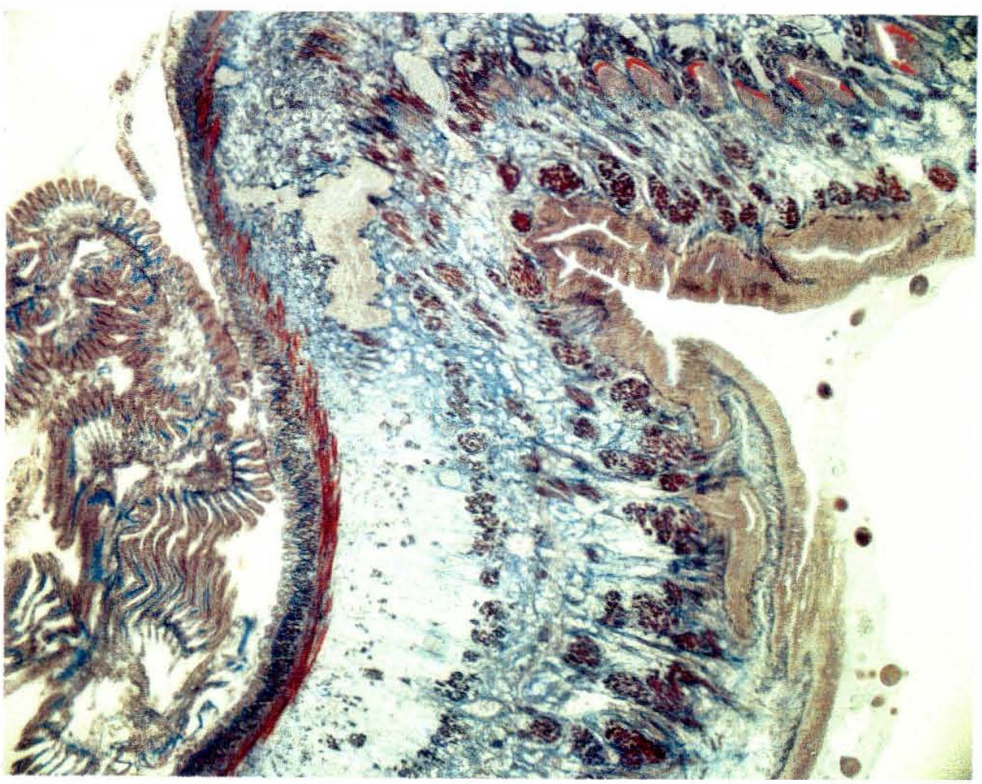
I U T DE LA ROCHELLE

D U T Biologie Appliquée
Rapport de stage de 2ème année
Présenté par B. CHOLLET

DIAGNOSTIC DES PATHOLOGIES RENCONTREES CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES MARINS.

AVRIL 1994 - JUIN 1994 .



Maître de stage : Tristan RENAULT

Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales.
BP 133, Ronce les Bains
17390 La Tremblade.

IFREMER

Sommaire

Introduction. p 1

Rappels concernant les principales pathologies observées chez les mollusques bivalves marins. p 2

I - Rappels concernant les principaux agents pathogènes rencontrés chez les mollusques bivalves marins. p 2

1 . Agents viraux. p 2
1.1 . *Iridoviridae.* p 2
1.1.1 . Agent responsable de la maladie des branchies. p 4
1.1.2 . Infection hémocytaire de l'huître portugaise. p 4
1.1.3 . Oyster Velar Virus Disease (OVVD). p 5
1.2 . *Herpesviridae.* p 5

2 . Agents bactériens. p 7
2.1 . La nécrose bacillaire. p 7
2.2 . Maladie de l'anneau brun. p 7
2.3 . Infections rickettsiennes. p 7
2.4 . Infections à chlamydies. p 10

3 . Agents protozoaires. p 10
3.1 . Phylum des *Apicomplexa.* p 10
3.1.1 . Classe des *Perkinsea.* p 10
3.1.2 . Classe des *Sporozoea.* p 12
3.2 . Phylum des *Ascetospora.* p 12
3.2.1 . Genre *Haplosporidium.* p 14
3.2.2 . Genre *Marteilia.* p 14
3.2.3 . Genre *Bonamia.* p 15
3.2.4 . Genre *Mikrocytos.* p 15

4 . Agents métazoaires. p 15

II - Rappels concernant les règlementations européennes. p 16

PREMIERE PARTIE : Herpèsvirus-like. p 17

I - Matériel et méthodes. p 17

1 . Histologie. p 17
1.1 . Fixation. p 17
1.2 . Déshydratation et imprégnation. p 18
1.3 . Réalisation des coupes. p 18
1.4 . Coloration. p 18
1.4.1 . Coloration topographique : Hémalun-Eosine. p 18
1.4.2 . Coloration nucléale de Feulgen et Rossenbeck. p 18
1.4.3 . Montage des lames. p 19

2 . Microscopie électronique à transmission (MET). p 19
2.1 . Préparation des échantillons. p 19
2.2 . Préparation des coupes et contraste. p 19

2.3 . Technique de marquage à l'or colloïdal : immunogold. p 19

3 . Culture cellulaire. p 20
3.1 . Reproduction de l'Herpèsvirus sur larves axéniques. p 20
3.1.1 . Matériel biologique. p 20
3.1.2 . Décontamination des géniteurs. p 20
3.1.3 . Prélévement des gamètes. p 20
3.1.4 . Fécondation. p 20
3.1.5 . Inoculation du virus. p 20
3.2 . Essais de reproduction de l'herpèsvirus-like sur lignée cellulaire BF2. p 21
3.2.1 . Lignée cellulaire. p 21
3.2.2 . Conditions de culture de la lignée cellulaire BF2. p 21
3.2.3 . Inoculation du virus. p 21
3.2.4 . Recherche du virus et de ses éventuels effets cytopathogènes. p 21
3.3 . Primoculture de cellules cardiaques d'huître creuse. p 21
3.3.1 . Matériel biologique. p 21
3.3.2 . Désinfection des huîtres et des tissus. p 21
3.3.3 . Prélèvement des tissus. p 22
3.3.4 . Dissociation des cellules. p 22
3.3.5 . Entretien des cultures. p 22
3.3.6 . Inoculation du virus. p 22

II - Résultats-discussion. p 22

DEUXIEME PARTIE : Agents procaryotes. p 33

I - Agents de type chlamydien décrit chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.. p 33

1 . Matériel et méthodes. p 33
1.1 . Histologie. p 33
1.2 . Microscopie électronique à transmission (MET). p 33
1.3 . Techniques immunocytochimiques. p 33
1.3.1 . Technique d'immunofluorescence indirecte (IFI). p 34
1.3.2 . Tchnique d'immunoperoxydase. p 34

2 . Résultats-discussion. p 34

II - Recherche de l'étiologie d'un syndrôme de type "anneau brun" chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*. p 39

1 . Matériel et méthodes. p 39
1.1 . Histologie. p 39
1.2 . Microscopie électronique à transmission (MET). p 40
1.3 . Bactériologie. p 40
1.3.1 . Désinfection des huîtres. p 40
1.3.2 . Récupération du liquide intervalvaire. p 40
1.3.3 . Réalisation du broyat. p 40
1.3.4 . Dénombrement. p 40
1.3.5 . Repiquage des colonies. p 41
1.3.6 . Identification des souches bactériennes. p 41

2 . Résultats-discussion. p 41

TROISIEME PARTIE : Agents protozoaires. p 48

I - *Marteilia refringens*.. p 48

1 . Matériel et méthodes. p 48
1.1 . Appositions de glande digestive. p 48
1.2 . Histologie et microscopie électronique à transmission (MET). p 48
1.3 . Immunofluorescence indirecte (IFI). p 48

2 . Résultats-discussion. p 49

II - *Bonamia ostreae*. p 54

1 . Matériel et méthodes. p 54
1.1 . Apposition cardiaque. p 54
1.2 . Histologie et microscopie électronique à transmission (MET). p 54
1.3 . Immunofluorescence indirecte (IFI). p 54
1.4 . Purification du *B. ostreae*. p 54
1.5 . Technique de reproduction de la maladie au laboratoire. p 55
1.5.1 . "Anesthésie" et triage des huîtres. p 55
1.5.2 . Inoculation du parasite. p 55

2 . Résultats-discussion. p 55

Conclusion. p 60

Bibliographie.

Annexes.

INTRODUCTION

Introduction

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est aujourd'hui une des espèces de mollusques bivalves marins la plus élevée dans le monde. Cette espèce a été importée du Japon, dans les années 1960-1970, et a remplacé l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, espèce décimée à cette époque par deux iridoviroses. Suite à la disparition de l'huître portugaise du littoral français et à l'apparition de protozooses (Marteiliose et Bonamiose) chez l'huître plate, *Ostrea edulis*, une situation de quasi monoélevage de l'huître japonaise s'est installée en France. De ce fait, les risques sur les plans sanitaire et économique sont loin d'être négligeables pour le milieu ostréicole français. En particulier, l'apparition de maladies chez cette espèce pourrait aboutir à une situation catastrophique dans ce secteur d'activité, car si une pathologie survenait chez l'huître creuse, à l'heure actuelle, aucun moyen ne permettrait de la contrer efficacement. Quel que soit le pathogène considéré, les traitements n'ont que peu d'intérêt car l'élevage se faisant en milieu ouvert, la recontamination est quasi inévitable et pose également le problème des résidus des produits utilisés. Par ailleurs, le système immunitaire primitif des mollusques bivalves et en particulier l'absence de réponse de type anticorps chez ces animaux font que toute vaccination est impossible. Les seuls moyens existants sont donc la surveillance zoosanitaire régulière des cheptels et la mise en place de mesures prophylactiques lors de l'apparition de maladies. La seconde possibilité visant à réduire l'impact des maladies sur ce secteur d'activité réside dans l'obtention d'animaux résistants à certains pathogènes. Ceci nécessite l'acquisition des nouvelles connaissances tant sur le plan des différents agents pathogènes que sur celui des relations hôte-parasite.

