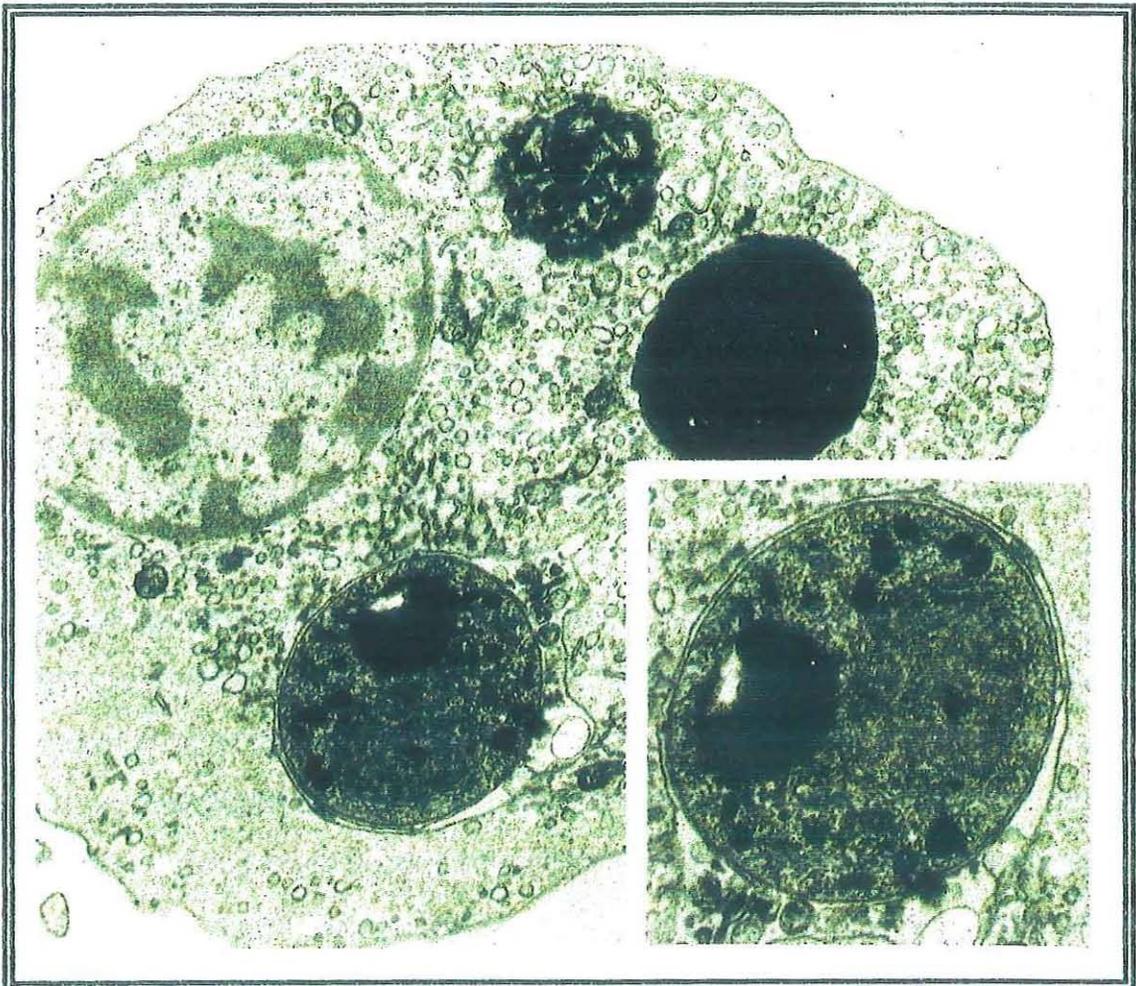


Nathalie COCHENNEC
IFREMER
Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
Unité de Pathologie et d'Immunologie Générales
17390 LA TREMBLADE

**LA BONAMIOSE : MISE AU POINT DE REACTIFS POUR LE
DIAGNOSTIC ET ETUDE DES MECANISMES
CELLULAIRES DE DEFENSE DEVELOPPES PAR L'HOTE,
L'HUITRE PLATE, OSTREA EDULIS**



1994-1995

Rapport de 1ère année pour l'obtention
du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

Directeur de formation EPHE : Dr Y. BENYAMIN
Directeur de la formation à l'IFREMER : Dr T. RENAULT

I. INTRODUCTION 2

**II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT LES MECANISMES DE DEFENSE
OBSERVES CHEZ LES MOLLUSQUES** 6

- A. LES EFFECTEURS CELLULAIRES 6
- B. LA PHAGOCYTOSE 7
- C. LES FACTEURS DE RECONNAISSANCE ET D'OPSONISATION 8
- D. LES PHENOMENES POST-PHAGOCYTAIRES 9

III. ETUDE DU PARASITE *BONAMIA OSTREAE* 10

- A. PURIFICATION 10
- B. OBTENTION D'UN STOCK D'HUITRES PLATES INFESTEES EXPERIMENTALEMENT 12
- C. CARACTERISATION DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES EN SDS-PAGE (SODIUM DODECYL
SULPHATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS) 14
 - 1. LYSE DU PARASITE PURIFIE 16
 - 2. ELECTROPHORESE 17
- D. CARACTERISATION DES GLYCOSYLATIONS DU PARASITE *BONAMIA OSTREAE* 19
- E. CARACTERISATION ANTIGENIQUE DES PROTEINES CONSTITUTIVES DE *BONAMIA OSTREAE* 27

IV. ETUDE DES MECANISMES DE DEFENSE DES MOLLUSQUES 32

- A. ETUDE DES INTERACTIONS HOTE/PARASITE, *IN VIVO* 32
- B. ETUDE DES INTERACTIONS HOTE/PARASITE, *IN VITRO* 35
- C. ESSAIS DE SEPARATION DES DIFFERENTS TYPES HEMOCYTAIRES D'*OSTREA EDULIS* 38

V. BIBLIOGRAPHIE 42

I. INTRODUCTION

Parmi les nombreux protozoaires décrits chez les mollusques bivalves marins, un grand nombre d'entre eux ont été reconnus comme agents pathogènes. Du point de vue de la conchyliculture et en particulier de la pathologie des bivalves, le phylum des *Ascetospora* est incontestablement le plus important, compte tenu de la gravité des épizooties et des maladies endémiques que certains peuvent provoquer. Il s'agit des genres :

- *Haplosporidium* pour les huîtres creuses américaines, *Crassostrea virginica*,
- *Marteilia*, dont une espèce, *Marteilia refringens*, a décimé les huîtres plates, *Ostrea edulis*, du littoral Atlantique,
- *Bonamia*, dont une espèce, *Bonamia ostreae*, est responsable d'une enzootie des huîtres plates, *Ostrea edulis*.

L'impact socio-économique de ces maladies n'est plus à démontrer et renforce la nécessité de développer les recherches dans les domaines de la pathologie générale et des interactions hôte / agent pathogène chez ces animaux.

Il est important de préciser quelques particularités inhérentes à la pathologie des mollusques bivalves marins. En effet, nous ne disposons que de peu de possibilités de protéger ces animaux vis à vis des maladies infectieuses du fait de certaines caractéristiques de ces espèces. D'une part, les traitements, pour des espèces généralement élevées en milieu ouvert, posent le problème des quantités de substances à utiliser, des probabilités de recontamination et de l'accumulation de résidus dans le milieu. De ce fait, ce type d'approche ne semble pas une voie à privilégier. D'autre part, la vaccination au sens conventionnel du terme, est impossible chez ces espèces du fait de l'absence de réponse immune spécifique. En effet, il est important de rappeler que ces animaux 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.

Cette dernière particularité a des répercussions sur le diagnostic des pathologies chez les invertébrés marins. Du fait de l'absence d'anticorps spécifiques le diagnostic ne peut être qu'un diagnostic direct, nécessitant la recherche de l'agent pathogène en cause et non une trace de sa présence. Dans ce cadre, un ensemble de techniques, existant pour la mise en évidence des agents pathogènes chez les vertébrés, est inaccessible et rend le diagnostic des pathologies des invertébrés marins plus difficile à mettre en oeuvre.

Au vue de ces éléments, les recherches actuellement développées en pathologie des mollusques sont basées, d'une part, sur la mise au point de techniques de diagnostic sensibles, fiables et rapides, et d'autre part, sur l'obtention de populations d'animaux présentant une « résistance » à certaines maladies.

Pour le premier point, il est important de rappeler que l'étude, essentiellement descriptive, des épizooties chez les bivalves marins a reposé et repose encore essentiellement sur l'histologie et la microscopie électronique à transmission. Ces techniques, consommatrices de temps, sont inadaptées à la quantification des infections du fait de la difficulté à traiter un grand nombre d'échantillons et à détecter de faibles niveaux d'infestation. Par ailleurs, elles sont relativement inadéquates, en pratique, pour la mise en place et la définition de règles de prophylaxie visant à réduire l'incidence des maladies et à encadrer les procédures d'échange. Dans ce cadre, il est indispensable aujourd'hui de développer de nouveaux outils de diagnostic appropriés permettant d'éviter ou de limiter la dissémination des infections entre bassins conchylicoles ou pays.

Pour le second point, du fait de l'impossibilité de stimuler des mécanismes immunitaires spécifiques inexistants, l'approche la plus prometteuse semble être l'obtention d'animaux « résistants » à certaines pathologies. Dans ce cadre, un effort de recherche est nécessaire dans le domaine de « l'immunologie » des mollusques pour définir les mécanismes de défense mis en jeu par ces derniers lors des processus infectieux. En effet, la compréhension de ces mécanismes à l'échelle cellulaire et moléculaire devrait avoir des implications relativement directes pour la conchyliculture :

- la sélection, par le biais de la génétique quantitative, de souches « résistantes » à partir d'individus présentant des capacités de défense accrues,
- l'obtention, par transgénèse, de souches résistantes transformées, par intégration de gènes impliqués dans les mécanismes de défense.

Dans cette optique, nous avons entrepris un travail sur la Bonamiose, maladie due au protozoaire *Bonamia ostreae*. Ce protozoaire a été mis en évidence lors d'épisodes de mortalité survenus à l'île Tudy, en Bretagne, en 1979. Des caractères de ce parasite, décrit par Pichot et Coll. en 1980 et Comps en 1983, il faut retenir sa localisation intrahémocytaire et la présence dans son cytoplasme d'organites comparables aux haplosporosomes. Cette maladie s'est propagée à tous les centres ostréicoles bretons, puis européens (Grizel, 1985). Elle a, par ailleurs, été décrite aux U.S.A. (Elston *et al.*, 1986) et en Nouvelle Zélande (Dinamani *et al.*, 1987).

Une partie de ce travail, a consisté à développer quelques techniques pour la caractérisation et le diagnostic de ce protozoaire. Ainsi, après avoir optimisé le protocole de purification de *B. ostreae*, il a été possible de définir quelques unes des propriétés des protéines de ce parasite dont la connaissance s'avère nécessaire pour le choix de cibles potentielles d'un diagnostic. Cette caractérisation des protéines a été réalisée par la description des profils électrophorétiques en SDS-PAGE, et par la recherche des glycoprotéines à l'aide d'une lectine. Nous nous sommes également attachés à la préparation d'anticorps polyclonaux spécifiques du parasite, dans l'optique de disposer d'une technique de diagnostic sensible, fiable et rapide. En outre, ce type d'outils, appliqués à l'histologie, devrait permettre un diagnostic des stades précoces de l'infestation.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de défense de l'huître plate, et plus particulièrement aux interactions, *in vivo*. Parallèlement, un protocole, permettant un maintien et une survie intéressante des hémocytes d'huîtres plates, *in vitro*, a été défini. Dans ce cadre, l'infestation des hémocytes de cette espèce par le protozoaire, *Bonamia ostreae*, constitue un modèle particulièrement intéressant de parasitisme intracellulaire, par le double rôle joué par les hémocytes dans cette maladie. Ils sont en effet, à la fois, les cellules hôtes d'un point de vue parasitologique, et les cellules effectrices de l'immunité à médiation cellulaire. A terme, ces investigations devraient permettre, d'une part, d'aborder certains aspects de la pathogénie, en particulier, la reconnaissance et le devenir

intracellulaire du parasite, *Bonamia ostreae* dans la cellule hôte, et d'autre part, les bases de la susceptibilité ou de la « résistance » à cette maladie.

II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT LES MECANISMES DE DEFENSE OBSERVES CHEZ LES MOLLUSQUES

Il convient en premier lieu de noter que le système immunitaire des invertébrés se distingue de celui des vertébrés par l'absence de réponse immunitaire faisant intervenir des cellules spécialisées (lymphocytes T ou B). De ce point résulte l'incapacité à mettre en évidence une réponse basée sur la spécificité et la mémoire chez les mollusques bivalves marins. 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 un facteur de type anticorps a été démontré chez *Asterias rubens* (Brillouet *et al.*, 1985).

Ainsi chez les bivalves, les mécanismes de défense observés, immédiats et non inductibles, sont essentiellement à médiation cellulaire et reposent sur l'activité des hémocytes.

A. Les effecteurs cellulaires

« L'immunité cellulaire » des mollusques bivalves est assurée par les hémocytes, cellules véhiculées par l'hémolymphe dans un système circulatoire semi-ouvert, qui les met en contact avec tous les tissus conjonctifs, et en particulier, avec le tissu conjonctif de la masse digestive et celui des filaments branchiaux, au niveau de vastes sinus (Cheng, 1981 ; Sminia and Van der Knaap, 1987). L'étude de ces cellules a suscité de nombreux travaux (Poder, 1980 ; Auffret, 1985 ; Chagot, 1989). Différents critères ont été utilisés, séparément ou en association, pour classifier les types hémocytaires chez les mollusques bivalves : critères morphologiques, critères cytochimiques, critères fonctionnels et critères antigéniques. Cependant dans la littérature, essentiellement descriptive, il semble régner une certaine confusion. En effet, l'absence de critères d'identification bien établis amène une multiplicité de dénomination et de description des hémocytes. Ainsi plusieurs descriptions d'un même type cellulaire ou inversement le regroupement de types différents à l'intérieur d'une même population ont été retrouvées 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 *Crassostrea gigas*. Les auteurs, pour identifier et classer les types hématocytaires, ont utilisé, entre autre, des critères morphologiques, la présence, la forme et la taille des granulations.

Bien qu'il n'y ait pas d'accord sur le nombre et la description des hémocytes, les auteurs s'accordent pour reconnaître le schéma général proposé par Cheng (1981) pour la classification des hémocytes des mollusques bivalves marins et qui distingue deux grandes catégories :

- les cellules granuleuses,
- les cellules agranuleuses.

Les types multiples observés représenteraient des stades de maturation ou des stades fonctionnels de ces deux classes.

Le lignage des hémocytes chez les mollusques reste inconnu ainsi que les sites hématopoïétiques dont l'existence est évoquée chez *Biomphalaria glabrata* (Lie *et al.*, 1975 ; Jeong *et al.*, 1983). Bien qu'il soit admis que, généralement, les hémocytes circulants ne se divisent pas, il n'a pas été mis encore en évidence chez les bivalves marins de sites d'hématopoïèse.

