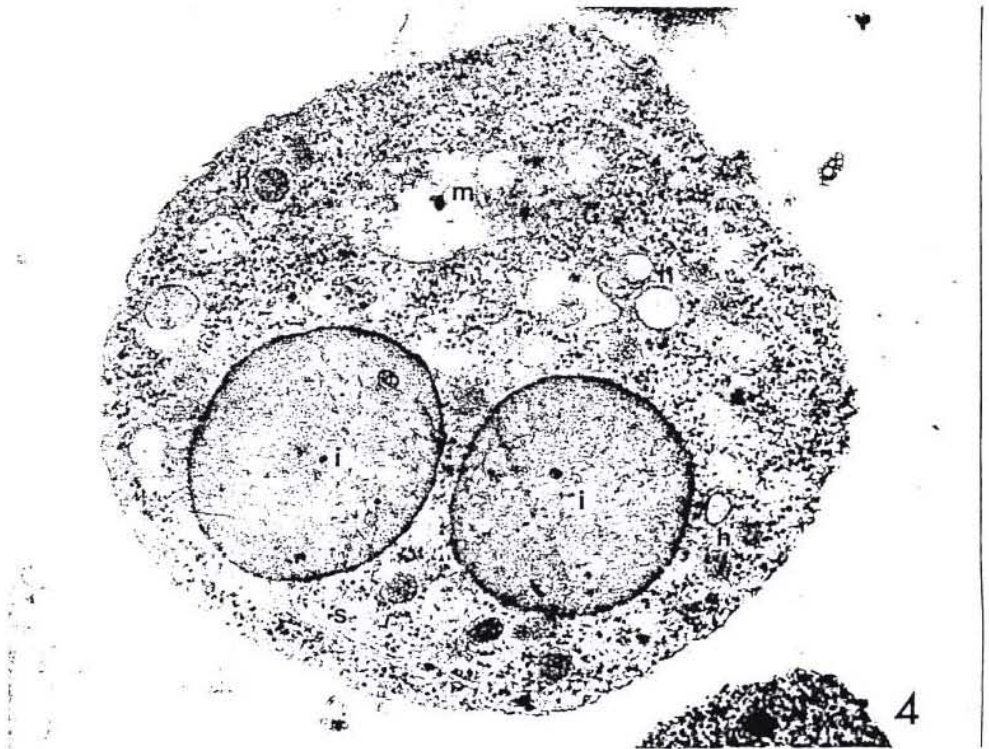
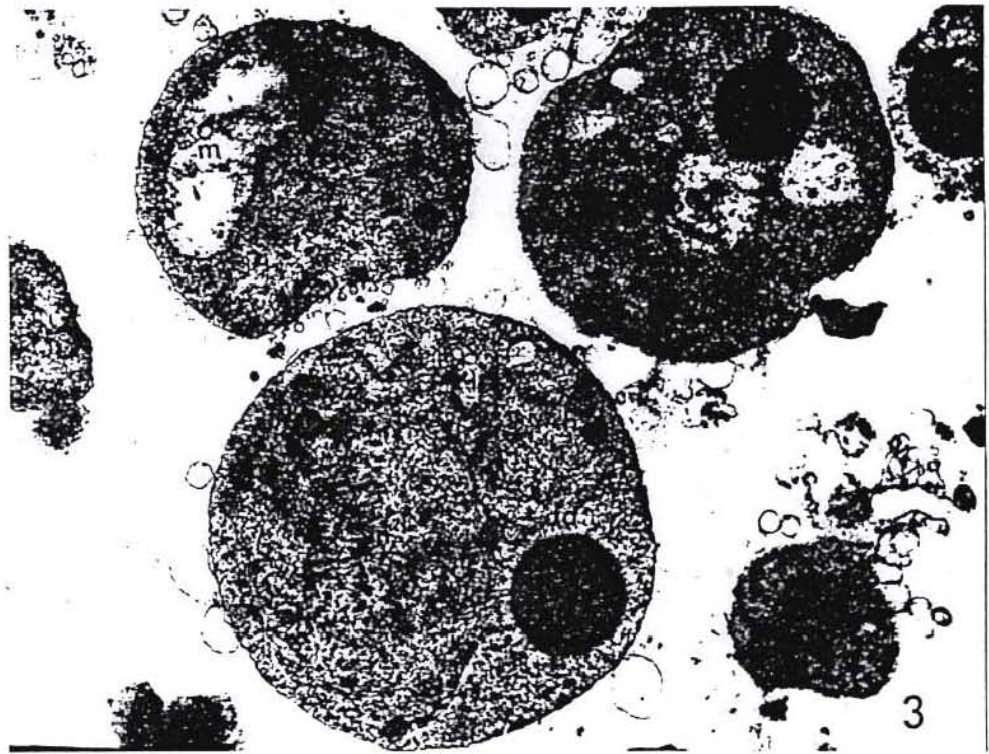
m : mitochondrie

S : saccules de type golgien

i : inclusion

h : haplosporosomes à divers stades de morphogénèse

Gr X 15 000



a) Homogénéité et fluidité de la suspension cellulaire

La formation, dans certains cas, d'un coagulum gênant l'homogénéisation de la suspension pourrait empêcher la migration des cellules dans le gradient. Le coagulum pourrait provenir des substances intercellulaires, de nature glycoprotéique ou mucopolysaccharidiques, tels que l'acide hyaluronique, qui se présentent sous forme de gels ou de sols dans les tissus. L'action de la hyaluronidase sur les broyats n'a pas donné à ce jour de résultats probants. Ces essais mériteraient toutefois d'être approfondis en utilisant des enzymes dont l'action pourrait être spécifique vis à vis de certains constituants de l'huître (par ex. glycoène) sans risque de dégradation pour les parasites.