De ce fait, l'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générale (URPIG) oriente son travail vers deux pôles d'intérêt :

- L'un axé vers la recherche fondamentale.

- L'autre vers la surveillance zoosanitaire des cheptels.

Pour ma part, étant plus particulièrement intégré à la cellule de veille zoosanitaire, j'ai donc été amené, dans un premier temps, à manipuler les techniques histologiques et immunologiques utilisées au laboratoire à des fins de diagnostic, puis, dans un deuxième temps, à participer à différents travaux de recherches.

Ce rapport est donc en quelque sorte une synthèse des différentes études auxquelles j'ai eut plaisir de contribuer durant ma formation.

Rappels concernant les principales pathologies observées chez les mollusques bivalves marins.

La conchyliculture mondiale a connu depuis les deux dernières décennies, grâce à l'amélioration des connaissances de la biologie des bivalves et à l'augmentation des échanges commerciaux, une constante progression, ce qui s'est traduit par un accroissement significatif des densités de mollusques élevés. Parallèlement à cette intensification des élevages sont apparus de nombreux problèmes d'ordre environnementaux et infectieux ayant une incidence plus ou moins marquée sur les productions conchylicoles. Parmi les facteurs liés à l'environnement, sont notés par exemple une insuffisance de nourriture, ou le brusque changement des conditions d'élevages (température ou salinité) lors de transferts d'un bassin à l'autre ou lors de modifications climatiques. Comparativement aux mortalités d'origine non infectieuse dont l'impact sur les cheptels est généralement limité quantitativement et géographiquement, de nombreux cas de mortalités massives à caractère épidémique ou endémique ont été associés à plusieurs types d'agents pathogènes. Ces maladies infectieuses, d'origine virale, bactérienne ou parasitaire, n'ont eut de cesse de progresser, facilitées par l'augmentation de la densité d'élevage et des échanges commerciaux.

I - Rappels concernant les principaux agents pathogènes rencontrés chez les mollusques bivalves marins.

De nombreux agents pathogènes ont pu être mis en évidence chez les mollusques bivalves marins lors d'épisodes de mortalités. La plupart de ces agents, retrouvés lors de mortalités sporadiques, ont un rôle pathogène mal défini et, dans de nombreux cas, seule leur description a pu être réalisée. Cependant, quelques virus, bactéries et certains protozoaires ont été ou sont considérés comme responsables d'importantes épidémies ayant considérablement modifié les productions conchylicoles.

Ne seront exposés dans ce chapitre que les principaux agents pathogènes responsables d'épizooties chez les mollusques bivalves marins.

1 . Agents viraux.

Depuis la mise en évidence par Farley *et al.*, en 1972, de particules virales chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, de nombreux virus ont été décrits chez différentes espèces de mollusques bivalves marins (tableau 1). Parmi tous ces agents décrits dans la littérature, seuls des virus apparentés aux familles des *Iridoviridae* et des *Herpesviridae* ont eu une réelle incidence sur les productions conchylicoles.

1.1 . *Iridoviridae.*

Cette famille de virus revêt une grande importance chez les mollusques bivalves marins car des iridovirus ont été à l'origine de la maladie des branchies (Comps, 1970a; Comps *et al.*, 1976 ; 1979), puis de la maladie hémocytaire (Comps, 1983a) de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, ayant entrainé la disparition de celle-ci des côtes françaises.

Par ailleurs, d'autres iridovirus ont été décrits chez les larves de *Crassostrea gigas* aux Etats-Unis (Leibovitz *et al.*, 1978; Elston, 1979) et sur des animaux adultes de la même espèce en France (Comps et Bonami, 1977).

TABLEAU 1

Agents viraux rencontrés chez les mollusques bivalves marins.

Famille de virus	Espèces hôtes	Source
Herpesviridae	*Crassostrea virginica* *Crassostrea gigas* *Ostrea edulis* *Mercenaria mercenaria*	Farley *et al.*, 1972. Alderman, 1980. Nicolas *et al.*, 1992. Hine *et al.*, 1992. Alderman, in Farley, 1978. Barry et Yevich, 1972.
Iridoviridae	*Crassostrea angulata* *Crassostrea gigas*	Comps *et al.*, 1979. Comps et Bonami, 1977. Leibovitz *et al.*, 1978.
Papovaviridae	*Crassostrea virginica* *Crassostrea gigas* *Crassostrea commercialis* *Ostrea edulis* *Ostrea lurida* *Mya arenaria* *Macoma balthica*	Farley, 1976. Farley et Kern, in Farley, 1978. Wolf, in Farley, 1978. Bonami, in Farley, 1978. Bonami, in Farley, 1978. Harshbarger *et al.*, 1979. Farley, 1976.
Togaviridae	*Ostrea lurida*	Farley, in Farley, 1978.
Retroviridae	*Mya arenaria* *Crassostrea virginica*	Oprandy *et al.*, 1981. Farley, 1975, in Farley, 1978.
Reaviridae	*Crassostrea gigas* *Crassostrea virginica* *Ostrea edulis* *Tellina tenuis* *Mercenaria mercenaria* *Patella vulgata* *Littorina littorina*	Hill, 1976a. Meyers, 1979. Hill, 1976b. Hill, 1976a. Hill, 1976b. Hill, 1976b. Hill, 1976b.

1.1.1 . Agent responsable de la maladie des branchies.

Les premiers symptômes de la maladie des branchies de l'huître portugaise sont apparus en 1966 à La Tremblade, puis se sont étendus à toutes les zones d'élevage françaises en 1967. Cette épizootie a entraîné d'importantes mortalités durant cette année là et a sévi jusqu'en 1970.

Les symptômes de la maladie tels que les ont décrit Alderman et Gras (1969) débutent par l'apparition de pustules jaunes sur les branchies et parfois sur les palpes labiaux, ainsi que par de petites perforations dont l'extension aboutit à la formation d'indentations sur la bordure externe de l'organe.

A l'examen histologique, les sites de l'infection sont caractérisés par des phénomènes inflammatoires avec une infiltration hémocytaire et par la présence de nombreuses cellules de grandes dimensions contenant une volumineuse inclusion basophile pouvant occuper la majeure partie du cytoplasme (inclusion Feulgen positif).

Les examens en microscopie électronique à transmission ont montré des particules virales dans les grandes cellules polymorphes. Ces virions sont formés au niveau de l'inclusion basophile observée en microscopie photonique, puis sont émis dans le cytoplasme sous forme de particules polymorphes.

Ces virions immatures acquièrent une structure plus complexe, de forme icosaédrique (de 380 nm de diamètre), contenant un nucléoïde sensiblement sphérique, d'aspect granuleux, l'ensemble étant délimité par un complexe membranaire (deux membranes trilaminaires séparées par un espace granuleux).

Le développement des lésions virales proprement dites s'accompagne d'un ensemble de symptômes cytopathologiques aboutissant à la destruction de la cellule infectée. L'effet pathogène se manifeste par un accroissement sensible de la taille du noyau, accompagné de la disparition de la chromatine.

En matière de pathologie des bivalves marins, cette maladie de l'huître portugaise représente le premier cas de virose mis en relation avec une épizootie importante (Comps, 1970a ; Comps *et al.*,1976 ; 1979).

1.1.2 . Infection hémocytaire de l'huître portugaise.

Après la maladie des branchies, l'huître portugaise a été frappée par une nouvelle maladie en 1970, entraînant sa quasi totale disparition en 1973.

Sans aucun signe clinique particulier, la maladie provoquait l'amaigrissement des huîtres et une atrophie du muscle adducteur.

L'examen histologique a révélé des infiltrations hémocytaires associées à la présence d'hémocytes atypiques et de cellules brunes dont le rôle est mal connu, dans le tissu conjonctif des principaux organes (glande digestive, manteau, ...). Les cellules atypiques possèdent un noyau pauvre en chromatine et présentent une petite inclusion fuchsinophile intracytoplasmique.

En microscopie électronique, les cellules atypiques se sont avérées être le siège d'une infection virale. Comme dans le cas de la maladie des branchies, la formation des particules virales se déroule dans le cytoplasme au niveau de l'inclusion fuchsinophile observée en microscopie photonique. Les particules immatures issues du viroplasme, de forme icosaédrique, sont constituées d'une masse homogène de 250 nm de diamètre entourée d'une couche claire et limitée par un système membranaire à quatre feuillets. Ces virions subissent une maturation intracytoplasmique donnant un virus à structure icosaédrique de 380 nm de diamètre, avec un nucléoïde bordé par un double feuillet. Cette structure est entourée par une zone dense aux électrons limitée par une double membrane.