D'autres critères d'identification, comme le contenu enzymatique lysosomal des hémocytes, ont été pris en compte pour caractériser des types hémocytaires chez *Mytilus edulis* (Pipe, 1990), chez *Ostrea edulis* (Auffret, 1985 ; 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, *Crassostrea virginica* (Cheng *et al.*, 1980), *Biomphalaria glabrata* (Yoshino, 1983) et *Mytilus edulis* (Renwanz *et al.*, 1985).

B. La phagocytose

Les phénomènes cellulaires et notamment la phagocytose sont considérés comme les mécanismes majeurs de défense chez les mollusques (Anderson, 1977). Cheng (1981) considère que tous les types cellulaires sont phagocytaires. Cependant, les différents auteurs ne sont pas unanimes quant aux types hémocytaires impliqués dans le phénomène de phagocytose de substances particulières étrangères. Pour Reade (1976), les hémocytes hyalins

de *Tridacna maxima*, et pour Rudell (1969) ceux de *Crassostrea gigas* sont capables de phagocytose, tandis que pour Lowe et Moore (1979) chez *Mytilus edulis*, cette activité appartient aux macrophages basophiles plus ou moins granuleux.

En ce qui concerne *Ostrea edulis*, Brereton et Alderman (1979) considèrent que des cellules hyalines 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. Toutefois, 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 capables en effet de phagocytose, de réactions d'englobement ou d'encapsulation et prennent toujours part au processus de cicatrisation.

C. Les facteurs de reconnaissance et d'opsonisation

La majorité des mécanismes de défense dits immédiats, telle que la phagocytose, sont facilités ou activés par des facteurs de reconnaissance ou d'opsonisation. Des réactions d'immunité humorale de type agglutinine (Renwrantz, 1983 ; Olafsen, 1988) semblent exister chez certains mollusques. *In vitro*, Olafsen (1992) décrit un accroissement des agglutinines dans le sérum de *Crassostrea virginica* en réponse à une inoculation de *Vibrio anguillarum*. Plusieurs études ont rapporté des modifications considérables de la quantité des molécules d'agglutinine présentes dans l'hémolymphe d'huîtres *Crassostrea virginica* infectées par *Haplosporidium nelsoni* (Kanaley et Ford, 1990 ; Ling, 1990 ; Chintala et Ford, 1994).

De nombreux travaux indiquent une reconnaissance par des opsonines plasmatiques (Tuan *et al.*, 1987). 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. Initialement, il a été décrit un phénomène d'agglutination des microorganismes et ensuite de facilitation de la fixation entre les hémocytes et les microorganismes (Renwrantz et Stahmer, 1983).

De plus, le chimiotactisme a été démontré pour les hémocytes de *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 *Escherichia coli*.

D. Les phénomènes post-phagocytaires

Les mécanismes mis en oeuvre par les hémocytes, parallèlement à la phagocytose, pour détruire les particules internalisées font appel aux mêmes processus de défense que les cellules phagocytaires des vertébrés. Un premier mécanisme, oxygène-indépendant, fait intervenir les enzymes des lysosomes qui fusionnent avec le phagosome (McKerrow *et al.*, 1985). Le deuxième mécanisme est oxygène-dépendant et englobe une série de réactions oxydatives caractérisées par la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène (Badwey et Karnosky, 1988). Ce métabolisme oxydatif a été démontré chez *Patinopecten yessoensis* (Nakamura *et al.*, 1985), *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1991), *Crassostrea gigas* (Bachère *et al.*, 1991), *Ostrea edulis* (Bachère *et al.*, 1991) et *Lymnaea stagnalis* (Dikkeboom *et al.*, 1987 ; Adema *et al.*, 1991) chez qui 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 la globalité des radicaux libre de l'oxygène générés par le burst respiratory. Cette technique a notamment été utilisée pour l'analyse des interactions des hémocytes avec des parasites (Hervio *et al.*, 1989 ; Le Gall *et al.*, 1991) ou des cellules tumorales (Noël *et al.*, 1994).

III. ETUDE DU PARASITE *BONAMIA OSTREAE*

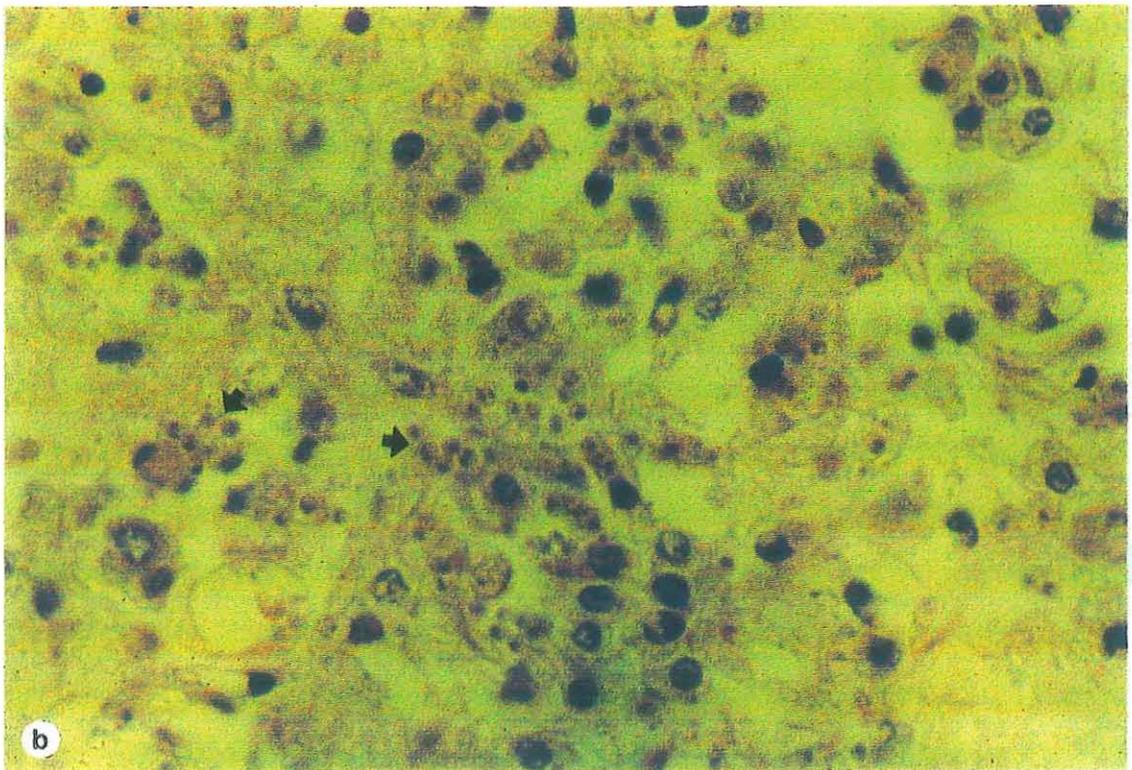
La parasitose, due à *Bonamia ostreae*, toujours endémique dans les bassins conchylicoles européens, pose le problème de la prévention. Elle peut passer par le biais d'un diagnostic précoce et d'une surveillance épidémiologique. Le diagnostic des infestations a été progressivement simplifié en substituant à l'examen histologique de coupes de tissus celui de frottis préparés à partir de biopsie de branchie ou de coeur (figures 1a et b). Bien que cette méthode soit facile à réaliser (une seule étape de préparation), elle reste néanmoins lourde à mettre en oeuvre sur le plan analytique. La conséquence en est un nombre limité d'examens réalisés par les services qui ont à effectuer les contrôles zoosanitaires au sein des instituts nationaux : IFREMER en France et homologues à l'étranger. En outre, cette technique est inadaptée pour détecter les très faibles niveaux d'infestation. Des anticorps monoclonaux préparés à partir de parasites purifiés ont permis, en 1988, le développement et la mise sur le marché, pendant un temps, d'un diagnostic immunologique enzymatique (ELISA) (Cochennec *et al.*, 1988). Cependant, ces anticorps monoclonaux ont nécessité des travaux complémentaires pour préciser leur spécificité.

Dans la perspective d'obtenir de nouveaux réactifs immunologiques, spécifiques de constituants protéiques de *B. ostreae*, une caractérisation électrophorétique des protéines du parasite a été entreprise.

A. Purification

Les progrès dans l'étude des agents pathogènes et des maladies ne peuvent être envisagés sans la maîtrise de techniques de laboratoire adaptées aux mollusques, en intégrant le caractère non cultivable des parasites de ces espèces. Parmi celle-ci, l'obtention de parasites purifiés est importante, car elle permet d'effectuer des expériences *in vitro* et *in vivo* et de mieux connaître leurs caractéristiques biochimiques.

Le système circulatoire des mollusques n'étant pas clos, la majorité des cellules sanguines sont dispersées dans l'ensemble des organes. De ce fait pour une purification quantitativement optimale de *Bonamia ostreae*, le corps entier de l'animal est utilisé, à l'exception du muscle adducteur qui, de par sa nature fibreuse, constitue un handicap majeur



Clichés en microscopie photonique (x 1000)

- *Figure 1 a : Apposition cardiaque d'huître plate, Ostrea edulis, infestée par le parasite Bonamia ostreae (⇒)*
- *Figure 1 b : Coupe histologique de tissus conjonctif d'huître plate, Ostrea edulis, infestée par le parasite Bonamia ostreae (⇒)*

pour l'homogénéisation des tissus. Le broyage des tissus est effectuée à l'aide d'un homogénéisateur de type ULTRA TURAX qui permet une bonne dissociation tissulaire et cellulaire. Ce type de traitement, cependant, préserve la structure générale du parasite, tout en permettant de libérer les formes intracellulaires. La purification repose ensuite sur une succession de centrifugations différentielles et isopycniques, respectivement dans des solutions de sucrose et de Percoll de concentrations variables en eau de mer filtrée (Mialhe *et al.*, 1988), permettant de séparer les parasites des composants cellulaires. Le protocole opératoire est récapitulé et schématisé dans la figure 2.

Le rendement (nombre de parasites / animal infesté) des purifications dépend du degré d'infestation des huîtres utilisées. Ce degré d'infestation est évalué par observation microscopique d'apposition cardiaque (figure 1a) comme suit :

- (-) aucun parasite n'a été décelé,
- (+) une dizaine de parasites sont détectés sur un seul champs,
- (++) une dizaine de parasites sont détectés sur plusieurs champs,
- (+++) un grand nombre de parasites sont détectés par champs.

B. Obtention d'un stock d'huîtres plates infestées expérimentalement

Pour obtenir de bons rendements de purification, la sélection de quelques huîtres fortement infestées est préférable à l'utilisation d'un plus grand nombre d'individus moyennement parasités. Cependant, les cas de très fortes infestations naturelles sont assez irréguliers dans le milieu, 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, un stock d'animaux infestés expérimentalement a été maintenu au laboratoire.

La reproduction expérimentale de la bonamiose au laboratoire, par inoculation de suspensions quantifiées de parasites purifiés dans la cavité péricardique des huîtres plates (Hervio, 1995), est standardisée, et a permis d'étudier la cinétique de développement de la maladie.

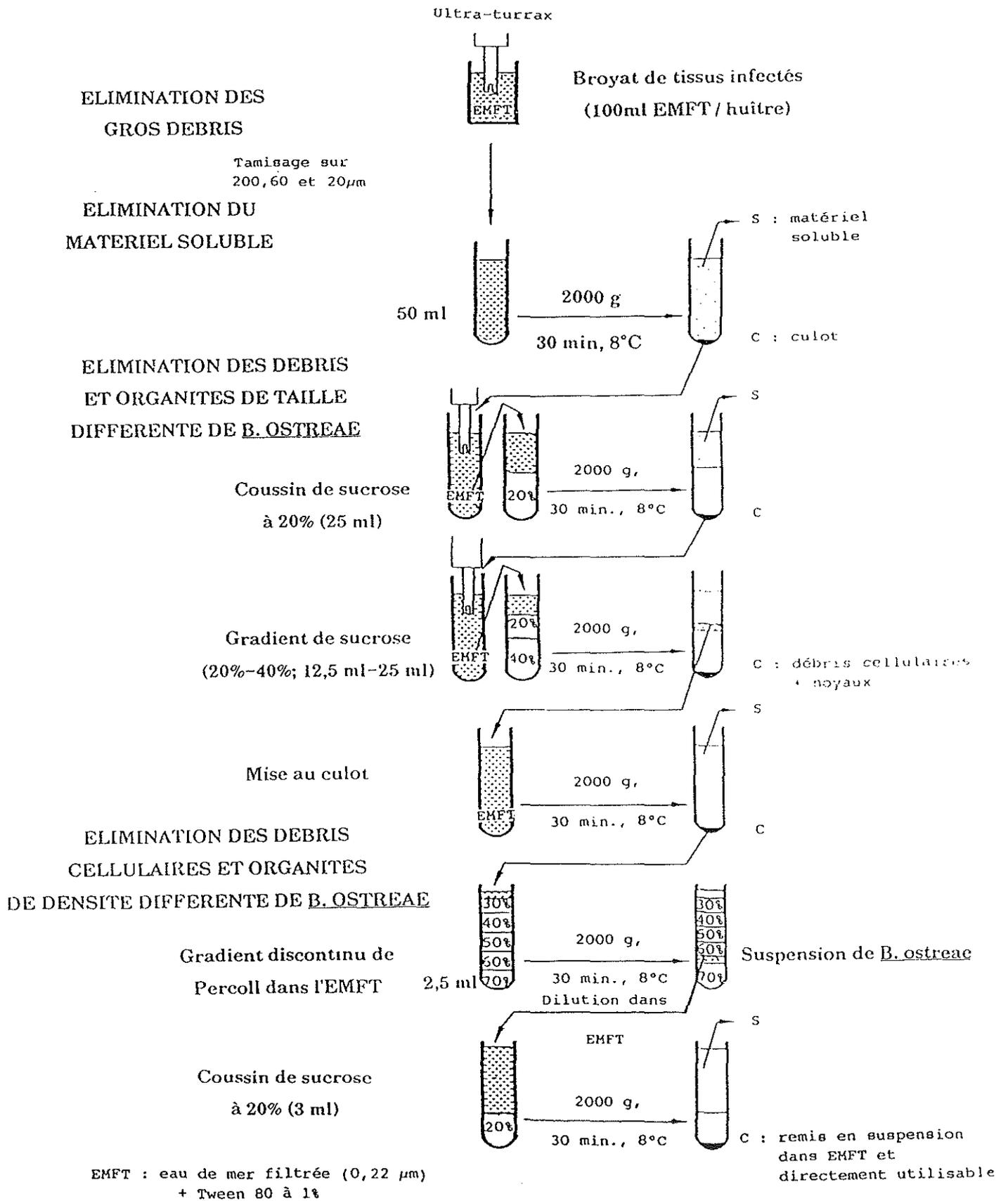


Figure 2 : Protocole de purification du parasite *Bonamia ostreae*

Sur la base de ces résultats, des lots d'huîtres, d'origines variées, ont été infestés par inoculation, dans la cavité péricardique, de 300 000 parasites par animal, ceci afin de s'assurer qu'une majorité des huîtres soient infestées rapidement.

Les animaux infestés expérimentalement sont placés dans une salle de quarantaine, en condition de stress (jeûne, température élevée 25°...). Le contrôle de la mortalité et la détermination du degré d'infestation des huîtres mortes sont réalisés quotidiennement, par apposition de tissus cardiaques.