Ce précipité pourrait résulter également de la destabilisation et de la précipitation des protéines sous l'action du broyat.

Les suspensions obtenues à partir d'huîtres mortes ou premortem sont plus homogènes. Un processus d'autolyse des cellules pourrait être la cause de cette modification.

Nous avons donc travaillé préférentiellement avec des huîtres moribondes qui sont, de plus, fortement parasitées.

b) Pureté des fractions de *Bonamia ostreae* obtenues

Les suspensions obtenues par broyat renferment une grande quantité de cellules, de débris cellulaires, de noyaux libres ou de bactéries, pouvant avoir une densité voisine à celle de *Bonamia ostreae*, qui migrent alors avec le parasite. Des essais de filtrations différentielles n'ont pas permis de purifier les isolats, du fait d'un colmatage rapide des filtres.

3.5.2. Culture in vitro de *Bonamia ostreae* (Comps M., 1983)

Au terme d'une année de recherche, Comps M. (1983) a obtenu la multiplication de *B. ostreae* in vitro par contamination de cultures d'explantés de branchies d'huîtres.

Des fragments de feuillets branchiaux ont été explantés dans des milieux mis au point pour les cultures cellulaires de Mollusques bivalves par Cousserans F. (1975). A cette culture sont ajoutés des filaments branchiaux ou de l'hémolymphe prélevés sur des huîtres plates parasitées par *B. ostreae*.

La multiplication du parasite apparait, en moyenne, après 48 heures d'incubation, le nombre de cellules augmentant de 2.10^6 à 19.10^6 .

Des différences ultrastructurales telles que la fréquence de vacuoles intracytoplasmiques et la position périphérique des haplosporosomes ont été notées chez le parasite produit in vitro.

3.5.3. Contrôle de la pathogénicité de *B. ostreae* isolé

Des essais d'infestation ont été entrepris afin de tester l'influence des techniques d'isollements sur la variabilité et la virulence de *Bonamia ostreae*.

Des injections de parasites isolés ont été pratiquées comme décrit dans le paragraphe 3.4.1.

3.5.3.1. *B. ostreae* isolé sur gradient de densité

Des essais ont été faits avec neuf séries d'isolats de parasites. Trois semaines et 4 mois respectivement après les premières injections deux huîtres ont été observées fortement parasitées par *B. ostreae* qui avait été obtenu après 30 minutes de centrifugation à 1 300 g et avait été gardé deux jours dans le Percoll. Parmi les 8 autres essais, aucune contamination n'a encore été obtenue.

3.5.3.2. *B. ostreae* produit in vitro

Les parasites utilisés ont été produits au laboratoire de pathologie de Sète et nous ont été expédiés pour des essais de contaminations expérimentales.

Cinq séries d'injections ont été pratiquées. Aucune infestation n'a été obtenue avec ces isolats.

3.5.3.3. Conclusions

Ces essais, dont la plupart ont été entrepris en fin de contrat doivent être poursuivis encore deux à trois mois. En effet, comme l'ont montré des infestations avec *B. ostreae* non isolé, des contaminations peuvent ne se

Manifester, dans certains cas, que 154 jours après les injections.

Il semblerait que les techniques d'isolement, c'est-à-dire une vitesse de centrifugation de 1 300 g et l'utilisation de Percoll, n'altèrent pas le pouvoir pathogène du parasite. Toutefois, les contaminations observées à ce jour (2 huîtres sur 98) après une durée moyenne de 105 jours sont plus faibles que celles obtenues, globalement pour un même temps, avec du Bonamia ostreae naturel.

La quantité de parasites injectés pourrait expliquer cette différence, les suspensions non purifiées étant plus riches en B. ostreae que les fractions isolées.

Enfin, le parasite produit in vitro pourrait avoir perdu sa pathogénicité puisque aucune infestation n'a été obtenue ; il ne fait pas toutefois écarter l'effet du stockage et du transport qui auraient pu affecter sa virulence. Les essais seront poursuivis avec du parasite cultivé sur place à La Trinité Sur Mer.

4. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Les essais entrepris déjà depuis plus d'un an sur B. ostreae ont montré que la maladie est reproductible, en laboratoire, par injections de parasites dans la masse viscérale des huîtres. Cette technique, utilisant des suspensions cellulaires riches en parasites, conduit à des infestations dont la variabilité devrait pouvoir être expliquée et contrôlée avec l'utilisation de suspensions pures de parasites.