Bien que mis en évidence après la disparition de l'huître portugaise, ce virus a néanmoins été considéré comme l'agent responsable de cette maladie, car dès le début de cette épizootie, les cellules atypiques décrites comme étant le siège de l'infection virale avaient été retrouvées chez les individus malades (Comps, 1983a).

Un virus similaire à cet iridovirus décrit chez l'huître portugaise, a été observé, lors de mortalités survenues durant l'été 1977 chez *Crassostrea gigas* (Comps *et al.*, 1977). Comme dans le cas précédent, l'examen histologique a révélé un petit nombre d'hémocytes atypiques ayant une inclusion fuchsinophile intracytoplasmique, laquelle en microscopie électronique s'est avérée être l'origine d'une infection virale.

Bien que fortement similaires par leur morphologie et le type de cellules infectées, rien ne permet d'affirmer que ces deux virus soient identiques.

1.1.3 . Oyster Velar Virus Disease (OVVD).

D'importantes mortalités en écloserie ont perturbé ces dernières années les productions de larves de *Crassostrea gigas* aux Etats-Unis (Leibovitz *et al.*, 1978; Elston, 1979).

Cette maladie est caractérisée en histologie classique par une érosion du manteau et du velum, provoquée par une destruction des cellules.

L'étude en microscopie électronique à transmission a révélé la présence de particules virales dans le cytoplasme des cellules infectées du velum. Le virus de forme hexagonale de 228 nm de diamètre est délimité par une membrane bilamellaire, le nucléoïde de 160 nm de diamètre est entouré d'une zone peu dense aux électrons. Comme dans le cas des viroses précédemment décrites, la formation des particules virales se fait à partir d'un viroplasme intracytoplasmique.

Cette maladie, appelée OVVD pour Oyster Velar Virus Disease, bien que n'ayant été décrites qu'aux Etats-Unis reste une menace pour l'ostréiculture mondiale. En effet, l'élevage de *Crassostrea gigas* représente la plus grande production conchylicole mondiale. En outre, cette maladie, décrite uniquement en écloserie, pourrait, par l'intermédiaire d'échanges commerciaux internationaux de larves, s'étendre à l'ensemble des pays producteurs.

1.2 . *Herpesviridae.*

En 1972, au cours d'une étude concernant les effets de la température sur la croissance de l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, Farley *et al.* ont noté une importante différence de mortalité entre les animaux maintenus en élevage à 28-30°C et les individus placés à 18-20°C. L'examen histologique des huîtres élevées à fortes températures a révélé l'existence d'inclusions basophiles dans le noyau des hémocytes. Une étude plus approfondie en microscopie électronique a permis de mettre en évidence, dans les inclusions nucléaires, des particules virales de forme hexagonale, de 70 à 90 nm de diamètre, ainsi que des particules virales enveloppées dans le cytoplasme des cellules infectées.

Les caractéristiques de ce virus (caractères structuraux, taille, localisation cellulaire, cycle de réplication) permettent de le classer dans la famille des *Herpesviridae*.

En étudiant des échantillons prélevés à différentes périodes de l'année, Farley *et al.* (1972) ont montré que l'infection virale se développe préférentiellement à des températures élevées. Ils en concluent que le virus se trouve à l'état latent ou enzootique à température peu élevée et que des élévations de celle-ci semblent favoriser la propagation de la maladie (passage d'une phase latente à une expression clinique).

Un autre virus apparenté aux *Herpesviridae* a été mis en évidence, en France et en Nouvelle-Zélande, lors de mortalités, en 1991, chez les larves d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, élevées en écloseries (Nicolas *et al.*, 1992 ; Hine *et al.*, 1992.). En France, ces mortalités associées à la détection de virus de type herpès sont réapparues au cours des étés 1992 et 1993 (Renault *et al.*, sous presse), en écloserie et en juillet 1993 sur du naissain (Renault *et al.*, 1994).

La recherche de ce virus, sur les larves et le naissain d'huître creuse, ainsi que son étude seront exposées dans le second chapitre.

TABLEAU 2

Infections rickettsiennes décrites chez différentes espèces de bivalves marins, d'après Diseases of Mollusca Bivalvia, 1983 (éd.) O. KINNE.

Espèces hôtes	Sources
Crassostrea virginica	Otto *et al.*, 1979. Meyers, 1981.
Crassostrea gigas	Comps *et al.*, 1977 ; 1979. Comps, 1980. Renault *et al.* sous presse.
Ostrea edulis	Comps *et al.*, 1977. Comps 1980.
Mytilus edulis	Yevich et Barszcz, 1980.
Mytilus californianus	Yevich et Barszcz, 1980.
Mercenaria mercenaria	Otto *et al.*, 1979. Meyers, 1981.
Mya arenaria	Otto *et al.*, 1979. Harshbarger *et al.*, 1977.
Tellina tenuis	Buchanan, 1978 ; 1979b.
Donax trunculus	Comps *et al.*, 1978.

2 . Agents bactériens.

Du fait de leur fonction de filtration de l'eau, les bivalves sont capables d'accumuler un grand nombre de micro-organismes, conduisant à la formation d'une flore bactérienne extrèmement riche et variée, surtout en germes à Gram négatif (*Achromobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Pseudomonas* et *Vibrio*).

La pathogénicité des bactéries vis à vis des mollusques n'est pas toujours évidente car les germes incriminés appartiennent généralement à la flore commensale des coquillages. Il apparaît néanmoins dans la bibliographie existante que quelques espèces de *Vibrio* et de *Pseudomonas* sont pathogènes, notamment chez les larves et le naissain où elles affectent fréquemment les productions d'écloserie. Les animaux adultes paraissent quant à eux beaucoup plus résistants. En effet, les quelques infections bactériennes décrites chez ceux-ci semblent dues à l'association de conditions physiologiques et/ou environnementales particulières (température, turbidité, salinité...) entraînant un stress chez l'animal et, par la même occasion, une diminution de la résistance aux bactéries.

2.1 . La nécrose bacillaire.

Suite à de nombreuses épizooties survenues dans des écloseries aux Etats-Unis chez les larves de clam, *Mercenaria mercenaria,* et chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, Guillard (1959) a isolé une souche de *Vibrio* et une souche de *Pseudomonas* capables d'induire la maladie. Par la suite, Tubiash *et al.*, 1966 et Tubiash *et al.*, 1970 ont identifié à partir de larves moribondes, sept souches de *Vibrio* ayant des caractéristiques biochimiques similaires aux *Vibrio anguillarum* et *Vibrio alginolyticus*. Les essais de reproduction de la maladie, à partir de ces souches, sur des larves de différentes espèces de bivalves, *Crassostrea virginica, Ostrea edulis, Mercenaria mercenaria* et *Argopecten irradians* ont permis de démontrer leur pathogénicité. En effet, après quatre à cinq heures de contact, de nombreuses larves perdent leur mobilité et sédimentent, les premières mortalités apparaissant aprés huit heures d'incubation, accompagnées d'une nécrose et du détachement de fragments de velum.

Des essais de reproduction de la maladie sur différentes espèces de bivalves marins adultes ont également été entrepris, mais sans aucun résultat. Ceci permet donc de conclure que la nécrose bacillaire est une maladie affectant exclusivement les larves et le naissain de différentes espèces.

2.2 . Maladie de l'anneau brun.

A partir de 1987, d'importantes mortalités ont décimé les bancs naturels de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum,* des côtes atlantiques françaises.

Cette maladie, caractérisée par la présence d'un symptôme particulier, un dépot brun de matériel organique sur la face interne des valves, a pour origine un vibrio, jusqu'alors non décrit dans la littérature, le vibrio P1 (Paillard *et al.*, 1989). Les études menées par Paillard et Maes (1990) ont permis de vérifier que le VP1 était bien l'agent responsable du symptôme de cette maladie (anneau brun) et que, bien que son effet pathogène n'ait jamais été démontré, il semble néanmoins indirectement responsable des mortalités observées chez la palourde. En effet, la mort des animaux serait due à la formation de l'anneau qui provoquerait une altération majeure dans la croissance coquillière, présentant un caractère épuisant pour la palourde et engendrant des déformations du bord de la coquille. La mort de l'animal serait donc provoquée par un épuisement général induit par la présence de l'anneau brun.

2.3 . Infections rickettsiennes.

Les rickettsies sont de petits coccobacilles, pléomorphiques, intracellulaires obligatoires. Les premiers micro-organismes, apparentés aux rickettsies, décrits chez les bivalves, ont été observés dans la glande digestive de *Mya arenaria* aux Etats-Unis (Harshbarger *et al.*, 1977). Par la suite, un nombre important de rickettsies ont été identifiées chez la plupart des espèces de bivalves (tableau 2).

Mis à part des changements cytologiques des cellules infectées, dus à l'accroissement en taille de la vacuole contenant les rickettsies, ces procaryotes ne semblent pas associés à des

TABLEAU 3

Infections à chlamydies décrites chez les différentes espèces de bivalves marins, d'après Diseases of Mollusca Bivalvia, 1983 (éd.) O. KINNE.