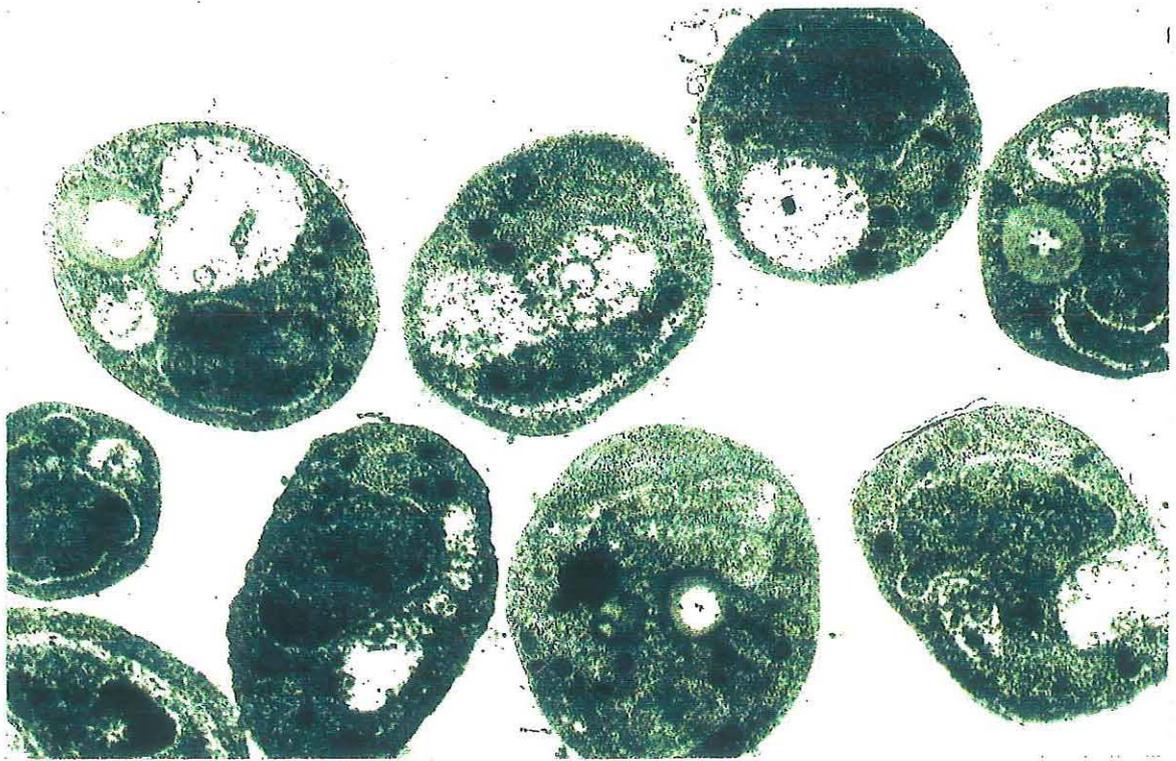
L'utilisation de ces animaux a permis d'augmenter de manière considérable les rendements de purification du parasite. Les essais se sont avérés être performants d'un point de vue quantitatif puisqu'ils ont permis régulièrement d'obtenir entre $300 \cdot 10^6$ et 10^9 parasites par purification (en moyenne pour cinq huîtres). En outre, l'intégrité ultrastructurale des parasites a été vérifiée en microscopie électronique ce qui a confirmé l'homogénéité des suspensions obtenues (figures 3 et 4).

La bonne préservation des organites cytoplasmiques et, la pureté des parasites purifiés permettent de rapprocher qualitativement le protocole de ceux établis pour l'isolement de parasites de vertébrés (Stanley *et al*, 1982 ; Arrowood et Sterling, 1987).

C. Caractérisation des profils électrophorétiques en SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide gel electrophoresis)

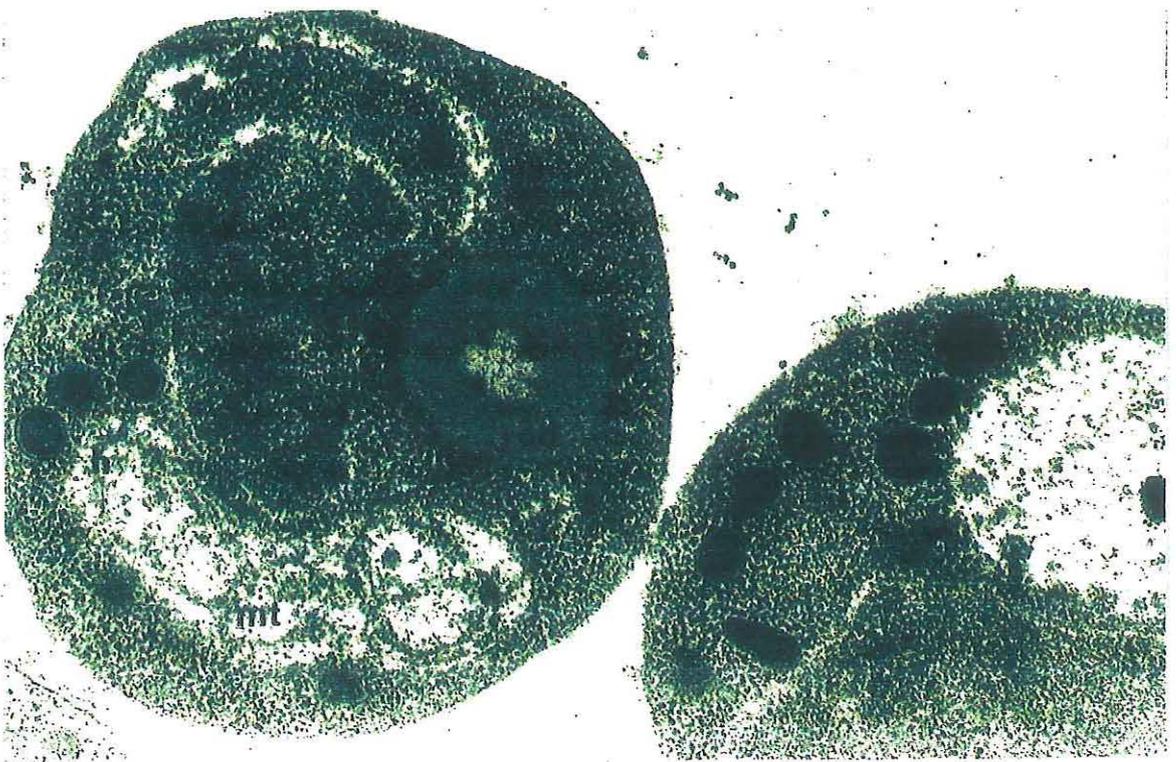
L'obtention de quantités importantes de parasites purifiés, grâce à l'optimisation de la technique, et tout particulièrement à l'utilisation d'animaux infestés expérimentalement, a permis d'envisager la caractérisation du parasite par le biais de la technique électrophorétique. Dans un premier temps, il a été entrepris d'analyser les protéines constitutives majeures de *Bonamia ostreae* sur la base de leurs profils de migration en SDS-PAGE.

A ce niveau d'étude, une mise au point d'un protocole de lyse du parasite a été nécessaire afin de déterminer les conditions optimales de concentration des protéines du parasite. Jusqu'alors, il n'avait pas été possible de mettre en évidence en électrophorèse (SDS-PAGE) de bandes correspondant à des protéines constitutives du parasite. Hervio (1992) suggérait que la concentration de protéines constitutives de *Bonamia ostreae* était inférieure à 0.5 ng pour environ $2 \cdot 10^5$ parasites.



Cliché en microscopie électronique à transmission (x 20 000)

- *Figure 3 : Vue générale d'un culot obtenu après la technique de purification. Les suspensions sont riches et homogènes.*



Cliché en microscopie électronique à transmission (x 60 000)

- *Figure 4 : Fort grossissement d'un parasite qui semble avoir conservé son intégrité ultrastructurale (mt : mitochondrie ; cd : corps dense ; n : noyau ; h : haplosporosome).*

1. Lyse du parasite purifié

Des travaux ont été réalisés afin de définir les conditions permettant la meilleure 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.

Lors des premiers essais de lyse du parasite *Bonamia ostreae*, un protocole classique, lyse puis sonication a été effectué. Les résultats ont été satisfaisants (58 µg pour 15.10⁶ parasites purifiés). Afin d'optimiser les conditions permettant une meilleure dissociation des échantillons, plusieurs traitements, avant l'addition du tampon de lyse, ont été réalisés :

- des essais de congélations répétées à - 80 et - 170°C,
- des essais de sonication (400W / 10 secondes),

La congélation à - 80 °C ou - 170 °C, avant la lyse, semble avoir un effet plutôt négatif (respectivement 31.2 µg et 23 µg pour 15.10⁶ parasites purifiés) ; la sonication, un effet nettement négatif, (17.5 µg pour 15.10⁶ parasites purifiés) sur la concentration protéique.

Différents temps de contact avec le tampon de lyse ont été expérimentés. La durée de contact (30', 1 heure, 2 heures et une nuit à + 4°C) ne semble pas avoir d'influence.

Par la suite, un agent antiprotéase, le Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) a été additionné dans le tampon de lyse. Il semble que son ajout ne permette pas une augmentation nette de la quantité en protéines des lysats de parasites purifiés. Cependant, son utilisation peut permettre une meilleure conservation des polypeptides contenus dans les échantillons.

Concernant le volume de tampon de lyse à utiliser, des essais ont été réalisés pour augmenter la concentration en protéines et donc permettre de déposer une plus grande quantité de protéines dans les puits du gel d'électrophorèse. Il a été remarqué, qu'effectivement, plus le volume de tampon de lyse ajouté augmentait, meilleure était la concentration finale en protéines. Cependant, le nombre initial de parasite à lyser jouait un rôle considérable. En effet, plus le nombre initial de parasites était important, plus la concentration finale en protéines diminuait. Il est possible d'envisager le fait qu'une grande quantité de parasites, en précipitant, crée des zones difficilement accessibles, et limite l'efficacité du tampon de lyse.

Le protocole suivant a donc été retenu :

- aliquot par 15 à 20 10^6 parasites, mise au culot du parasite, et élimination de l'eau de mer à la dernière étape de purification,
- addition de 20 μ l de tampon de lyse (+PMSF) pour 10^6 parasites purifiés,
- incubation sur glace pendant 45 minutes,
- congélation des échantillons à - 20 °C.

N.B. : la concentration des protéines par précipitation en acétone, 2 heures à - 20°C (6 volumes d'acétone pour 1 volume de lysat) est nécessaire lorsqu'un minigel est utilisé. Le volume déposé étant réduit, il est donc indispensable de concentrer les protéines.

2. *Electrophorèse*

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 réductrices.

Le protocole de dénaturation des échantillons dérive de la méthode originale décrite par Laemmli (1970). Les extraits parasitaires sont dénaturés par addition d'un volume égal de tampon SDS qui dénature les chaînes polypeptides et les charge négativement de façon identique tandis que le mercaptoéthanol rompt les ponts disulfures reliant certaines chaînes polypeptides entre elles. Placées dans un champ électrique, les chaînes polypeptides se comportent comme des polyanions et migrent vers l'anode. De cette manière, la vitesse et la distance de migration des différentes chaînes polypeptides ne sont fonction que de leur masse moléculaire.

Pour que la résolution de cette séparation électrophorétique soit meilleure, des gels en gradient de concentration croissante de polyacrylamide (9-17,5 %) ont été utilisés.

Les spectres électrophorétiques obtenus ont été analysés, puis comparés entre eux à l'aide du logiciel SAMBA (Alcatel).

Les gels ont tout d'abord été coloré au bleu de Coomassie (figure 5), mais les profils obtenus étaient faiblement marqués. Il n'était possible que de distinguer une quinzaine de

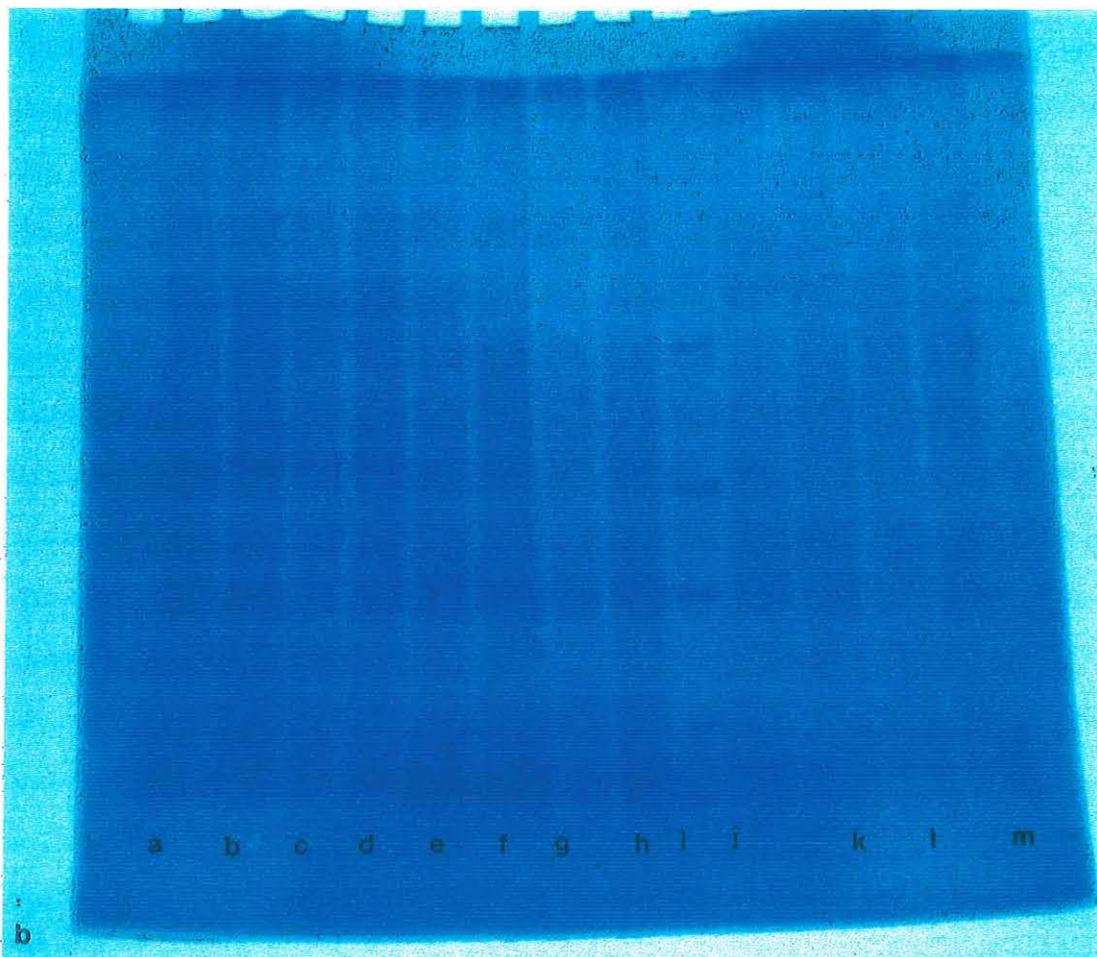
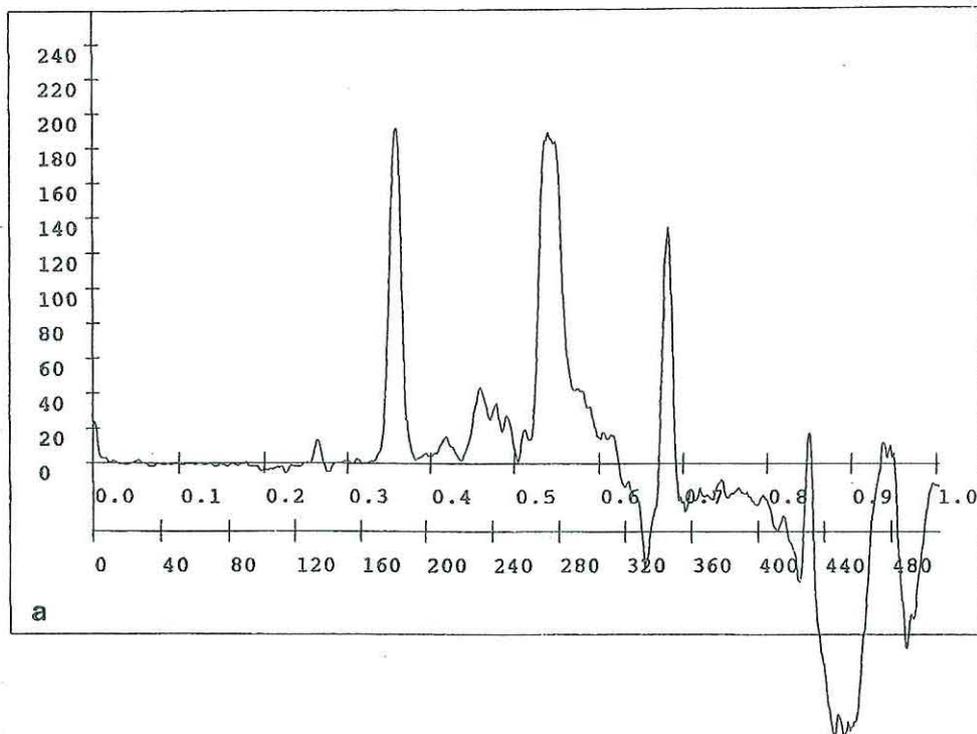


Figure 5 : Profils électrophorétiques en SDS-PAGE, en conditions réductrices, d'un lysat de parasites, *Bonamia ostrea*, purifiés, lysés en présence de PMSF.