Nous avons montré qu'il est possible de purifier le parasite par centrifugation en gradient de densité discontinu à 1 300 g sans perte de son pouvoir pathogène. La technique doit être affinée car des problèmes persistent au niveau du broyat des huîtres parasitées. De plus, des essais sur gradients continus pourraient peut être conduire à de meilleures séparation et purification de ces agents pathogènes.

Des infestations expérimentales sont poursuivies avec les deux types de B. ostreae isolé afin de confirmer nos premières observations.

Par ailleurs, une étude comparative portant sur la pathogénicité et les caractéristiques ultrastructurales de B. ostreae isolé par centrifugation et par culture in vitro est entreprise en collaboration avec le laboratoire de pathologie de l'I.S.T.P.M. Sète. Elle devrait permettre de déterminer les facteurs responsables ou intervenant dans la virulence du parasite.

Ces connaissances et la maîtrise des techniques d'isolement du parasite seront un support pour des recherches sur la sensibilité et les moyens de défense des huîtres.

Remerciements

Ce travail a donné lieu à un stage de 15 jours en laboratoire de pathologie comparée de Montpellier. Au cours de ce stage, nous nous sommes familiarisés aux techniques de centrifugation en gradient de densité. Des essais d'isolement de Bonamia ostreae sur gradient continu de Percoll ont été abordés.

BIBLIOGRAPHIE

- BACHERE E., DURAND J.L., TIGE G., 1982. Bonamia ostreae (PICHOT et coll. 1979), parasite de l'huître plate : comparaison de deux méthodes de diagnostic. C.I.E.M., CM 1982/F : 28.
- COMPS M., 1983. Culture in vitro de Bonamia ostreae parasite hémostaïque de l'huître plate Ostrea edulis L. C.R. Acad. Sc. Paris, 296, Série III, p.931.
- COMPS M., 1983. Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. Thèse doct. Etat, Montpellier, 1983, 128 p.
- COUSSERANS F., Recherches sur la culture de cellules de mollusques marins et sur l'emploi de ces systèmes cellulaires en pathologie marine. Thèse doct. 3ème cycle, Montpellier, 1975, 189 p.
- CHENG T.C., HUANG J.W., KARADOGAN H., RENWRANTZ L.R., YOSHINO T.P., 1980. Separation of oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors. J. Invert. pathol., 36, 35-40.
- GRIZEL H., COMPS M., BONAMI R., COUSSERANS F., VAGO C., 1974. Etude d'un parasite de la glande digestive observé au cours de l'épizootie actuelle de l'huître plate. C.R. Acad. Sc. Paris, Série D, 279, p. 783.
- NILINI E.A., LONDNER M.V., SPIRA D.T., 1981. A simple method for separation of uninfected erythrocytes from those infected with plasmodium berghei and for isolation of artificially released parasites. Z. Parasitenkd, 64 : 279-284
- SCHMITZ E.H., Mc CRAW J.T., 1981. Density gradient separation of zooplankton from total net seston for dry weight estimates. Trans. Am. Microsc. Soc. 100 (1) : 94-98.

SEGAL A.W., FORTUNATO A., HERD T., 1980. A rapid single centrifugation step method for the separation of erythrocytes, granulocytes and mononuclear cells on continuous density gradients of Percoll. J. Immun. Methods, 32 : 203-214.

UNDEEN A.H., AVERY S.W., 1983. Continuous flow density gradient centrifugation for purification of microsporidian spores. J. Invert. Pathol., 42, 405-406.

PICHOT Y., COMPS M., TIGE G., GRIZEL H., RABOUIN M.A., 1980. Recherches sur Bonamia ostreae gen. N., sp. N., parasite nouveau de l'huitre plate Ostrea edulis L. Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 43 (1) : 131-140.

Essais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fractions du gradient en % de Percoll	30-40 50-60 70-80	10-40 70-90	25-50 75-100	20-40-90	20-40-90	10-40-70	40-45 50-55 60-65-70	20-40 60-80	20-40 70-90	30-40 50-60-70
Localisation de la suspension cellulaire	dans 80 %	dans 10 %	au-dessus du gradient	au-dessous du gradient	dans 20 %	dans les 3 fractions	dans les 7 fractions	dans les 4 fractions	au-dessus du gradient	au-dessus du gradient
centri- vitesse fuga- tion durée	1 300 g 10'	550 1 300 g 10' 10'	1 300 g 30'	150 g 20'	1 300 g 30'	1 300 g 30'	1 300 g 10'	1 300 g 20'	1 300 g 30'	1 300 g 30'
Maximum de parasites + Maximum de pureté	60 %	pas Inter- de face sépa 40-70 ration	bande dans 50 %	/	40 % et interface 40-80	interface 40-70	55 % et 60 %	40 %	interface 40%-70%	interface 50-60

15 autres essais, du type de l'essai n° 10, ont été effectués. La durée de centrifugation a été augmentée, mais n'a pas conduit à un meilleur isolement des parasites. Ces essais ont montré surtout l'influence des caractéristiques physico-chimiques des suspensions utilisées.

Annexe : Conditions expérimentales des divers essais d'isolement de B. ostreae par centrifugation en gradient de densité