Espèces hôtes	Sources
Crassostrea gigas	Renault et Cochennec, comm. pers.
Crassostrea angulata	Comps, 1980. Comps et Deltreil, 1979.
Mytilus edulis	Yevich et Barszcz, 1980.
Mytilus californianus	Yevich et Barszcz, 1980.
Mercenaria mercenaria	Otto *et al.*, 1979. Otto *et al.*, 1975. Harshbarger *et al.*, 1977. Meyers, 1979 ; 1981.
Tapes decussatus	Comps, 1980.
Scrobicularia piperata	Comps, 1980.

TABLEAU 4

Taxonomie des protozoaires parasites des bivalves marins
(d'après la classification proposée par Levine *et al.*, 1980).

	Genre
Phylum des *Sarcomastigophora*	
Sous Embranchement des *Mastigophora*	
Classe des *Zoomastigophorea*	
Ordre des *Diplomonadida*	
Sous Ordre : *Diplomonadina*	*Hexamita.*
Sous Embranchement des *Sarcodina*	
Classe des *Lobosea* (sous classe : *Gymnamoebia*)	
Ordre des *Amoebida*	
Sous Ordre : *Flabellina*	*Flabellula.*
Sous Ordre : *Acanthopodina*	*Acanthamoeba, Hartmannella.*
Ordre des *Schizopyrenida*	*Labyrinthomorpha.*
Phylum des *Labyrinthomorpha*	
Classe des *Labyrinthulea*	
Ordre des *Labyrinthulida*	*Labyrinthula, Labyrinthuloides.*
Phylum des *Apicomplexa*	
Classe des *Perkinsea*	
Ordre des *Perkinsida*	*Perkinsus.*
Classe des *Sporozoea*	
Sous Classe des *Gregarinia*	
Ordre des *Eugregarinida* (sous ordre des *Septatina*)	*Porospora, Nematopsis.*
Sous Classe des *Coccidia*	
Ordre des *Eucoccidia*	
Sous Ordre des *Adeleina*	*Klossia.*
Sous Ordre des *Eimeriina*	*Pseudoklossia, Merocystis.*
Phylum des *Microspora*	
Classe des *Microsporea*	
Ordre des *Minisporida*	*Steinhausia.*
Ordre des *Microsporida*	*Microsporidium.*
Phylum des *Ascetospora*	
Classe des *Stellatosporea*	
Ordre des *Occlusosporida*	*Marteilia, Haplosporidium.*
Ordre des *Balanosporida*	*Urosporidium, Bonamia, Mikrocytos.*
Phylum des *Ciliophora*	
Classe des *Kinetofragminophorea*	
Sous Classe des *Hypostomatia*	
Ordre des *Rhynchodida*	*Ancistrocoma, Crebricoma, Holocoma ...*
Sous Classe des *Suctoria*	
Sous Ordre des *Endogenina*	*Endosphaera.*
Classe des *Oligohymenophorea*	
Sous Classe des *Hymenostomatia*	
Ordre des *Scuticociliatida*	
Sous Ordre des *Philasterina*	*Uronema, Conchophyllum, Thigmophrya.*
Sous Ordre des *Pleuronematina*	*Peniculistoma.*
Sous Ordre des *Thigmotrichina*	*Ancistrum, Ancistrumina...*
Sous Classe des *Peritrichia*	
Ordre des *Peritrichia*	
Sous Ordre des *Sessilina*	*Ellobiophyra.*
Sous Ordre des *Mobilina*	*Urceolaria, Leiotrocha, Trichodina.*

phénomènes pathologiques. En effet, bien que fréquemment observés lors d'épisodes de mortalité, leur rôle en tant que pathogène n'a que rarement été démontré.

Des micro-organismes de type rickettsien ont été décrit comme responsables de mortalités en Ecosse chez *Tellina tenuis* et chez *Placopecten magellanicus* (Buchanan, 1978), mais également en France chez *Pecten maximus* (Le Gall *et al.*, 1988).

2.4 . Infections à chlamydies.

Des chlamydies, autres pathogènes intracellulaires obligatoires, ont fréquemment été signalées chez les mollusques bivalves marins. Les deux familles de procaryotes (rickettsies et chlamydies) se distinguent l'une de l'autre par leur cycle de développement. Les chlamydies ont un cycle qui comporte différents stades correspondant à trois types de particules : des formes végétatives se multipliant par division binaire simple, des formes de résistance et des formes intermédiaires assurant la transition entre les deux.

Ces différents stades ont été observés pour la première fois chez *Mercenaria mercenaria*, aux Etats-Unis (Harshbarger *et al.*, 1977), puis, par la suite, d'autres chlamydies ont été décrites chez de nombreux mollusques (tableau 3). La plupart des infections à chlamydies citées dans la littérature sont décrites au niveau des cellules épithéliales des diverticules digestifs. Récemment ce type de procaryote ont été retrouvés, chez *Crassostrea gigas*, au niveau du tissu conjonctif des branchies et du manteau (Renault *et al.*, comm. pers.). Les étapes de la mise en évidence de cet agent chez l'huître japonaise, *C. gigas*, seront exposées dans la seconde partie.

La plupart des observations d'agents de type chlamydien, chez les bivalves marins, n'ont été réalisées que dans le cas de foyers infectieux éparses, suggérant alors un rôle faiblement pathogène de ces agents. En revanche, d'après Meyers (1979), les chlamydies possèdent un effet pathogène accru, lors de fortes infestations, mais également chez les larves d'*Argopecten irradians* (Leibovitz, 1989).

3 . Agents protozoaires.

La découverte d'un nombre important de protozoaires chez les invertébrés marins, souvent difficilement classifiable, a conduit les chercheurs à revoir la taxonomie des protistes. A l'heure actuelle, la classification proposée en 1980 par Levine et co-auteurs (tableau 4) a été adoptée par les scientifiques.

Certains des protozoaires décrits chez les bivalves marins ont un rôle faiblement pathogène, voire non pathogène envers ces animaux, c'est le cas des protistes des *Phylum* des *Sarcomastigophora* et des *Labyrinthomorpha* qui semblent être des parasites commensaux des mollusques. Par ailleurs, d'autres protozoaires appartenant au *Phylum* des *Apicomplexa* et des *Ascetospora* se sont souvent révélés avoir un pouvoir pathogène non négligeable chez les mollusques bivalves marins.

3.1 . *Phylum* des *Apicomplexa*.

L'embranchement des *Apicomplexa* comprend deux classes, les *Perkinsea* dont l'espèce principale est *Perkinsus marinus* responsable de la "Dermocystidium disease" et les *Sporozoea* dont quelques espèces sont fréquemment rencontrées chez les bivalves marins.

3.1.1 . Classe des *Perkinsea*.

La classe des *Perkinsea* a été créée en 1978, par Levine, afin d'acceuillir un nouveau parasite mis en évidence par Mackin *et al.*, en 1950, chez *Crassostrea virginica*. Ce protozoaire a d'abord été classé comme un champignon par Mackin (1950), puis comme une haplosporidie par Sprague (1954a), pour enfin être admis dans la taxonomie actuelle par Levine (1978) comme étant *Perkinsus marinus* (anciennement nommé *Dermocystidium marinus)*.

TABLEAU 5

Principales espèces du genres *Perkinsus* décrites chez les bivalves marins.

Espèces	Hôtes	Sources
P. marinus	*Crassostrea virginica*	Perkins, 1976a.
P. olseni	*Haliotis ruber*	Lester et Davis, 1981.
P. atlanticus	*Ruditapes decussatus*	Comps et Chagot, 1987. Azevedo, 1989.
P. karlssoni	*Argopecten irradians*	Mc. Gladdery *et al.*, 1991.

TABLEAU 6

Parasites du genre *Haplosporidium* observés chez les mollusques.

Espèces	Hôtes	Sources
H. nelsoni	*Crassostrea virginica*	Haskin *et al.*,1966.
H. costale	*Crassostrea virginica*	Wood et Andrews, 1962.
H. tapetis	*Ruditapes decussatus*	Vilela, 1951.
H. armoricanum	*Ostrea edulis*	Van Banning, 1977.
H. sp.	*Ostrea edulis*	Pichot *et al.*, 1979.
H. sp.	*Ostrea edulis*	Vivares *et al.*, 1982.
H. sp.	*Crassostrea gigas*	Katkansky et Warner, 1970.
H. sp.	*Crassostrea gigas*	Comps et Pichot, 1991.

Depuis le début des années 1950, des mortalités massives de l'huître américaine, *C. virginica* ont été régulièrement observées sur la côte Est des Etats-Unis et ont été attribuées à *Perkinsus marinus* (Mackin *et al.*, 1952 ; Mackin, 1962). Actuellement, ce parasite existe de façon endémique sur la côte Est des Etats-Unis et fait l'objet d'une attention particulière.

Les zoospores, cellules bi-flagellées de *Perkinsus marinus* représentent probablement la forme infectante du parasite. Les zoospores, après avoir perdu leurs flagelles, pénétrent dans les cellules, ou entre ces dernières au niveau des branchies, des palpes labiaux, du manteau et du tube digestif où elles s'enkystent. Le premier stade parasitaire clairement identifié chez les mollusques correspond à une cellule uninucléée (2 à 4 µm), le trophozoïte, généralement inclus dans le phagosome d'un hémocyte. Cette cellule de l'hémolymphe interviendrait dans le transport du parasite vers les tissus conjonctifs et les sinus sanguins à partir desquels la maladie va se propager à l'ensemble des tissus. La maturation du trophozoïte débute par son accroissement (10 à 20 µm) et par l'apparition d'une large vacuole repoussant le cytoplasme et le noyau contre la membrane cellulaire. Le noyau du trophozoïte se divise plusieurs fois, puis chaque nucléus s'entoure d'une partie du protoplasme et est délimité par une membrane. A l'issue de cette phase de multiplication, le sporange formé contient 4 à 64 cellules filles immatures de formes coccoïdes. Ces cellules deviennent de nouveau trophozoïtes, qui, étant libérées par rupture de la paroi du sporange, vont pouvoir réinitier un nouveau cycle.