- a : analyse des profils à l'aide du logiciel SAMBA (Alcatel) des pistes a, b, c et d
- b : gel coloré au bleu de Coomassie (pistes a, b, c et d : 2.67 mg ; pistes e, f, g et h : 2.36 mg ; piste i : kit de masses moléculaires (LWM) ; pistes j, k, l et m : 1,56 mg)

polypeptides. Cette coloration a été remplacée par celle au nitrate d'argent, qui offre une meilleure sensibilité (figure 6).

Après coloration au nitrate d'argent, les profils électrophorétiques présentent un grand nombre de bandes, une trentaine, comprises en 94 kDa et 14 kDa (figure 6).

L'analyse comparée des profils d'un échantillon de *B. ostreae* purifié, lysé avec un tampon contenant du PMSF, et d'un même échantillon traité avec le même tampon, en absence de PMSF, montre peu de différence. En effet, plus de 30 bandes sont visibles pour les deux échantillons. Les 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 de PMSF (figure 7). Ce résultat semble indiquer que la présence de l'antiprotéase PMSF dans le tampon de lyse peut permettre la conservation de certains polypeptides qui disparaissent en son absence.

La seconde étape de caractérisation des protéines de *B. ostreae* a été de confirmer la similitude des profils obtenus, en SDS-PAGE en conditions réductrices, pour différents lysats de parasites. Ainsi, l'analyse comparée, après coloration des gels à l'argent, des spectres électrophorétiques ne montre aucune différence (figure 8). Il a été ainsi possible de grouper tous les échantillons provenant des différentes purifications, l'intérêt étant de disposer d'une quantité suffisante de protéines pour pouvoir produire des anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux.

D. Caractérisation des glycosylations du parasite *Bonamia ostreae*

Une recherche de glycoprotéines a été effectuée après séparation électrophorétique, en conditions réductrices, et transfert sur membrane de nitrocellulose et Immobilon. Par ailleurs, les glycoprotéines ont été recherchées directement sur gel de polyacrylamide et sur parasites purifiés fixés pour la microscopie électronique.

Sur membranes de transfert et sur parasites purifiés fixés, la recherche des glycoprotéines a été réalisée à l'aide de la concanavine A (ConA) isolée de *Canavalia ensiformis*. Cette lectine a une grande affinité pour la peroxydase, ce qui permet d'utiliser cette dernière comme révélateur en présence d'un de ses substrats spécifiques. D'autres lectines (Wgl, Rcl...) seront utilisées ultérieurement.

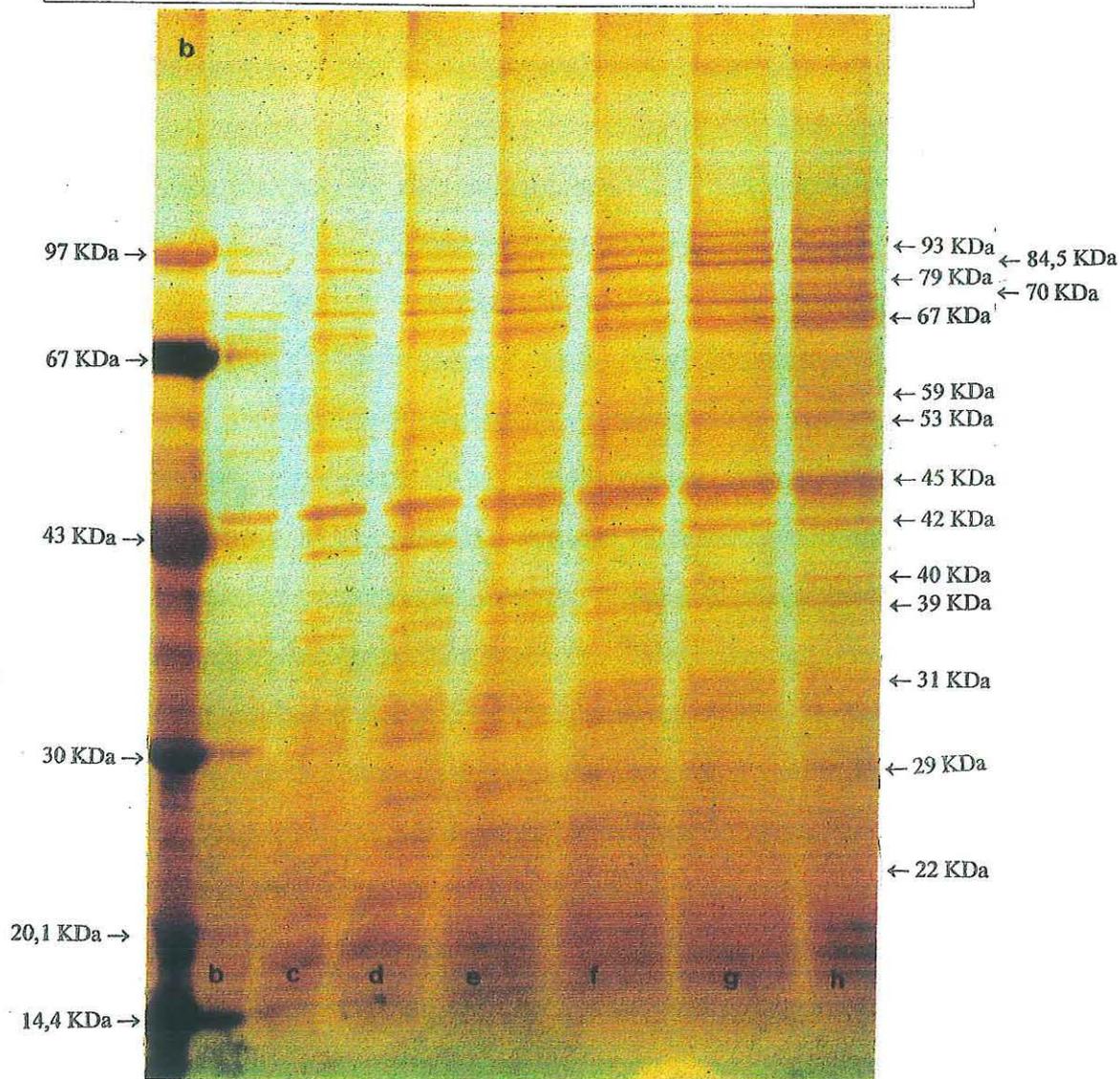
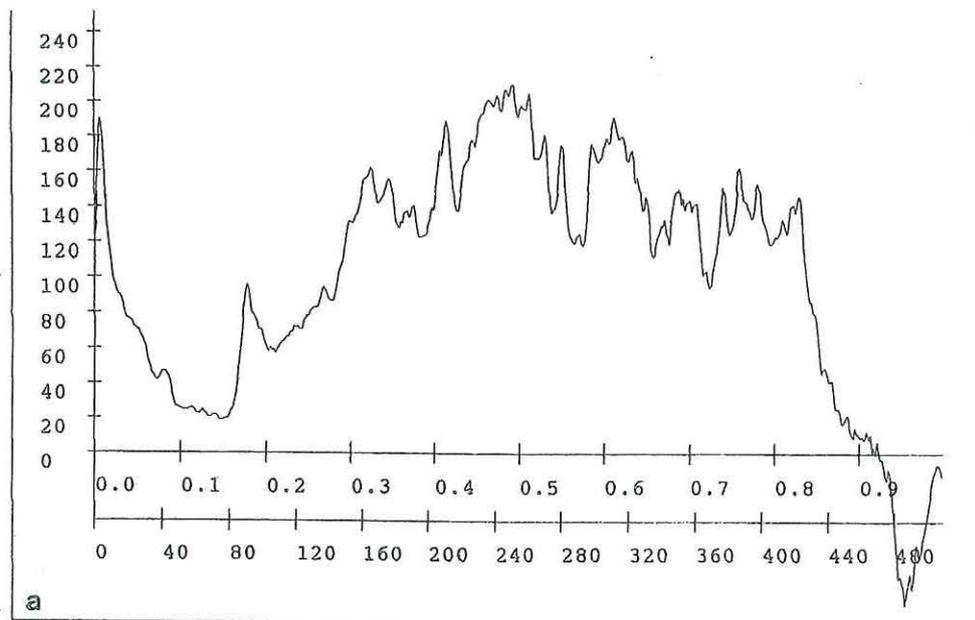


Figure 6 : Profils électrophorétiques en SDS-PAGE, en conditions réductrices, d'un lysat de parasites, *Bonamia ostrea*, purifiés, lysés en présence de PMSF.

- a : analyse des profils à l'aide du logiciel SAMBA (Alcatel) de la piste g
- b : gel coloré au nitrate d'argent (piste a : kit de masses moléculaires (LWM) ; b : 0,5 mg ; c : 1 mg ; d : 1,5 mg ; e : 2 mg ; f : 2,5 mg ; g : 3 mg et h : 3,25mg)

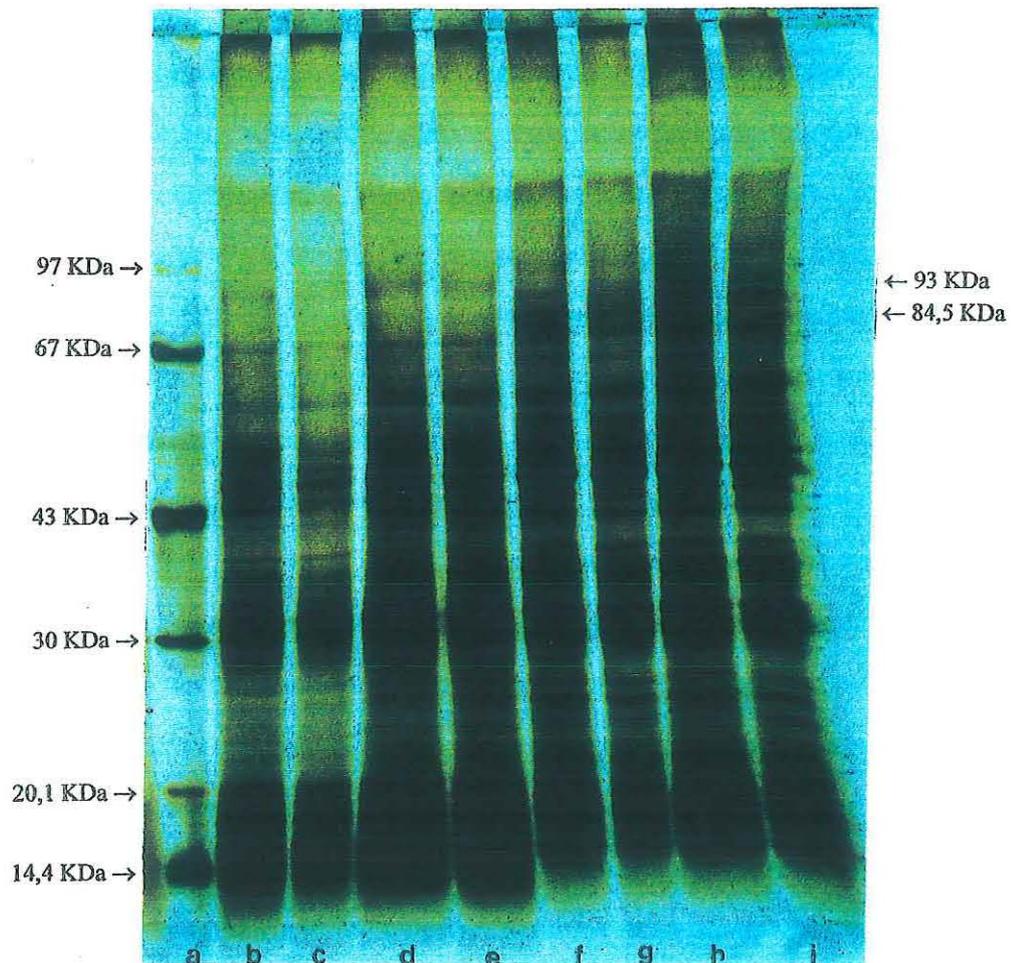


Figure 7 : Profils électrophorétiques, colorés au nitrate d'argent, d'un lysat de *Bonamia ostreae* (SDS-PAGE, en conditions réductrices).