Dans certains cas, ces trophozoïtes se transforment en cellules géantes (10 à 100 µm), les présporanges, cellules ayant une large vacuole pouvant occuper 95% du volume total. Au contact de l'eau de mer, le prézoosporange se transforme en sporange, par divisions successives du protoplasme. Le sporange formé contient alors des zoospores bi-flagellées qui seront libérées dans le milieu extérieur par l'intermédiaire d'un tubule différencié issu de l'élongation de la membrane sporiangiale (Perkins, 1976a ; Perkins, 1988).

La distribution et le pouvoir pathogène de *P. marinus* sont régulés par la température et la salinité de l'eau. Lors des études concernant ce parasite, Hewatt *et al.* (1956) ont noté une nette augmentation de la fréquence des épizooties durant la saison chaude avec un maximum au cours de l'été et une disparition de celles-ci pendant l'hiver. Ce phénomène est probablement dû au ralentissement du métabolisme parasitaire et ne semble pas lié à sa disparition. Les études menées par Mackin (1956) concernant les effets de la salinité sur *P. marinus* ont permis de démontrer l'influence de ce facteur environnemental sur la pathogénicité du parasite. En effet, pour des salinités de 26 à 28 $^{0}/_{00}$ la plupart des huîtres développent la maladie alors qu'à 10 - 13,5 $^{0}/_{00}$ le taux d'animaux morts est pratiquement nul.

En Europe, des mortalités saisonnières de palourdes, *Ruditapes decussatus*, ont également été attribuées à un parasite de la classe des *Perkinsea*, *Perkinsus atlanticus* (Comps et Chagot, 1987 ; Azevedo,1989). D'autres espèces de *Perkinsus* ont été décrites (Tableau 5), en Australie chez différents bivalves marins (Goggin, 1990) et au Canada chez *Argopecten irradians* (Mc Gladdery *et al.*, 1991).

3.1.2 . Classe des *Sporozoea.*

Quelques parasites appartenant à la classe des *sporozoea* ont été observés chez les mollusques bivalves marins sans qu'aucun effet pathogène ne leur soit associé. Certains de ces sporozoaires ont un cycle de développement nécéssitant des lamellibranches comme hôtes intermédiaires (cas des *Nematopsis*), ce qui explique leur présence chez ces invertébrés.

3.2 . *Phylum* des *Ascetospora.*

En matière de pathologie des bivalves, le phylum des *Ascetospora* est de loin le plus important. Cet embranchement regroupe plusieurs protozoaires responsables de nombreuses épizooties et de maladies endémiques ayant considérablement affecté les productions conchylicoles.

TABLEAU 7

Protozoaires du genre *Marteilia* décrits chez les mollusques.

Espèces	Hôtes	Sources
M. refringens	*Ostrea edulis*	Grizel *et al.*,1974.
M. sydneyi	*Crassostrea commercialis*	Perkins et Wolf, 1976.
M. lengehi	*Crassostrea cucullata*	Comps, 1977.
M.maurini	*Mytilus galloprovincialis* *Mytilus edulis*	Comps *et al.*, 1982. Auffret et Poder, 1983.
M. sp	*Mytilus edulis*	Comps *et al.*, 1975.
M. sp	*Cardium edule*	Comps *et al.*, 1975.
M. sp	*Crassostrea gigas*	Cahour, 1979.

3.2.1 . Genre *Haplosporidium.*

L'espèce la plus importante du point de vue de la pathogénicité est *Haplosporidium nelsoni* (anciennement nommé MSX pour Multinucleate Sphere X ou *Minchinia nelsoni*). Ce parasite a été signalé pour la première fois, aux Etats-Unis, en 1957, lors de mortalités massives chez *Crassostrea virginica* (Haskin *et al.*,1966). Depuis cette date, ce protozoaire a régulièrement été responsable de mortalités apparaissant généralement au cours de l'été (Lauckner, 1983 ; Haskin *et al.*, 1988).

Les premiers stades de l'infection se caractérisent par la présence de cellules uni ou bi-nucléées (de 5 µm de diamètre) localisées dans les branchies et les palpes labiaux, au niveau de l'épithélium ou des tissus conjonctifs (stade préplasmodiaux). La division des noyaux associée à l'accroissement de la masse cellulaire, aboutit à la formation de plasmodes. La formation de spores s'effectue après que le parasite ait pénétré dans le tissu conjonctif de l'hôte. Le plasmode s'élargit, acquiert plusieurs noyaux et se transforme en sporonte (cellule contenant 8 à 50 spores immatures). Leur maturation (encore mal connue) conduit à la formation de spores ayant un opercule en forme de croissant qui coiffe la paroi réfringente de la cellule. En fin de maturation, le sporocyste obtenu va pouvoir libérer les spores infestantes en éclatant (Perkins, 1988).

Comme dans le cas du *Perkinsus marinus,* le pouvoir pathogène de cette haplosporidie varie en fonction de la température et de la salinité de l'eau. En effet, les mortalités apparaissent uniquement pendant l'été et pour des salinités supérieures à 10 $^{0}/_{00}$.

D'autres espèces d'haplosporidies ont été incriminées lors de mortalités aux Etats-Unis, chez l'huître américaine, *C. virginica* (Wood *et al.*, 1962), mais aussi en Europe sur différentes espèces de bivalves marins (tableau 6).

3.2.2 . Genre *Marteilia.*

Plusieurs protozoaires du genre *Marteilia* ont été décrits chez différentes espèces de bivalves marins (tableau 7). En France, l'espèce la plus importante, *Marteilia refringens*, s'est révélée responsable d'épizooties survenues durant les années 1970, chez l'huître plate, *Ostrea edulis* (Comps, 1970b; Grizel *et al.*, 1974). Actuellement ce parasite existe a l'état endémique dans différents bassins ostréicoles et contribue de ce fait à la disparition progressive de l'élevage d'huîtres plates.

Les différents stades de développement de *Marteilia refringens* chez l'huître plate, tels que les ont rapportés Grizel *et al.* (1974), sont principalement localisés au niveau de l'appareil digestif (estomac, diverticules digestifs). La structure de base du parasite ou "cellule primaire" est formée d'une cellule au sein de laquelle sont incluses une ou plusieurs "cellules secondaires". La "cellule primaire", de taille variable (suivant le nombre de "cellule secondaire"), possède un noyau peu chromatophile et un cytoplasme comportant les haplosporosomes des corps inclusions en forme d'aiguille. La "cellule secondaire", de petite taille (4 à 5 µm) comprend un cytoplasme basophile entourant un noyau presque exclusivement formé d'un volumineux nucléole. Cette structure de base va subir une maturation pendant laquelle les "cellules secondaires" vont se multiplier, donnant alors une cellule à huit énergides. A ce stade, le noyau des "cellules secondaires" se divise à nouveau et donne naissance à des sporanges à quatre "cellules tertiaires". Peu de temps après, la "cellule primaire" subit un accroissement de taille (jusqu'à 30 µm), la fin de maturation est marquée par l'apparition d'un granule réfringent ovoïde dans les sporanges. Ces sporanges seront alors libérés après rupture de la membrane cytoplasmique de la cellule primaire. Le devenir de ces cellules dans le milieu extérieur (possibilité de nouvelle(s) transformation(s) ou passage(s) chez un hôte intermédiaire), ainsi que leur rôle dans l'expension de la maladie, ne sont pas encore connus.

Du point de vue de la pathogénicité, l'étude de ce parasite par Grizel *et al.* (1974) laisse supposer que celui-ci se développe au détriment de l'hôte, par détournement du métabolisme de l'animal parasité, entraînant ainsi un affaiblissement de celui-ci, puis sa mort.

3.2.3 . Genre *Bonamia*.

Lors de mortalités survenues chez l'huître plate, *Ostrea edulis*, en 1979, Comps *et al.* (1980) ont mis en évidence un protozoaire jusqu'alors jamais rapporté en France, *Bonamia ostreae*. Les premières observations du parasite ont amené ces auteurs à le comparer aux micro-organismes observés aux Etats-Unis chez cette même espèce. Ces agents décrits comme responsables de la maladie à "microcell" (Katkansky *et al.*, 1969) ont par la suite été assimilésà *Bonamia ostreae* (Elston *et al.*, 1986).

Ce protozoaire responsable de la bonamiose, maladie redoutable pour les cheptels d'huîtres plates d'Europe aurait été introduit de Californie en France, en 1979, lors de transferts d'animaux (Elston *et al.*, 1986). Après 1980, cette maladie s'est rapidement propagée aux différents bassins conchylicoles de la côte Atlantique.