- piste a : kit de masses moléculaires (LWM)
- échantillon traité sans PMSF : pistes b, c : dépôts de ,1, 56 mg ; pistes d et e : dépôts de 2,36 mg
- échantillon traité avec PMSF : pistes f et g : dépôts de 1,76 mg ; pistes h et i : dépôts de 2,67 mg

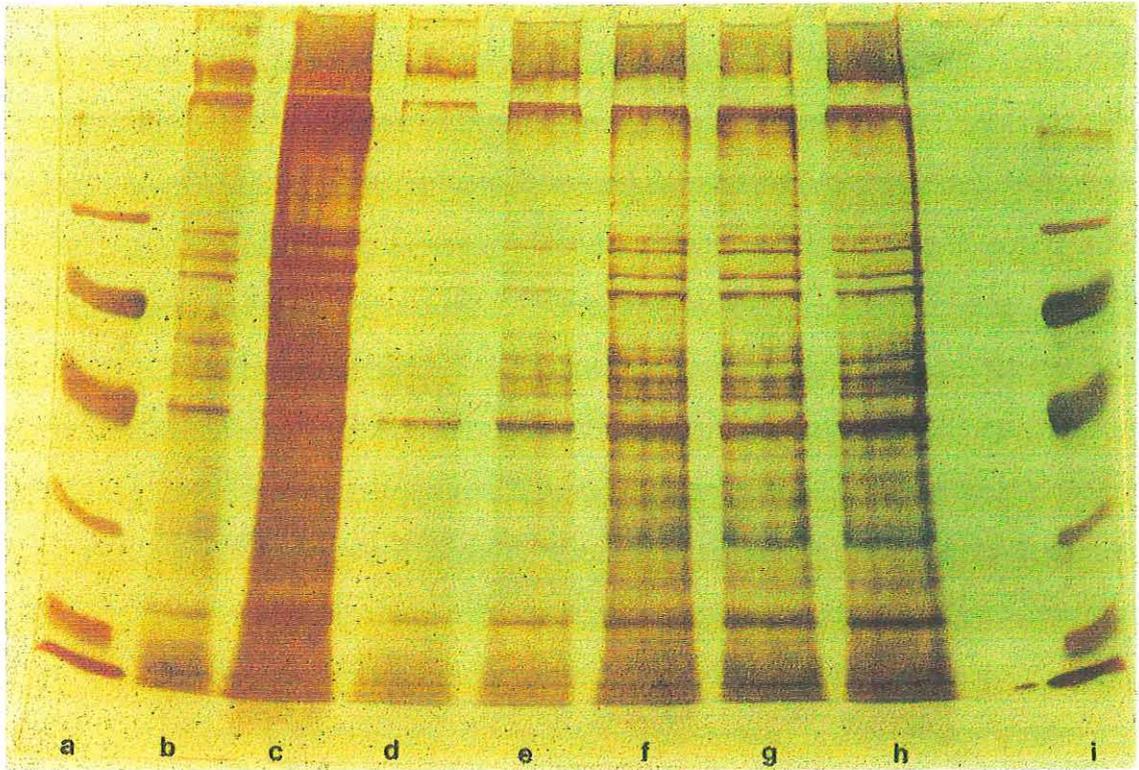


Figure 8 : Profils électrophorétiques de sept lysats de parasites, *Bonamia ostreae* (issus de sept purifications différentes), en SDS-PAGE, en conditions réductrices, ayant subi le même traitement (+PMSF) Coloration au nitrate d'argent..

- pistes a et i : kit de masses moléculaires (LWM) ; piste b : dépôt de 1,04 mg ; piste c : dépôt de 3,6 mg ; pistes d et e : dépôts de 1,40 mg ; pistes f, g et h : dépôts de 2,67 mg

Il a déjà été possible de révéler, sur membranes de nitrocellulose et Immobilon, la présence de résidus glycosylés (figure 9 a et b) sur une quinzaine de bandes avec quatre bandes plus marquées. Ce résultat révèle des glycosylations sur plusieurs polypeptides du parasite *B. ostreae*, plus particulièrement la présence de résidus mannose sur lesquels se fixe la ConA. Cependant, les marquages restent discrets et pourraient s'expliquer par un pourcentage faible de résidus glycosylés sur les polypeptides du parasite.

Sur parasites purifiés, fixés pour la microscopie électronique et traités avec la ConA, l'utilisation de la peroxydase permet de révéler la présence de glycoprotéines au niveau ultrastructural (figure 11). Cependant, la localisation exacte de ce marquage reste sujette à caution. En effet, il semble que lors de la purification du parasite, il y ait copurification de la membrane de la vacuole parasitophore et, dans ce cas, il est probable que ce soit cette membrane qui soit marquée. Cependant, ce résultat est intéressant car il montre un marquage des résidus glycosylés à la périphérie du parasite indiquant que les protéines glycosylées peuvent intervenir dans les interactions hôte / agent pathogène.

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 visualisées par le réactif de Schiff qui forme avec eux un produit de condensation de couleur pourpre. Cependant, cette réaction ne nous a pas permis de révéler les glycoprotéines. Le réactif de Schiff a été remplacé par une coloration à l'argent (Dubray and Bezard, 1982). Le principe est identique, mais la sensibilité est meilleure. Il a ainsi été possible de mettre en évidence un marquage discret des glycosylations de certaines bandes (figure 12). Cette réaction est intéressante car elle apporte une information supplémentaire, qualitative, sur les protéines isolées. Il est à noter que ce type de technique entraîne un bruit de fond relativement important rendant difficile la localisation.

Les résidus carbohydrates sont, en général, différents pour des espèces éloignées phylogéniquement (Lis et Sharon, 1986). La connaissance des glycosylations est donc importante, car elle permet d'orienter ultérieurement le choix des protéines cibles du diagnostic et d'interpréter les résultats obtenus avec des anticorps spécifiques en Western blotting. En effet, les anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques de ce type peuvent donner lieu à des réactions croisées avec d'autres protéines parasitaires ou cellulaires

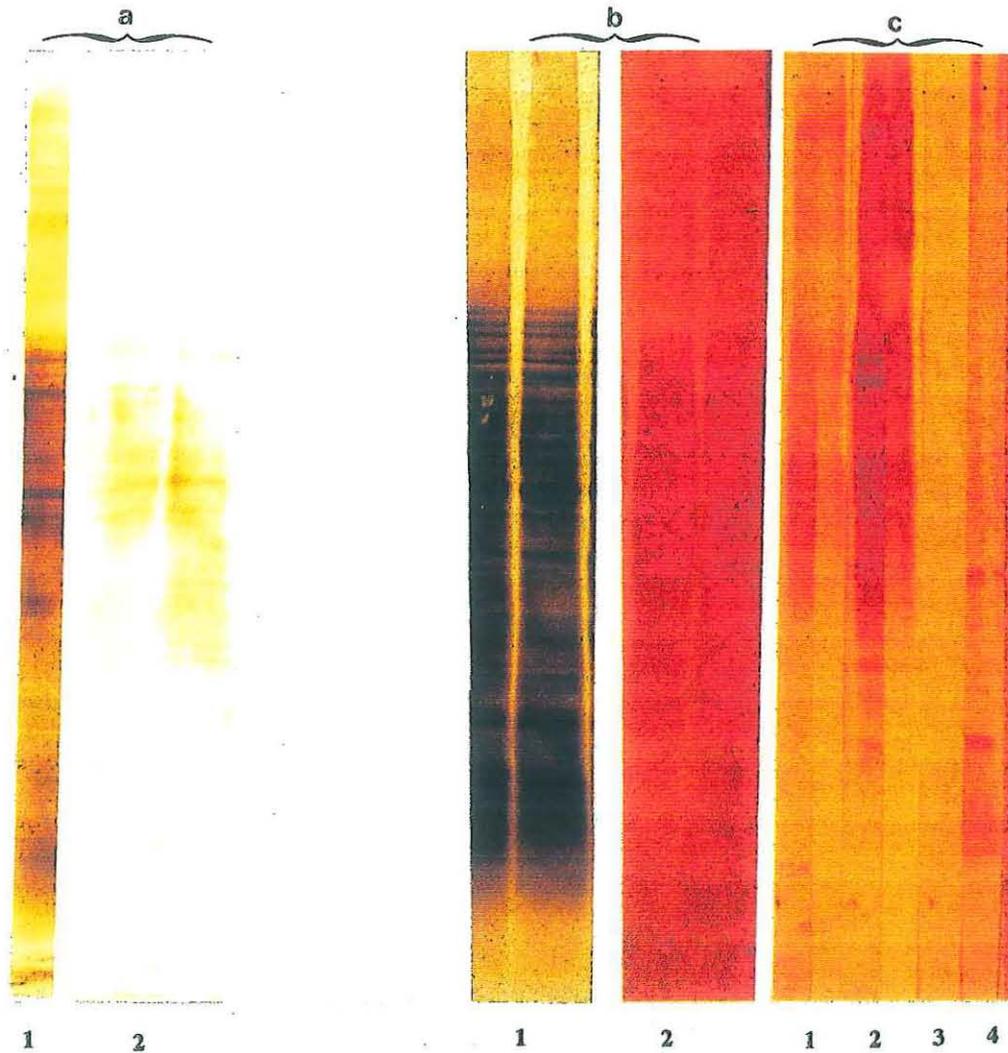


Figure 9 a, b et c: membranes de transfert de nitrocellulose et Immobilon (2,67 mg/piste)

- a : membranes de transfert de nitrocellulose :

1: coloration au nitrate d'argent ; 2 et 3 : marquage des glycoprotéines après révélation par la ConA.

- b : membranes de transfert Immobilon :

1 : coloration au nitrate d'argent ; 2 et 3 : marquage des glycoprotéines après révélation par la Con A

- c : Western blotting sur membranes de transfert Immobilon

1 : anticorps polyclonaux de lysats totaux de parasites au 1/100ème ; 2 : anticorps polyclonaux de lysats totaux de parasites au 1/10ème ; 3 : anticorps monoclonal 20B2 au 1/10ème ; 4 : anticorps monoclonal 15C2 au 1/10ème.

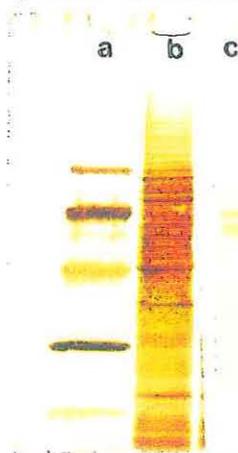
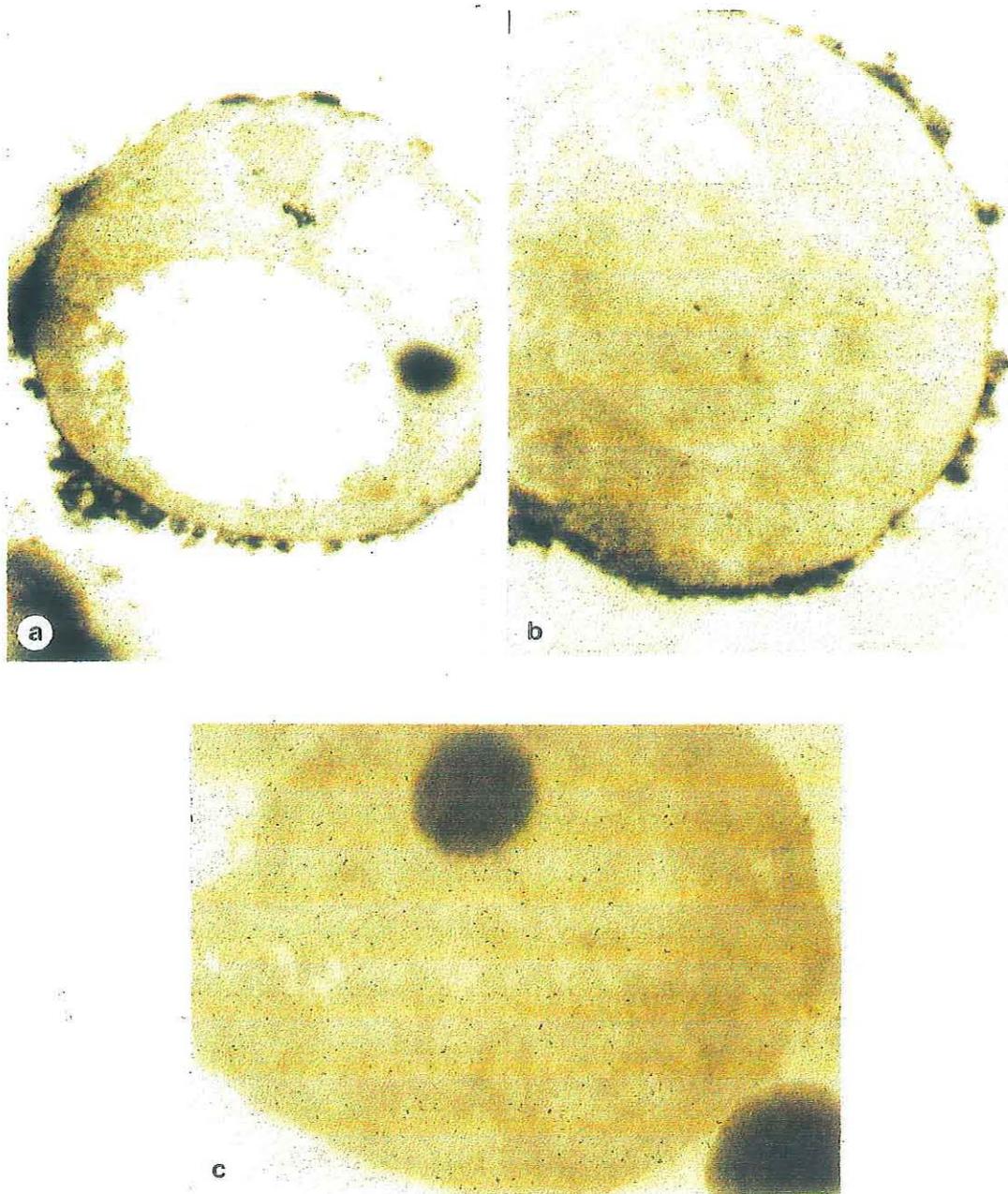


Figure 10 : membranes de transfert de nitrocellulose (2 mg/piste)

- a : kit de masse moléculaire colorée au nitrate d'argent
- b : coloration à l'argent
- c : western blotting des anticorps polyclonaux préparés à partir de polypeptides séparés en SDS-PAGE (bande 5).