Bonamia ostreae est un protozoaire intracellulaire des hémocytes de l'huître. De ce fait, il est présent dans tous les tissus. En microscopie photonique, deux types de cellules ont été observées, l'une fortement basophile (forme de résistance) et l'autre faiblement basophile (forme végétative). En microscopie électronique, les formes de résistance (2 à 3 µm de diamètre) apparaissent avec un cytoplasme granuleux contenant, outre le noyau, une ou deux mitochondries et parfois un corps sphérique de nature lipidique et des particules denses riches en ADN. Les formes végétatives (3 à 5 µm de diamètre) se rencontrent surtout dans les tissus peu infectés. Elles ont une organisation similaire à celle des formes de résistance, avec, en plus, des formations membranaires correspondant à des corps de Golgi ainsi que des vésicules plus grandes.

Ce protozoaire se multiplie par simple division binaire à l'intérieur des hémocytes de l'huître infectée, lesquels, en éclatant, vont libérer les parasites, ceux-ci représentant probablement les stades infectants (Pichot *et al.*, 1979 ; Comps, 1983a).

Des protozoaires proches du genre *Bonamia* ont été décrits, lors de graves mortalités observées chez des huîtres de Nouvelle-Zélande, de l'espèce *Tiostrea lutaria* (Dinamani *et al.*, 1987).

3.2.4 . Genre *Mikrocytos*.

Suite à des mortalités survenues au Canada, chez *Crassostrea gigas* et en Australie, chez *Saccostrea commercialis*, Farley *et al.* (1988) ont identifié deux espèces différentes de parasites (anciennement désignés sous le nom de "microcells"), *Mikrocytos mackini*, chez *C. gigas* et *Mikrocytos roughleyi* chez *S. commercialis*.

La distinction entre ces deux espèces repose sur des critères morphologiques, ultrastructuraux et par leur localisation intracellulaire, *Mikrocytos mackini* parasite les cellules du tissu conjonctif alors que *Mikrocytos roughleyi* infecte les hémocytes. Ces protozoaires ont la particularité de toujours être associés à des foyers infectieux dans le tissu conjonctif, ce qui les distingue des protozoaires du genre *Bonamia* qui eux provoquent des infections généralisées.

Les maladies associées à la présence de ces parasites semblent dépendantes de la température, puisque ces mikrocytoses apparaissent au printemps dans le cas de *C. gigas* et en hiver chez *S. commercialis*.

4 . Agents métazoaires.

Les bivalves marins sont souvent l'hôte intermédiaire des Trématodes, parasites métazoaires fréquemment observés dans le milieu marin. Ces helminthiases peuvent induire des modifications biochimiques, physiologiques et morphologiques chez l'hôte, mais n'entraînent généralement aucune mortalité (Lauckner, 1983).

Des infections par des crustacés Copépodes (endoparasite du genre *Mytilicola*) ont été décrits chez différentes espèces de mollusques. Des effets pathogènes n'ont été signalés que chez des moules (*Mytilus edulis*) fortement infestées par *Mytilicola intestinalis* (Davay et Gee, 1988).

II - Rappels concernant les réglementations européennes.

Afin d'éviter au sein de la CEE, la propagation d'un pays à l'autre de maladies chez les bivalves, les pays membres ont établi une législation commune permettant la régulation des échanges commerciaux. Chaque pays concerné aura à sa charge d'effectuer des contrôles sanitaires, afin de définir, sur son littoral, des zones indemnes pour lesquelles certains pathogènes de mollusques bivalves marins sont absents. A ce jour, seuls deux protozoaires, *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*, responsables d'importantes mortalités chez l'huître plate, *Ostrea edulis,* ont été reconnus comme agents pathogènes à recherche obligatoire.

Après deux années consécutives d'observations visant à définir l'état sanitaire des zones, il sera possible de limiter l'expension des pathologies en interdisant les échanges d'animaux d'une zone non indemne vers une zone indemne.

PREMIERE PARTIE

PREMIERE PARTIE

Herpèsvirus-like.

Durant l'été 1991, des mortalités anormales ont été observées en écloserie, chez les larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas,* (Nicolas *et al.,* 1992). L'examen des larves malades, en microscopie électronique à transmission, a permis de déceler la présence de lésions associées à des particules virales. La taille, la morphologie et la localisation cellulaire des virus observés ont permis de les apparenter à la famille des *Herpesviridae*.

Des mortalités sporadiques ont également perturbé les élevages larvaires de plusieurs écloseries françaises, au cours des étés 1992 et 1993. Par ailleurs en juillet 1993, des particules virales de type herpès, ont été mises en évidence chez du naissain d'huître creuse. La détection de ce virus en microscopie électronique, associé à des épisodes de mortalité chez les larves et du naissain de *Crassostrea gigas*, laisse supposer qu'il est pathogène pour ceux-ci. Jusqu'alors cette hypothèse n'a pu être vérifiée que sur les stades larvaires, par contact de larves axéniques avec des broyats de larves virosées ultrafiltrés (Le Deuff, comm. pers). Le danger potentiel de cette virose, pour les productions d'huître creuse, nécessite de poursuivre les travaux de recherche déjà entrepris, tant sur le plan épidémiologique que sur l'étude du virus en lui-même. En effet, une surveillance rigoureuse, par l'intermédiaire de l'histologie classique et de la microscopie électronique, des cas de mortalités anormales de larves et de naissains, facilitera le suivi de l'évolution de la maladie. Par ailleurs, l'acquisition de nouvelles données concernant les caractéristiques de cet agent viral, grâce à la microscopie électronique, aux techniques immunologiques et de culture cellulaire, permettra de mieux connaître sa nature et son cycle de développement. La reproduction de ce virus sur cultures cellulaires assurera l'acquisition d'une quantité de particules virales suffisante pour son étude. Aucune lignée cellulaire de mollusques n'étant actuellement disponible, des essais d'inoculation de l'herpèsvirus ont donc été entrepris sur des cultures de larves axéniques et sur des lignées cellulaires de poisson. En outre, afin d'observer les effets *in vitro* du virus sur des cellules d'huître, un protocole de primoculture d'huître creuse a été mis au point au laboratoire.

I - Matériel et méthodes.

1 . Histologie.

L'histologie est une technique visant à l'observation des structures tissulaires en microscopie photonique. Afin de pouvoir être observés au microscope, les tissus doivent subir différents traitements:

- Fixation des tissus.
- Inclusion des échantillons.
- Confection des coupes.
- Coloration et montage des lames.

Elle concerne essentiellement dans cette partie le naissain.

1.1 . Fixation.

Le fixateur a pour rôle de maintenir les échantillons dans un état aussi proche que possible de leur état *in vivo* et de conserver les tissus afin qu'ils ne se dégradent pas (évite l'autolyse). En ce qui concerne l'étude des invertébrés marins, seuls deux fixateurs chimiques sont couramment utilisés au laboratoire : le Davidson et le Carson (formules en annexe 1), solutions de formol respectivement

salée et tamponnée. Du fait de sa composition à base d'eau de mer, le Davidson permet une bonne conservation des structures tissulaires.

Pour sa part, le Carson, bien que nettement moins approprié pour ce type d'étude, permet la récupération des tissus préalablement fixés en vue d'un éventuel traitement pour la microscopie électronique à transmission.

En pratique, après ouverture, les huîtres sont coupées en deux suivant un plan sagittal; une moitié est fixée dans du Davidson et l'autre dans du Carson. Seule la première fraction sera traitée en histologie classique (microscopie photonique), l'autre partie sera conservée pour une éventuelle analyse en microscopie électronique à transmission.

1.2 . Déshydratation et imprégnation.

L'inclusion des pièces dans la paraffine nécessite différentes étapes :

- La déshydratation des échantillons à l'aide de bains d'éthanol successifs (95°, puis 100°).
- L'imprégnation des pièces par un solvant de la paraffine (xylène) assurant l'élimination de l'alcool se trouvant dans les tissus.
- Inclusion des pièces dans de la paraffine en fusion (60°C).

Ces opérations sont réalisées par un automate LKB, les pièces étant placées dans des cassettes en plastique permettant leur identification. A la fin du cycle de l'appareil, les tissus imprégnés de paraffine sont récupérés afin d'être inclus, manuellement, dans des moules métalliques.

1.3 . Réalisation des coupes.

Après refroidissement des blocs sur une plaque réfrigérée afin de durcir la paraffine, les coupes sont réalisées au moyen d'un microtome LKB. Leur épaisseur varie de deux à trois micromètres. Le ruban obtenu est déposé à la surface de l'eau d'un bain-marie thermostaté (37°C). Après étalement des coupes, celles-ci sont récupérées sur une lame, égouttées puis mises à sécher une nuit dans une étuve à 60°C. Le collage des tissus sur la lame se fait lors du séchage par écoulement de l'excès de paraffine.

1.4 . Coloration.

Avant coloration, les coupes sont déparaffinées au xylène (deux bains de dix minutes), ce solvant est éliminé par l'éthanol absolu (deux fois dix minutes), puis les préparations sont réhydratées à l'eau courante (15 minutes).

1.4.1 . Coloration topographique : **Hématoxyline-Eosine** (protocole en annexe 2).

L'hématoxyline colore les structures nucléaires en une teinte bleue à violet foncé, les ergatoplasmes en bleu et les cytoplasmes en gris. L'éosine colore toutes les structures acidophiles en rose. Cette technique, bien que ne différenciant que de façon limitée les différents constituants tissulaires, présente néanmoins l'avantage d'être rapide et facilement reproductible.

1.4.2 . Coloration nucléale de Feulgen et Rossenbeck (protocole en annexe 3).

Cette coloration est basée sur la mise en évidence des fonctions aldéhydes des sucres contenus dans les acides nucléiques. Cette technique est utilisée en routine afin de préciser la nature chimique de structures (corpuscules) observées à l'hémalum-éosine et difficilement interprétables. De ce fait, elle est particulièrement indiquée pour la recherche d'agents viraux ou bactériens de taille inférieure au pouvoir de résolution du microscope. Cette réaction nucléaire comporte deux étapes alternées de rinçage à l'eau :

- Hydrolyse acide par l'HCl à chaud libérant les fonctions aldéhydes par élimination des bases azotées. Le temps d'hydrolyse varie en fonction du fixateur utilisé.

- Détection des fonctions libérées par l'intermédiaire du réactif de Schiff. Une réaction positive se traduit par une coloration des acides nucléiques en rose vif.

1.4.3 . Montage des lames.

Après coloration, les coupes sont déshydratées à l'aide de bains d'éthanol successifs. Le montage des lames se fait après l'élimination complète des dernières traces d'alcool par du xylène. Une "colle" (Eukitt), miscible au solvant mais pas à l'eau, est déposée entre lame et lamelle, assurant ainsi une conservation durable des préparations.

2 . Microscopie électronique à transmission (MET).

2.1 . Préparation des échantillons.

Des larves et des fragments de naissain ont été directement fixés en glutaraldéhyde à 3% en vue du traitement en MET. La préparation des échantillons pour l'observation en MET comprend plusieurs étapes détaillées en annexe 4. Après fixation des pièces en glutaraldéhyde à 3% dans un tampon cacodylate de sodium à 1100 mOsm, les tissus sont post-fixés à l'acide osmique à 1%, puis, après déshydratation, sont inclus dans une résine (Epon). Dans le cas des larves, aprés la déshydratation,celles-ci sont décalcifiées à l'EDTA à 2% puis à nouveau déshydratées avant inclusion. Pour une bonne imprégnation la taille des échantillons ne doit pas excéder 1 mm^3 ; le cas échéant, ils sont recoupés avant la fixation. décalcifiés à l'EDTA à 2%.

2.2 . Préparation des coupes et contraste.

Après polymérisation de l'Epon dans une étuve à 60°C, les blocs sont coupés à l'aide d'un ultramicrotome Nova LKB. Dans un premier temps, des coupes semi-fines (1 µm) sont réalisées, puis colorées à chaud au bleu de toluidine. Après vérification, en microscopie photonique, de la présence de lésions caractéristiques des tissus virosés sur ces préparations, des coupes ultra-fines (80 à 100 nm d'épaisseur) sont préparées pour l'observation au MET. Ces coupes sont déposées sur des grilles de cuivre et sont contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (protocole en annexe 5). Les préparations constrastées sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (JEOL JEM 1200 EX, à 60 kVolts).

2.3 . Technique de marquage à l'or colloïdal : immunogold.

Afin de mieux connaître la nature de cet herpèsvirus-like observé chez les larves ou le naissain d'huître creuse, des anticorps monoclonaux anti-herpèsvirus de poisson chat (Channel Catfish Virus : CCV) ont été testés en immunogold (protocole en annexe 6).

Les coupes réalisées à l'ultramicrotome sont déposées sur des grilles de nickel et non sur des supports en cuivre car ces dernières fixent l'or. Après avoir perméabilisé les tissus avec du métapériodate de sodium, les coupes sont réhydratées à l'eau distillée, puis plongées dans un tampon TRIS (TBS) supplémenté de régilait (1%) afin de saturer les sites antigéniques non spécifique (réduction du bruit de fond). La saturation terminée, les préparations sont déposées, pendant trois heures, à température ambiante, dans un Eppendorf contenant l'anticorps à tester (dilué au $1/10^{ème}$), puis rincées dans du TBS. Ces anticorps sont révélés à l'aide d'un second anticorps, couplé avec des billes d'or colloïdal, dilué au $1/25^{ème}$ dans du TBS (une heure d'incubation). Après rinçage en eau distillée pour éliminer l'excès d'anticorps non fixé, les coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle, puis observées au MET.

3 . Culture cellulaire.

Afin de poursuivre les travaux concernant ce virus, il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante de matériel biologique et de se libérer des contraintes d'approvisionnement auprès des professionnels. De ce fait, des essais de reproduction de cet herpèsvirus-like ont été entrepris sur larves axéniques et sur cultures cellulaires.

3.1 . Reproduction de l'herpèsvirus-like sur larves axéniques.

3.1.1 . Matériel biologique.

Les huîtres creuses, *C. gigas,* proviennent du bassin de Marennes-Oléron. Les géniteurs utilisés pour la production de larves axéniques ont été mis à maturer en eau chaude (20-22°C) pendant quelques semaines dans la salle de maturation de l'écloserie d'IFREMER-Ronce-les-Bains.

3.1.2 . Décontamination des géniteurs.

Après avoir été lavées et brossées sous l'eau courante, les huîtres sont désinfectées extérieurement par un bain d'alcool à 70° (pendant 30 secondes), puis séchées stérilement dans une hotte à flux laminaire. Les animaux sont ouverts en sectionnant le muscle adducteur avec un scalpel stérilisé à l'alcool, puis flambé.

La masse viscérale de l'huître est lavée à l'eau de mer autoclavée additionnée de Tween 20 (0,1%), rincée à l'eau de mer stérile, puis désinfectée par un bain de Bétadine pendant dix minutes.

3.1.3 . Prélèvement des gamètes.

La gonade de l'huître est incisée dans le sens de la longueur à l'aide d'un scalpel stérilisé à l'alcool et flambé. Les gamètes sont prélevées (environ 200 µl) par aspiration avec une pipette Pasteur stérile, puis mis en suspension dans 300 ml d'eau de mer filtrée sur 0,22 µm et autoclavée.

Un contrôle bactériologique est réalisé en inoculant un millilitre de la précédente préparation dans un tube de milieu de ZoBell (Composition en annexe 11).

La détermination du sexe et le comptage des gamètes se font en observant un millilitre de la suspension dans une cellule de comptage (sedgewick-rather cell).

3.1.4 . Fécondation.

Les spermatozoïdes sont ajoutés aux Erlenmeyers contenant les ovules à raison d'environ dix spermatozoïdes par ovule. Après une demi-heure de contact, les zygotes sont dilués en flacon de 0,5 à un litre d'eau de mer stérile, à raison de 10 à 20 larves par millilitre.

3.1.5 . Inoculation du virus.

L'inoculation du virus se fait en ajoutant 1 ml de broyat d'animaux virosés par litre d'élevage. Les inoculums sont réalisés à partir de larves virosées (fraîchement traitées ou stockées à - 20°C et contrôlées en MET) broyées au Potter. Le broyat obtenu est ensuite clarifié par centrifugation (15 min, 3500 rpm, 4°C), puis ultrafiltré sur 0,22 µm afin d'éliminer les bactéries.

Après inoculation des broyats de larves virosées, les animaux sont observés quotidiennement. L'état des larves est consigné et en cas de mortalité, les échantillons sont traités en microscopie électronique afin de rechercher le virus et les lésions qui lui sont associées.

3.2 . Essais de reproduction de l'herpèsvirus-like sur lignée cellulaire BF2.

3.2.1 . Lignée cellulaire.

La lignée cellulaire BF2, de type fibroblastique, a été établie à partir de tissus de poisson crapet arlequin, *Lepomis macrochirus*.

3.2.2 . Conditions de culture de la lignée cellulaire BF2.

Les cellules BF2 sont cultivées à 20°C dans le milieu de Stocker (composition en annexe 7), qui est préparé à partir de Milieu Essentiel Minimum de Glasgow, additionné de 10% de bouillon de tryptose phosphate (BTP), de 10% de sérum de veau foetal (SVF) et d'antibiotiques (pénicilline G 100U/l et streptomycine sulfate 100 mg/l).

Les repiquages sont effectués après dissociation cellulaire d'une minute dans une solution de trypsine (2 g/l) et d'EDTA disodique (composition en annexe 7), à une densité d'ensemencement égale à 10^5 cellules par millilitre, soit 5. 10^5 cellules par fiole de 25 cm^2.

3.2.3 . Inoculation du virus.

L'inoculation du virus sur les cultures de cellules BF2 se fait comme dans le cas précédemment décrit dans le paragraphe 3.1.5, à partir d'un broyat d'animaux virosés.

3.2.4 . Recherche du virus et de ses éventuels effets cytopathogènes.

Les cellules inoculées avec le virus sont traitées afin de rechercher les particules virales ou les lésions qu'elles occasionnent au moyen de l'histologie et de la MET. Après trois à quatre jours de contact, les cellules sont grattées dans les fioles à l'aide d'une pipette Pasteur. Trois millilitres de la suspension cellulaire obtenue sont répartis dans deux tubes Eppendorf, lesquels sont centrifugés pendant cinq minutes à 3000 rpm. Le surnageant est éliminé et les culots cellulaires sont fixés :

- En Carnoy (60 ml d'alcool absolu, 10 ml d'acide acétique, 30 ml de chloroforme), pour l'étude histologique.