Clichés en microscopie électronique à transmission (x 60 000)

- *Figure 11 a : parasites purifiés, (fixés en glutaraldéhyde) marqués avec la Concanavaline A . Il est possible de noter la présence d'un marquage sur la vacuole parasitophore.*
- *figure 11 b : parasites purifiés, (fixés en glutaraldéhyde) marqués à la Concanavaline A. Le marquage est situé en périphérie du parasite.*
- *figure 11 c : parasites purifiés, (fixés en glutaraldéhyde). Echantillon témoin. Il n'est pas mis en évidence de marquage.*

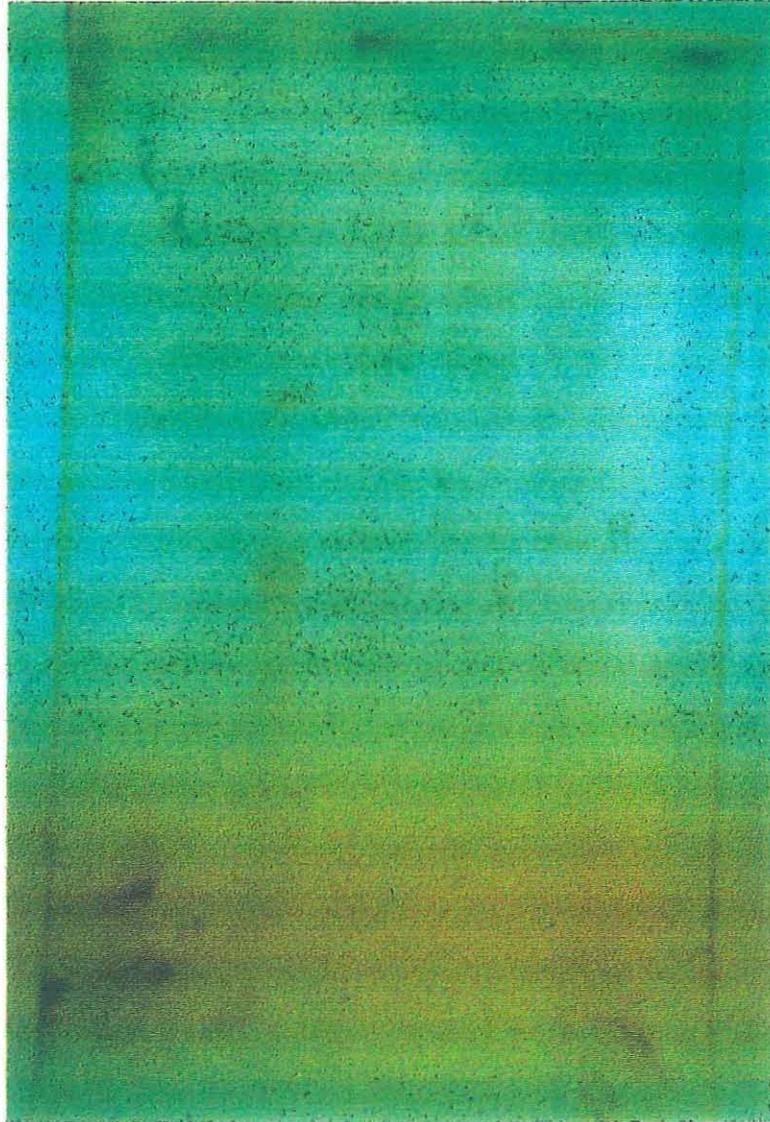


Figure 12 : recherche des glycoprotéines sur gel SDS-PAGE, après oxydation par l'acide périodique et coloration au nitrate d'argent

présentant des résidus similaires. Les résidus carbohydrates sont également importants pour la compréhension des processus de reconnaissance du parasite *Bonamia ostreae* par les hémocytes, car ils pourraient faire intervenir des molécules de type lectine (Chagot, 1992).

Une expérience complémentaire sera à effectuer pour démontrer que les polypeptides révélés sont bien des molécules glycosylées. Une digestion à l'Endoglycosidase F, qui rompt les liaisons entre les résidus mannose et les protéines, sera à réaliser avant électrophorèse. La disparition des marquages sera ensuite à confirmer.

E. Caractérisation antigénique des protéines constitutives de *Bonamia ostreae*

La caractérisation antigénique du parasite a été réalisée d'une part, à l'aide d'anticorps polyclonaux et monoclonaux au moyen de la technique de western blotting et, d'autre part, en utilisant la méthode de double diffusion (Ouchterlony).

Les anticorps polyclonaux ont été préparés sur souris OF1, par quatre injections intrapéritonéales, soit de lysats de parasites totaux, soit de protéines préalablement séparées sur gel SDS-PAGE. Les masses moléculaires des bandes ayant servi à l'immunisation sont répertoriées dans le tableau suivant :

Numero 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 1 : Récapitulatif des masses moléculaires des bandes ayant servi à l'immunisation

Sept immunosérums ont ainsi été obtenus. Les deux anticorps monoclonaux anti-bonamia (15C2 et 20B2) étaient déjà disponibles (Rogier *et al.*, 1991). Les anticorps polyclonaux et

monoclonaux ont été testés, par la technique de Western blotting, sur membranes de transfert de nitrocellulose ou Immobilon après électrophorèse des lysats de parasites (+PMSF).

Les anticorps polyclonaux préparés à partir de lysats de parasites totaux, testés par la technique de western blotting, ont révélé une réactivité vis-à-vis d'au moins dix protéines parasitaires (figure 9 c, 1 et 2).

En ce qui concerne les immunosérums obtenus à partir de protéines séparées par gel SDS-PAGE, lors d'un premier essai en Western blotting, seul un immunosérum, préparé avec la bande 5, a donné un marquage (figure 10 c). Ces résultats sont étonnants, et plusieurs hypothèses peuvent être émises. La première est que les bandes reconnues par cet immunosérum pourraient correspondre à la dégradation d'un polypeptide, mais cette interprétation reste difficile dans la mesure où le polypeptide qui a servi à l'immunisation n'est pas marqué. Une autre hypothèse est que cette bande 5, étant faiblement glycosylée (figure 9 a et b), il y ait, dans l'immunosérum, des anticorps dirigés contre un motif glycosylé. En effet, les glycosylations sont très immunogènes. Dans ce cadre, les glycosylations n'étant exprimées que de manière faible sur le polypeptide ayant servi à l'immunisation, il n'y ait pas de marquage. Par contre, des polypeptides, plus fortement glycosylés, ont pu être révélés par cet immunosérum. En effet, un anticorps spécifique de déterminants carbohydrates peut avoir une réactivité vis-à-vis de protéines différentes portant le même résidu glycosylé. Ces résultats sont toutefois intéressants dans la mesure où les anticorps polyclonaux préparés à partir de polypeptides séparés en SDS-PAGE donnent peu de marquages.

Il serait intéressant d'utiliser de tels réactifs immunologiques pour la caractérisation de structures antigéniques conservées communes à d'autres protozoaires du phylum des *Ascetospora*, en particulier avec ceux assimilables à des *Bonamia*, tel que *Bonamia sp.*, parasite observé en Nouvelle Zélande sur *Ostrea chilensis* et *Tiostrea lutaria*.

Par ailleurs, les deux anticorps monoclonaux disponibles (15C2 et 20B2) ont été testés sur une membrane de transfert après électrophorèse d'un échantillon de parasite purifié et lysé en présence de PMSF. L'anticorps monoclonal 15 C2 permet de révéler au moins une dizaine de bandes (figure 9 c, 4). Ce résultat est surprenant et difficilement interprétable, car nous pouvions nous attendre à obtenir une bande ou tout au plus quelques bandes. Cependant, ce résultat pourrait être expliqué par la présence d'un motif glycosylé commun à plusieurs polypeptides. Le second anticorps monoclonal 20B2 testé au 1 / 10 ème ne permet pas une révélation nette de bande sur la membrane (figure 9 c, 3).

Ces anticorps ont également été testés en immunofluorescence indirecte (IFI) sur coupes de tissus parasités et sur parasites purifiés cytocentrifugés.

En ce qui concerne l'anticorps 15C2, des coupes histologiques de tissus fortement infestés, testées avec cet anticorps dilué au 1/100ème, révèlent un marquage des noyaux cellulaires de l'huître plate (figure 13 c). Il est possible de noter que la plupart des noyaux des huîtres plates révèlent une fluorescence très fine au niveau de la membrane nucléaire et des amas de chromatine. Par ailleurs, l'observation de certains nucléoles exempts de marquage laisse supposer que cet anticorps n'est spécifique que de l'ADN. Cet anticorps a été également testé, au 1/100ème sur parasites purifiés cytocentrifugés (fixés acétone ou méthanol). Seules les préparations fixées en acétone révèlent un marquage intracellulaire des parasites.

Pour sa part, l'anticorps monoclonal 20B2 s'avère tout aussi surprenant. Sur parasites purifiés cytocentrifugés, fixés en acétone, un marquage net intracellulaire des parasites, est observé (figure 13 a). En revanche, l'emploi d'un autre fixateur, le méthanol, éteint tout signal. Les coupes histologiques de tissus infestés, testées avec cet anticorps dilué au 1/100ème, présentent un marquage discret du parasite mais également de certaines sécrétions cellulaires (figure 13 b). Cette fluorescence faible observée au niveau du parasite pourrait être due à l'emploi du fixateur (Davidson), qui bloquerait certains épitopes et de ce fait atténuerait le marquage. Pour confirmer cette hypothèse, il nous a semblé intéressant de traiter par la trypsine les tissus, avant marquage. En effet, ce traitement pouvant libérer certains sites antigéniques, peut permettre ainsi une meilleure accessibilité à l'anticorps. Sur coupes histologiques infestées, traitées ou non par la trypsine, les résultats obtenus restent identiques et difficilement interprétables. Par ailleurs, le grand nombre de parasites non marqués observés, laisserait supposer une absence de reconnaissance des épitopes parasitaires. Néanmoins, certains hémocytes présentent dans leur cytoplasme des petites plages sphériques légèrement fluorescentes. Cependant, ces corpuscules, de taille indentique à *Bonamia ostreae*, en lumière normale, semblent amorphes, et rendent toute interprétation sujette à caution.

Il est intéressant de noter que la sélection de ces deux anticorps monoclonaux a été effectuée par la technique d'IFI sur appositions cardiaques d'animaux fortement infestés, fixées en acétone (figure 13 d). Dans ce cas, les antigènes sont en conditions natives, contrairement aux antigènes utilisés pour le western blotting après traitement par un tampon de lyse. Ceci a sans doute conduit à la sélection d'anticorps dont la réactivité est meilleure vis-à-vis d'antigènes natifs.

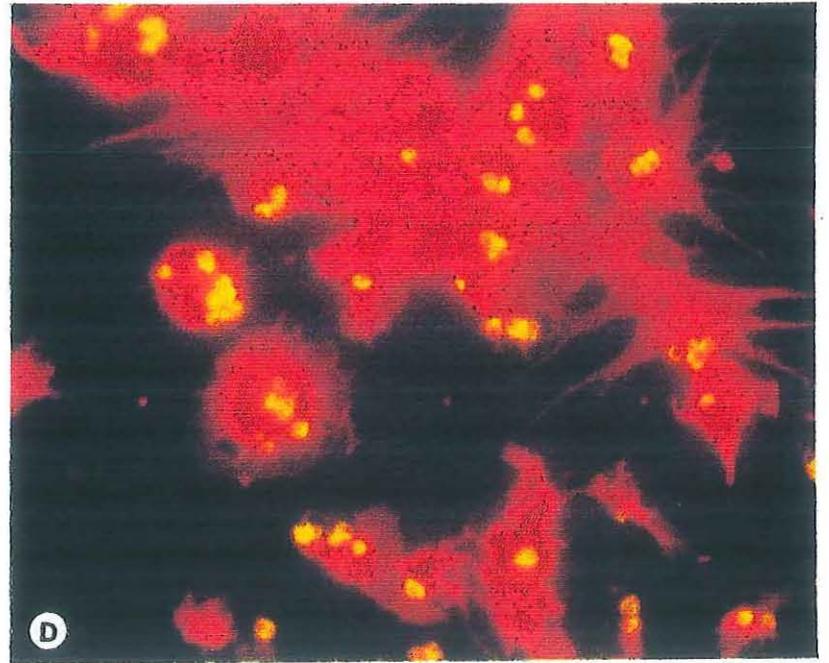
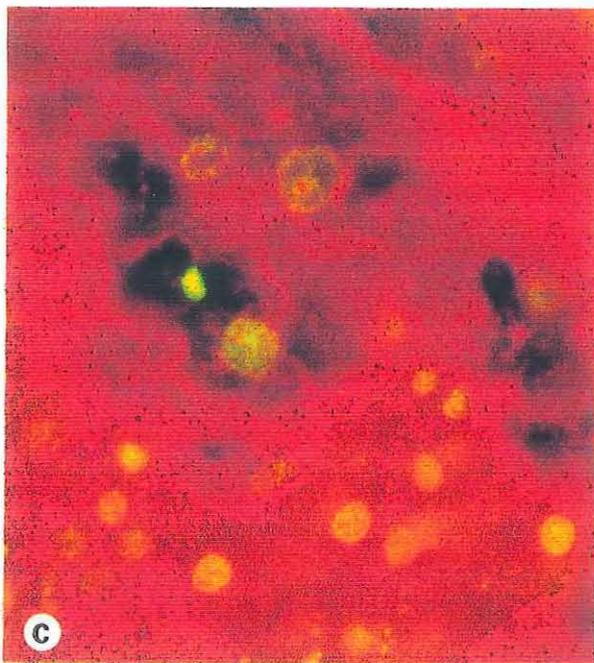
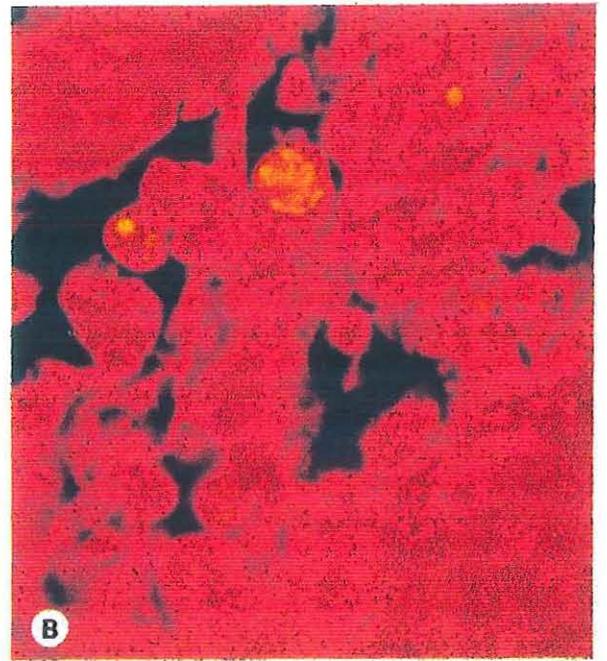
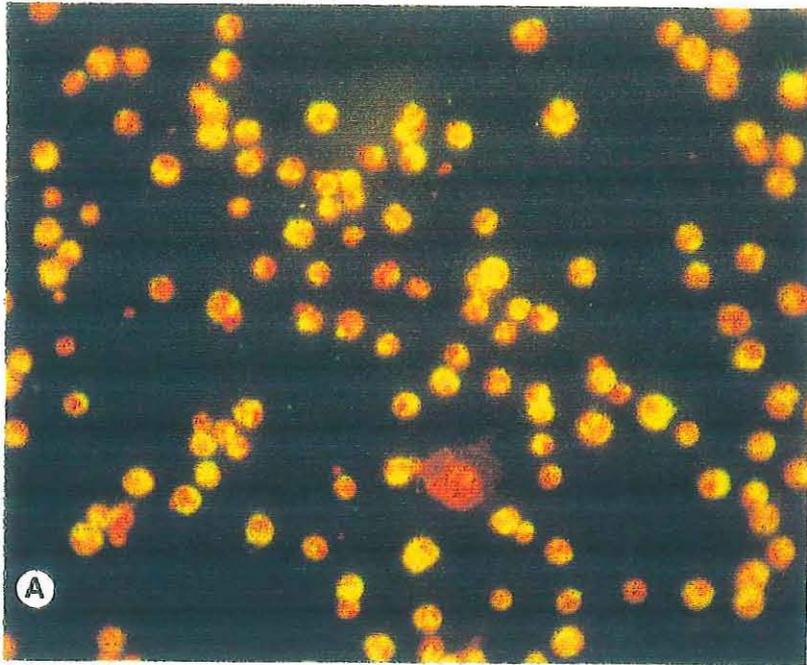


Figure 13 : Profils d'immunofluorescence des anticorps monoclonaux spécifiques du parasite *Bonamia ostreae*

- anticorps monoclonal 20B2

A : marquage sur parasites purifiés cytocentrifugés fixés en acétone

B : marquage sur coupe histologique (fixée en Davidson) de tissus fortement infestés par *B.ostreae*

- anticorps monoclonal 15C2

C : marquage sur coupe histologique (fixée en Davidson) de tissus fortement infestés par *B. ostreae*

D : marquage sur frottis cardiaque d'individu parasité (fixé en acétone)

Nous avons vu précédemment l'intérêt d'une approche plurielle et la nécessité de tester différentes techniques complémentaires utilisant les anticorps. Ceci nous a amené à tester la propriété de précipitation des antigènes de *Bonamia ostreae* par les immunosérums grâce à la méthode de double diffusion. Aucun des anticorps polyclonaux n'a donné lieu à la formation d'un arc de précipitation. Il faut rappeler que la formation d'un arc de précipitation dépend en grande partie, non seulement de la concentration en antigène cibles, mais aussi de la concentration des anticorps spécifiques et du type d'immunoglobuline.

La caractérisation par les techniques d'immunofluorescence, d'immunohistochimie et d'immunogold est poursuivie.

IV. ETUDE DES MECANISMES DE DEFENSE DES MOLLUSQUES

A moyen terme, le contrôle des maladies des mollusques bivalves marins pourrait reposer sur l'élevage de souches sélectionnées sur la base de critères de « résistance » aux infections. Dans cette perspective, les recherches doivent être intensifiées pour caractériser les constituants de leur système de défense et comprendre les bases cellulaires intervenant dans les processus anti-infectieux, en référence aux travaux réalisés sur les protozoaires parasites de vertébrés, tels que les toxoplasmes ou les leishmanies qui sont capables de survivre et se développer dans les cellules immunocompétentes de type macrophage.

A. Etude des interactions hôte/parasite, *in vivo*

Les opérations d'amélioration génétique des mollusques bivalves marins visant à accroître la résistance d'une espèce vis à vis d'une ou de plusieurs maladies, sont actuellement très limitées. Elles concernent l'optimisation d'un caractère de résistance naturelle. Des travaux ont été réalisés dans cet esprit par Drinnan (1967) au Canada dans le cas de la maladie de Malpègue. La constitution progressive d'un stock d'huîtres ayant survécu à l'épizootie lui a permis d'obtenir des descendants dont le taux de survie était supérieur à celui d'huîtres témoins qui n'avaient jamais été en contact auparavant avec le pathogène. Cette méthode a été reprise par Haskin et Ford (1979) pour créer des populations de *Crassostrea virginica* résistantes à *Haplosporidium nelsoni*. Ce principe a également été utilisé avec succès par Beattie *et al.* (1980) pour sélectionner des animaux de l'espèce *Crassostrea gigas* moins sensibles aux mortalités estivales.

De même, en 1989, une production d'huîtres plates *Ostrea edulis* a été réalisée en éclosérie à partir de géniteurs naturels ayant survécu en zone d'endémie du parasite *Bonamia ostreae*, et dont la sélection avait été forcée par inoculation de ce parasite (Martin *et al.*, 1993). La technique d'inoculation, dans ce cadre, est utilisée à la fois pour accélérer l'estimation du degré de « résistance » et pour augmenter la pression de sélection (Hervio *et al.*, 1995). Les huîtres survivantes sont alors utilisées comme géniteurs d'une génération de deuxième niveau. Ainsi, depuis 1989, plusieurs populations d' *Ostrea edulis* sélectionnées pour leur caractère de « résistance » au parasite *B. ostreae* ont été produites.

Afin de caractériser de façon précise les différents types hématocytaires rencontrés chez ces populations d'huître plate et d'étudier l'existence d'une corrélation entre le statut de « résistance » à la bonamiose et la formule hématocytaire des animaux, une comparaison des hémogrammes a été réalisée entre des animaux susceptibles et « résistants » maintenus en laboratoire. Un comptage de la population totale et des différents types hématocytaires a été effectué sur quatre populations :

- deux susceptibles à l'infestation causée par le parasite *B. ostreae* originaires de la Baie de Quiberon et de Méditerranée,
- deux « résistantes » (F0xF1 et F1xF2),

Ces quatre populations avaient subi, huit mois auparavant, une injection intrapéricardique d'une suspension de parasites purifiés (150 000 parasites/animal).

Après ouverture précautionneuse des animaux, l'hémolymphe a été prélevée au niveau de la cavité cardiaque avec une aiguille montée sur une seringue contenant une solution anti-agrégante modifiée d'Alsever. L'hémolymphe prélevée, diluée instantanément dans l'Alsever (1 volume/3 volumes) a été répartie comme suit :

- 50 µl des échantillons prélevés ont servi à effectuer un comptage des hémocytes totaux sur cellule de Malassez,
- 100 µl des échantillons prélevés ont été déposés sur lame histologique par cytocentrifugation. La reconnaissance et le comptage des différents types hématocytaires est en cours de réalisation par observation de 100 cellules/animal, en microscopie photonique.
- 500 µl des échantillons prélevés ont été centrifugés en microtubes. Les culots ont été fixés en glutaraldéhyde. L'étude ultrastructurale des différents types hématocytaires en microscopie électronique à transmission est poursuivie.

Les résultats préliminaires sont intéressants et mettent en exergue une différence nette du comptage total des hémocytes chez ces quatre populations. La densité cellulaire (nombre de cellules/ millilitre) de l'hémolymphe est moins importante chez les huîtres sélectionnées que chez les huîtres susceptibles (figure 14 a). Par ailleurs, les comptages des différents types hématocytaires indiquent que les grands hyalinocytes sont moins nombreux chez les huîtres « résistantes » que chez les huîtres susceptibles (figures 14 b et c). Parallèlement, des comptages des types hématocytaires infestés, *in vivo*, semble désigner cette population comme la plus susceptible à l'infestation. Si des travaux préliminaires existent quant aux interactions

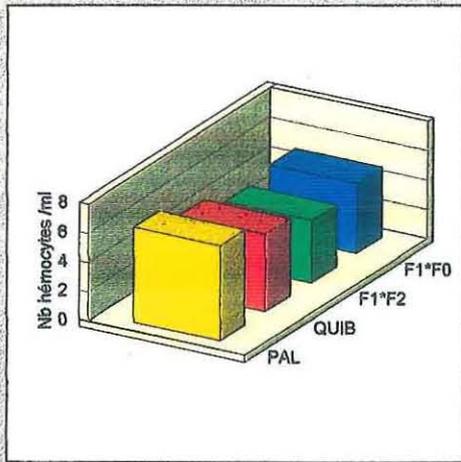


figure 14 a : comptage d'hématocytes dénombrés par ml

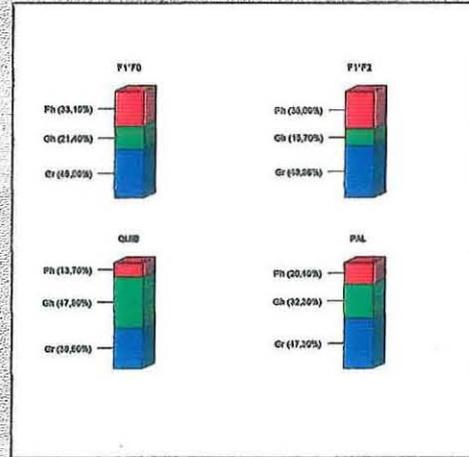


figure 14 b : pourcentages cumulés des différents types hématocytaires

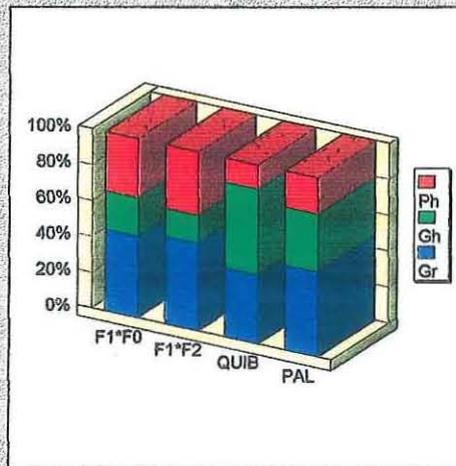


figure 14 c : pourcentages cumulés des différents types hématocytaires

Ph : petits hyalinocytes
 Gh : grands hyalinocytes
 Gr : granulocytes

F1*F2 populations d'huîtres plates "résistantes"
 F1*F0

QUIB populations d'huîtres plates susceptibles
 PAL

hémocyte/parasite dans un système de maintien en survie, *in vitro*, peu d'études concernant les relations existantes cellules hôtes / parasites, *in vivo*, ont été publiées. Les résultats rapportés par Hine (1994) concernant le parasite *Bonamia sp.* de l'huître *Triostrea lurida* sont d'autant plus intéressants qu'ils montrent que la population majoritairement infestée par ce parasite, les hyalinocytes, ne correspond pas au type hémocytaire, granulocytes, décrit comme principalement infesté par le parasite *Bonamia ostreae* (Mourton *et al.*, 1992). Il faut préciser que ces résultats ont été obtenus, *in vitro*. Il est possible d'émettre l'hypothèse que ce système, de maintien en survie des cellules sur lames, ait sélectionné certains types hémocytaires.

B. Etude des interactions hôte/parasite, *in vitro*

Les mécanismes, qui permettent aux parasites de s'établir et d'induire dans l'hôte la pathologie, sont peu étudiés. Des infections expérimentales d'hémocytes d'*Ostrea edulis* par *Bonamia ostreae* ont pu être réalisées à partir de primocultures en suspension sur lames (Mourton *et al.*, 1992). Cependant, dans cette étude, les cellules étaient maintenues en culture durant une courte période. En outre, une sélection des populations hémocytaires était accomplie par le fait que seules les cellules adhérant rapidement aux lames étaient conservées, les autres étant éliminées par les lavages successifs des lames. Dans ce cadre, seuls des progrès techniques de primocultures, *in vitro*, peuvent pallier l'absence de lignée hémocytaire établie. Dans cette optique, une technique de primoculture en microplaque des hémocytes d'*Ostrea edulis* a été mise au point. Cet outil devra nous permettre, dans un premier temps, une étude plus approfondie de la structure et du rôle des hémocytes en tant que cellules « immunitaires » des mollusques, et dans un second temps, de comprendre les mécanismes de défense qui régissent la reconnaissance et le devenir intracellulaire du parasite *B.ostreae* dans la cellule hôte.

Les expériences ont consisté essentiellement à choisir parmi différents milieux synthétiques ou empiriques, celui qui permettait la meilleure survie dans le temps des cellules mais également une multiplication cellulaire. Les tests ont été réalisés en microscopie photonique pour les contrôles de viabilité, numération et aspect du tapis cellulaire, et en microscopie électronique à transmission pour la conservation morphologique des différents types cellulaires. Des milieux, tels que le L15, le milieu de Grace ou le milieu 199, reconstitués en eau de mer ou en solution modifiée d'Alsever, ont été testés puisqu'ils sont

utilisés pour le maintien, *in vitro*, de cellules de mollusques bivalves (Wen *et al.*, 1993 ; Le Deuff *et al.*, 1994 ; Renault *et al.* in press), et d'autres invertébrés (insectes et crustacés).

Des essais de supplémentation en antibiotiques et facteurs de croissance-multiplication ont également été effectués. L'addition d'antibiotiques dans les milieux de cultures a été réalisée afin de vérifier si elle permet d'éliminer les problèmes de contamination bactérienne sans avoir d'effets néfastes sur les cellules. Par ailleurs, différentes substances ont été testées sur la croissance et la multiplication des hémocytes *in vitro* (sérum foetal de veau, hémolymphe de diverses bivalves, facteurs de croissance...).

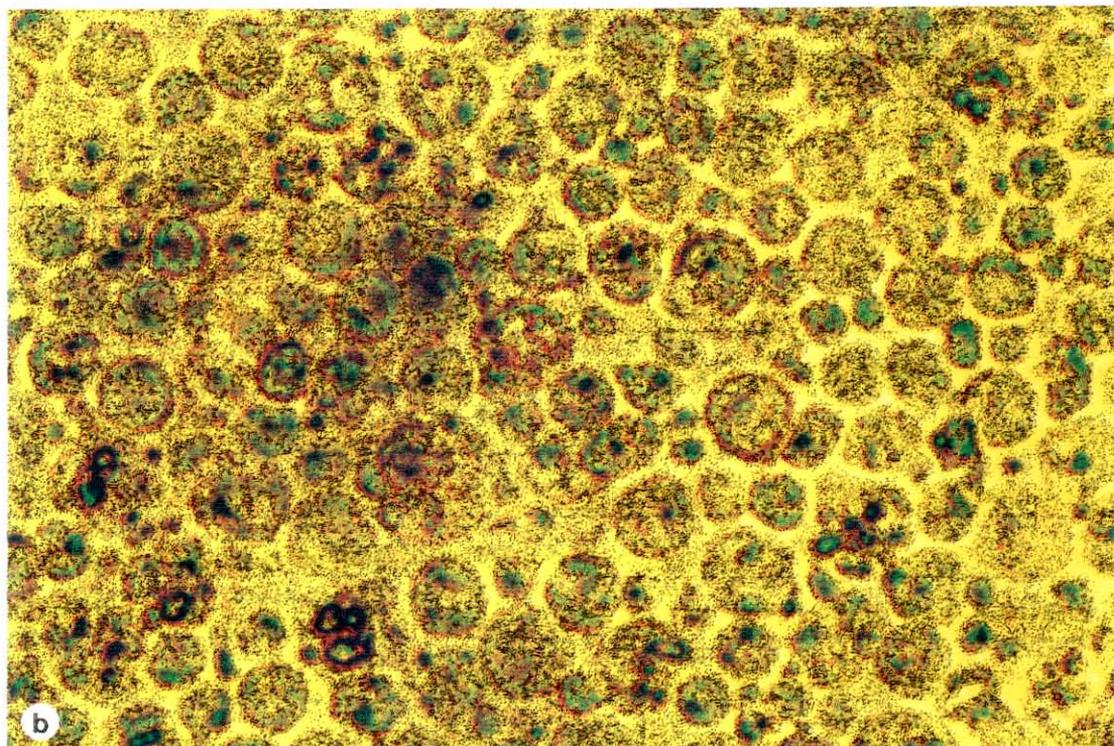
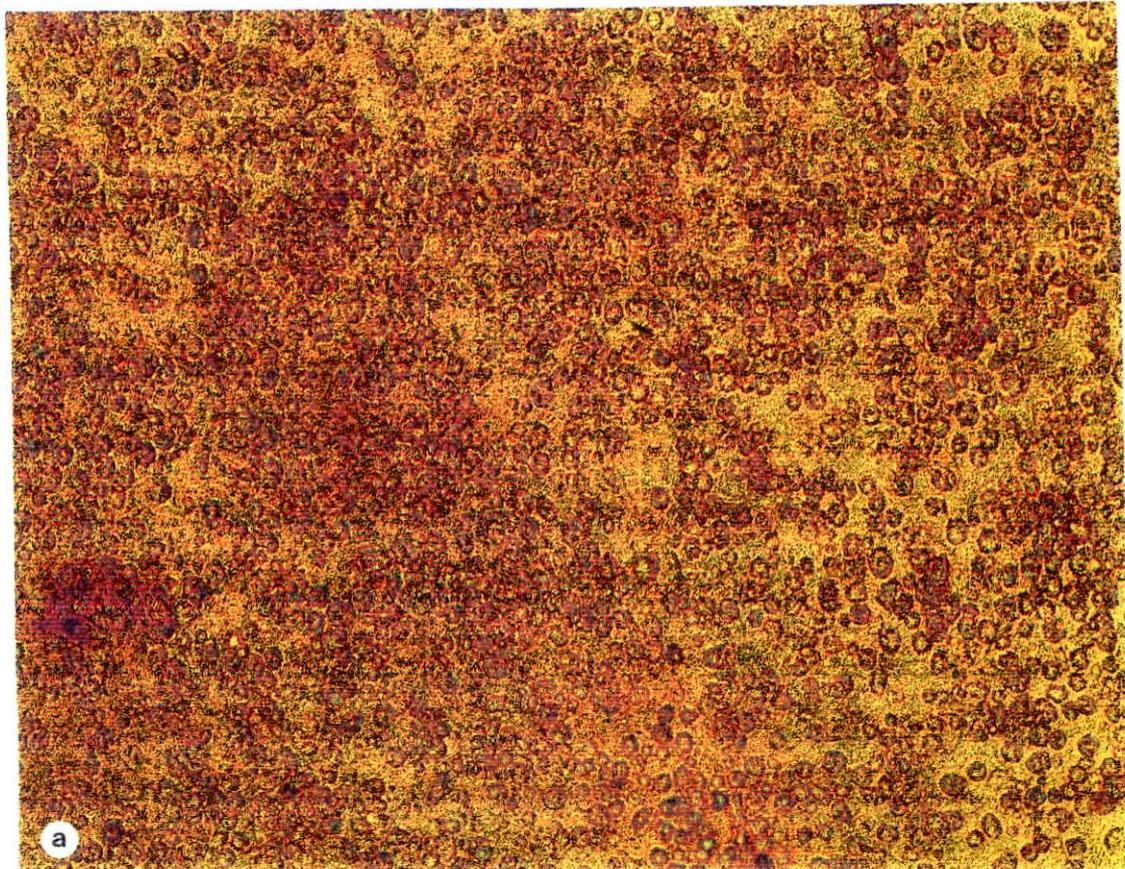
Il ressort de toutes les expériences que des milieux empiriques (eau de mer ou solution d'Alsever) ne sont pas appropriés à la culture d'hémocytes d'huître plate, puisqu'ils ne permettent pas la survie des cellules dès les premiers jours de culture.

Les hémolymphe d'huître plate et d'huître creuse, malgré la complexité de leur composition, restent inadaptées à la culture des hémocytes, d'autant plus que la difficulté en approvisionnement rend leur utilisation aléatoire.

Le milieu de base optimisant le maintien en culture des hémocytes s'est avéré être le milieu de Leibovitz (L15) additionné de sérum de veau foetal à 10 % et d'une solution d'antibiotiques (figures 15 a et b).

Suite à la mise au point d'un milieu de culture adapté au maintien des hémocytes, *in vitro*, le travail sera focalisé:

- sur l'obtention d'un protocole reproductible de primoculture des hémocytes d'huîtres plates ainsi que des méthodes pour conserver et propager ces cellules (congélation),
- sur l'étude des interactions entre le parasite, *Bonamia ostreae*, et ses cellules hôtes, les hémocytes, en particulier à moyen et long terme,
- la culture du parasite.



Hémocytes en milieu L15 reconstitué en solution modifiée d'Alsever (+ antibiotiques)

- *figure 15 a : après 48 heures de culture (x 100)*
- *figure 15 b : après 48 heures de culture (x 600)*

C. Essais de séparation des différents types hémocytaires d'*Ostrea edulis*

L'étude comparée des comptages des hémocytes des quatre populations d'huître plate *Ostrea edulis*, sensibles, et « résistantes », a fait apparaître des différences évidentes dans la répartition des types hémocytaires. Les données actuelles sur les hémocytes mettent en évidence des différences fonctionnelles parmi les types cellulaires. La disponibilité d'une technique de séparation, couplée à celle de primoculture, rendrait possible des études fonctionnelles par type cellulaire. En outre, cela permettrait de caractériser de façon précise les cellules effectrices actives de « l'immunité » chez les huîtres plates.

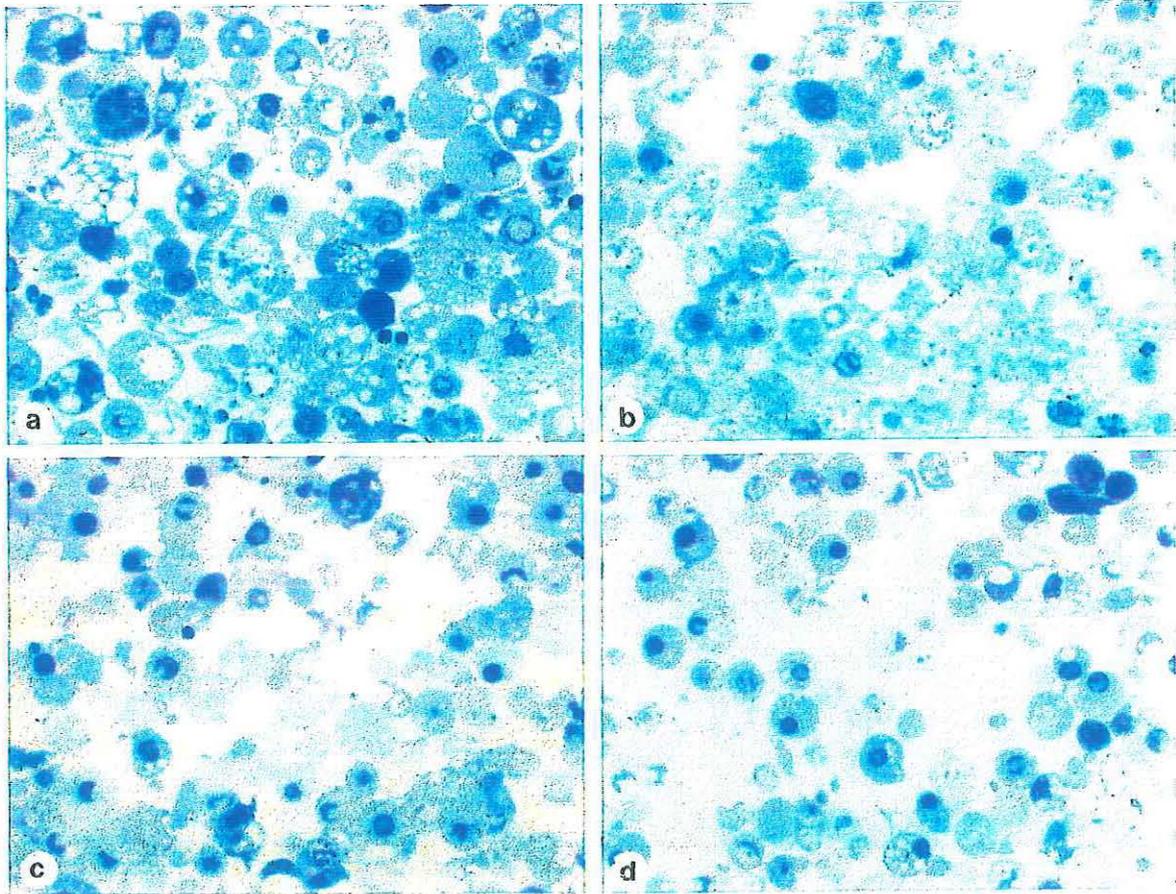
Plusieurs essais ont été effectués en séparant les populations d'hémocytes par centrifugation sur gradients de Percoll (Bachère *et al.*, 1988) et sur gradients de sucrose (Cheng *et al.*, 1979). Ces techniques de séparation, notamment la première, basées sur une différence de densité au sein de la population hémocytaire ont permis de séparer tous les types hémocytaires : cellules agranuleuses, cellules granuleuses, petites hyalinocytes.

Un gradient discontinu de Percoll en solution modifié d'Alsever (20, 30, 40, 50, 60, et 70 %) a été réalisé.

Les fractions recueillies au niveau des interfaces ont été analysées en microscopie photonique après cyto-centrifugation et coloration à l'Hémacolor, mais également en microscopie électronique à transmission après fixation en glutaraldéhyde et post-fixation en acide osmique. Ces analyses, en partie réalisées, ont permis de vérifier l'efficacité du protocole de séparation et l'inocuité de ce traitement sur les cellules.

Les cellules collectées aux interfaces du gradient de Percoll et identifiées en microscopies photonique et électronique (pour la plupart) correspondent :

- pour l'interface 20-30%, à une population hétérogène constituée de granulocytes, grands et petits hyalinocytes (figure 16 a),
- pour les interfaces, 30-40 %, et 40-50 % à une population hétérogène de hyalinocytes (grands et petits) (figure 16 c et d),
- pour les interfaces 50-60 % et 60-70 % à une population riche en granulocytes (figure 16 b).



Clichés de coupes semi-fines de populations d'hémocytes séparés sur gradient de Percoll

- *figure 16 a : population hétérogène de granulocytes, grands et petits hyalinocytes collectés à l'interface 20-30 %*
- *figure 16 b : population homogène de granulocytes collectés à l'interface 60-70 %*
- *figure 16 c : population homogène de hyalinocytes (grands et petits) collectés à l'interface 30-40 %*
- *figure 16 d : population homogène de hyalinocytes (grands et petits) collectés à l'interface 40-50%*

En microscopie photonique :

- les petites cellules hyalines sont de taille hétérogène (5 à 10 μm). Le rapport nucléocytoplasmique est élevé mais variable. Le cytoplasme, qui peut contenir quelques granulations, est coloré en bleu plus ou moins intense. Leur contour est généralement irrégulier et peut présenter de nombreux prolongements cytoplasmiques.
- les cellules agranuleuses (ou grands hyalinocytes), de taille homogène (15 μm) ont un rapport nucléocytoplasmique faible. Leur cytoplasme se colore en gris rosé ou rose pâle,
- les cellules granuleuses, de taille plus ou moins variable (entre 10 et 15 μm) ont un rapport nucléocytoplasmique faible. Leur cytoplasme contient de nombreuses granulations, soit basophiles, soit réfringentes.

En microscopie électronique à transmission :

- les petites cellules hyalines ont des noyaux apparaissent centraux avec une chromatine déposée « en fer à cheval ». Ces cellules peuvent présenter quelques dépôts denses aux électrons. Compte tenu de la présence de ces quelques structures à « aspect granuleux », le terme « cellule hyaline » ne semble pas tout à fait approprié. Ces cellules correspondraient d'avantage à des cellules indifférenciées,
- les cellules agranuleuses comportent d'innombrables petites vésicules claires aux électrons,
- les cellules granuleuses présentent fréquemment des granules de structure hétérogène. Le cytoplasme renferme trois types de granules :
 - 1) granules à cortex dense et centre clair aux électrons
 - 2) granules uniformément dense
 - 3) granules à centre dense et cortex clair

Ces résultats préliminaires sont intéressants, et nécessitent d'être poursuivis. Il sera alors possible de préparer des réactifs immunologiques spécifiques des différentes populations hématocytaires. Ils permettront d'identifier plus précisément les types cellulaires. Les critères morphologiques et physicochimiques utilisés jusqu'alors sont insuffisants pour préciser les processus de filiation des hématocytes et analyser leurs fonctions spécifiques.

V. BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- 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.
- 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 hémocytaires chez quelques Mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse Doctorat de spécialité en Océanographie, Univ. Bret. Occ. Brest, 153 pp.
- 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. 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.
- BEATTIE, J.H., CHEW, K.K. and HERSHBERGER, K., 1980. Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea Gigas*) during summer mortality. *Proc. nat. Shellfish. Ass.*, 70 : 184-189.
- 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.

- CHAGOT, D., 1989.** Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (ascetospora). Thèse EPHE Sciences de la Vie et de la Terre. Univ. Montpellier.
- 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., 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., HUANG, J.W., KARADOGAN, H., RENWRANTZ, L.R. and YOSHINO, T.P., 1980.** Separation of oyster hemocytes by density centrifugation and identification of their surface receptors. *J. Invertebr. Pathol.*, 36 : 35-40.
- 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* (Ascetospora) 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.
- COOPER, E.L. and ROCH, P., 1986.** Second set allograft responses in the earthworm *Lumbricus terrestris* : kinetics and characteristics. *Transplantation*, 41(4) : 514-520.
- 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.
- 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 polysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 119 : 325-329.
- ELSTON, R.A., FARLEY, C.A. and KENT, M.L., 1986. Occurrence and significance of bonamiosis in European flat oyster *Ostrea edulis* in North America. *Dis. Aquat. Org.*, 2 : 49-54.
- 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.
- HERVIO, D., 1992. Contribution à l'étude de *Bonamia ostreae* (Asctospora), 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* (Asctospora). *Dev. Comp. Immunol.*, 13 : 449.
- HERVIO, D., BACHERE, E., BOULO, V., COCHENNEC, N., VUILLEMIN, V., LE COGUIC, Y., CAILLETAUX, G., MAZURIE, J. and MIALHE, E., 1995. Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *Ostrea edulis* with the intrahaemocytic protozoan parasite *Bonamia ostreae* : application in the selection of parasite-resistant oyster. *Aquaculture* 132 : 183-194.
- HINE, P.M., and WESNEY, B., 1994. Interaction of phagocytosed *Bonamia sp.* (Haplosporidia) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis*. *Dis. Aquat. Org.* 20(3) : 219-229.
- HOWLAND, K.H. and CHENG, T.C., 1982. Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 39 : 123-132.
- 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.
- 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.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685.

- LEGALL, 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.
- LIE, K.J. and HEYNEMAN, D., 1975.** Studies on resistance in snails : a specific tissues reaction to *Echinostoma lidoense* in *Biomphalaria glabrata* snails. *Int. J. Parasitol.*, 5 : 621-625.
- 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.
- LOWE, D.M. and MOORE, M.N., 1979.** The cytology and occurrence of granulocytomas in mussels. *Mar. Poll. Bull.*, 10 : 137-141.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- NOEL, D., BACHERE, E. and MIALHE, E., 1993.** Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Dev. Comp. Immunol.*, 17 : 483-493.
- 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.
- PICHOT, Y., COMPS, M., GRIZEL, H. et RABOUIN M.A., 1980. Recherches sur *Bonamia ostreae*, gen. n. sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 43 : 131-140.
- PIPE, R.K., 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocyte of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.*, 22 : 595-603.
- PODER, M., 1980. Les réactions hémocytaires inflammatoires et tumorales chez *Ostrea edulis* (L.). (Essais de classification des hémocytes des Mollusques bivalves). Thèse 3ème cycle. Univ. Bret. Occ. U.E.R. Sci. Tech., 95 pp.
- READE, P. and READE, E., 1976. Phagocytosis in invertebrates : studies on the hemocytes of the clam *Tridacna maxima*. *J. Invertebr. Pathol.* 28 : 281-290.
- RENAULT, T., FLAUJAC, G. and LE DEUFF, R.M. Isolation and culture of heart cells from the european flat oyster, *Ostrea edulis*, (in press).
- 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.
- 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. Aquac. Org.* 11 : 135-142.
- RUDELLE, 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.
- SMINIA, T. and VAN DER KNAAP, W.P.W., 1987. Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev. Comp. Immunol.*, 11 : 17-28.
- 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.
- 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
- WEN, C.M., KOU, G.H. and CHEN, S.N., 1993. Cultivation of cells from the heart of the hard clam, *Meretrix lusoria* (Röding). *J. Tiss. Cult. Meth.*, 15 : 123-130.

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