- En glutaraldéhyde 3%, 500 mOsm (2,5 ml de glutaraldéhyde 25%, 5 ml de tampon cacodylate de sodium 0,4 M, 12,5 ml d'eau distillée), pour la microscopie électronique.

Les cellules ainsi fixées sont traitées selon les techniques décrites dans les paragraphes 1 et 2.

3.3 . Primoculture de cellules cardiaques d'huître creuse.

3.3.1 . Matériel biologique.

Les huîtres creuses utilisées pour la réalisation de primocultures de cellules cardiaques sont issues du bassin de Marennes-Oléron.

3.3.2 . Désinfection des huîtres et des tissus.

Comme précédemment exposé au paragraphe 3.1.2, les huîtres sont lavées à l'eau de mer additionnée de Tween 20, rincées puis désinfectées extérieurement avec de l'alcool à 70° (30 secondes). Après ouverture, les huîtres sont lavées à l'eau de mer Tween, puis rincées à l'eau de mer stérile.

Les instruments de dissection sont plongés dans l'alcool, puis flambés avant utilisation.

3.3.3 . Prélèvement des tissus.

L'herpèsvirus-like a un tropisme particulier pour les cellules fibroblastiques. Plusieurs tissus ont été testés ; l'organe donnant les meilleurs résultats (quantités de cellules, facilité pour les dissocier...) semblent être le ventricule cardiaque (Le Deuff, comm. pers.).

La membrane de la cavité péricardique est sectionnée à l'aide d'un scalpel stérile rendant ainsi le coeur accessible. Le ventricule est alors prélevé, en prenant soin de ne pas le lacérer, avec une pince préalablement stérilisée, puis plongé dans un broyeur de type Dounce rempli de Dakin modifié (composition en annexe 7).

Après dix minutes d'action de la solution chlorée isotonique, le ventricule est alors rincé par une solution composée en proportions égales de milieu L15 (3X) et d'eau de mer stérile. La préparation du milieu est exposée en annexe 7.

3.3.4 . Dissociation des cellules (protocole en annexe 8).

La dissociation des cellules est assurée par un mélange de trypsine et d'EDTA dilué au 1/8ème dans une solution de milieu L15 (50%) et d'eau de mer (50%). En vue d'améliorer le rendement de la digestion enzymatique des protéines de contact cellulaire par la trypsine, les tissus sont soumis à une action mécanique par des mouvements de va-et-vient du piston. L'action des enzymes sur les tissus est atténuée en diluant de moitié le mélange précédent avec une solution supplémentée en sérum de veau foetal (45% de milieu L15 3X, 45% eau de mer, 10% sérum de veau foetal).

Les cellules sont alors récupérées par centrifugation (2500 rpm, 15 min à la température de la pièce), puis remises en suspension dans un volume suffisant de milieu de culture.

Cette suspension est distribuée, à raison de 5 ml, dans des fioles de culture cellulaire traitées à la poly-D-lysine qui assure une meilleure adhésion des cellules.

3.3.5 . Entretien des cultures.

Les milieux de culture sont régulièrement renouvelés (à J1, J2, J3, J5, J7 et J10) afin d'améliorer la croissance cellulaire et d'éliminer les cellules mortes qui pourraient libérer des substances toxiques dans le milieu de culture.

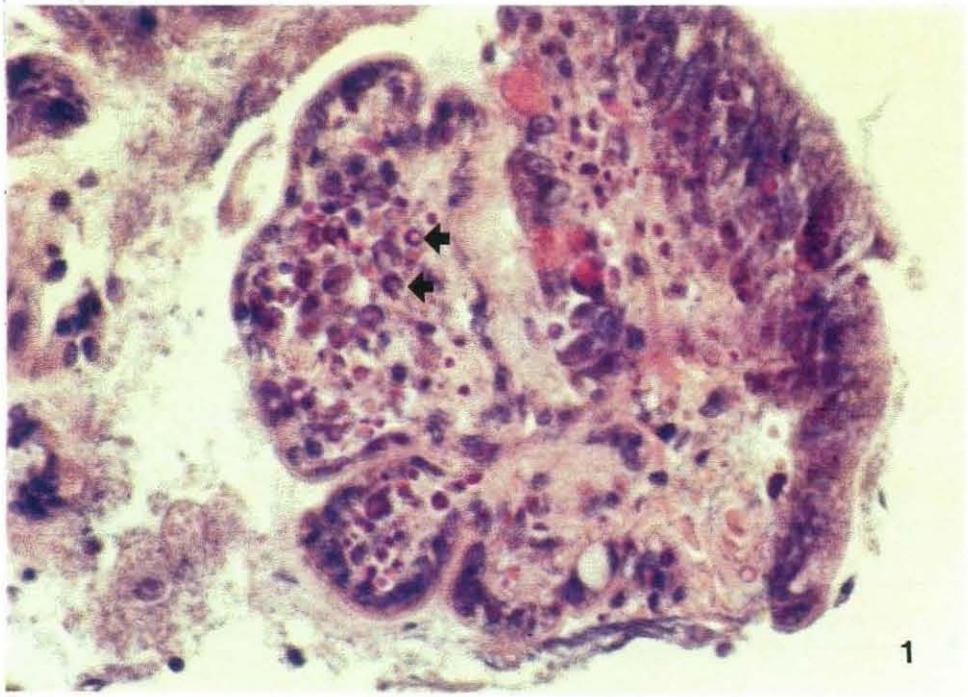
3.3.6 . Inoculation du virus.

Du fait de la récente mise au point du protocole de primoculture de cellules cardiaques, l'inoculation du virus n'a jusqu'alors jamais été réalisée. En effet, avant de procéder à une quelconque inoculation, un suivi régulier des cultures est nécessaire afin de mieux connaître l'évolution des cellules cultivées (morphologie, durée de vie de celle-ci).

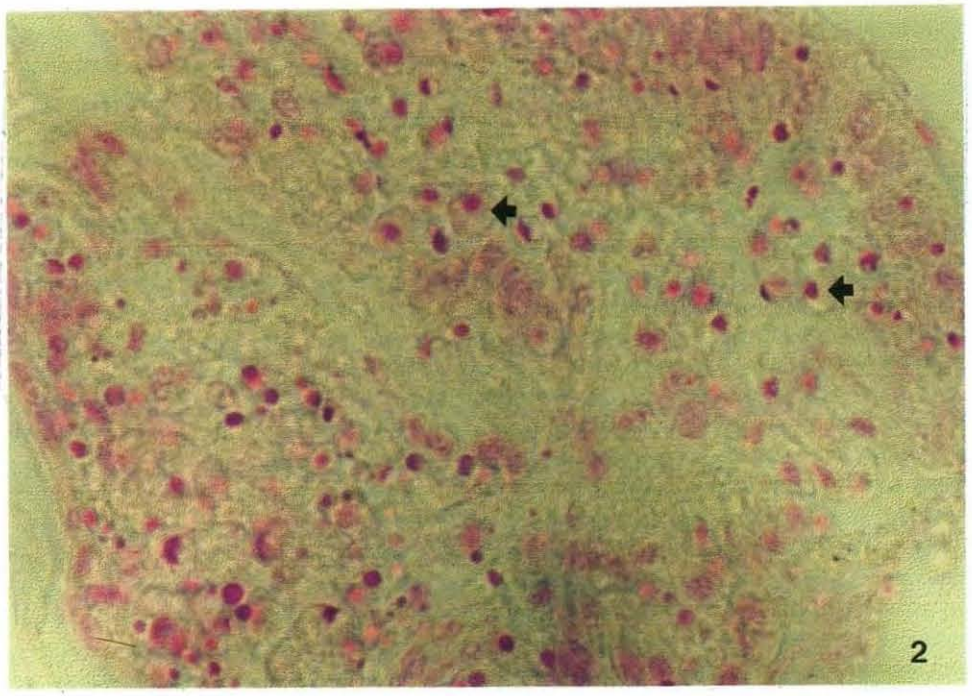
II - Résultats-discussion.

L'examen histologique du naissain moribond révèle la présence de nombreux noyaux hypertrophiés à distributions de chromatine anormales (Figs. 1 et 2) dans le tissu conjonctif des branchies, du manteau et autour des tubules digestifs. Chez les larves des lésions comparables sont observables au niveau du manteau et du velum. Les noyaux, aux formes anormales, possèdent une chromatine en motte excentrée contre la membrane nucléaire.

Les cellules du tissu conjonctif observées en microscopie électronique à transmission renferment des particules virales intranucléaires et intracytoplasmiques. Les virions intranucléaires de forme circulaire ou polygonale, de 80 nm de diamètre, contiennent, pour certains, un nucléoïde dense aux électrons alors que d'autres sont vides (Figs. 3, 4 et 5). Ceci laisse supposer que l'assemblage de la capside et de la nucléocapside se déroulent dans le noyau de la cellule infectée.



Figures 1 et 2 : Coupes d'huître creuse, *Crassostrea. gigas*, (naissain), virosée. **1** : Coloration à l'Hémalun Eosine. Présence de noyaux anormaux présentant une marginalisation de la chromatine (⇒). **2** : Réaction nucléale de Feulgen et Rossenbeck. Présence de noyaux anormalement condensés (⇒).



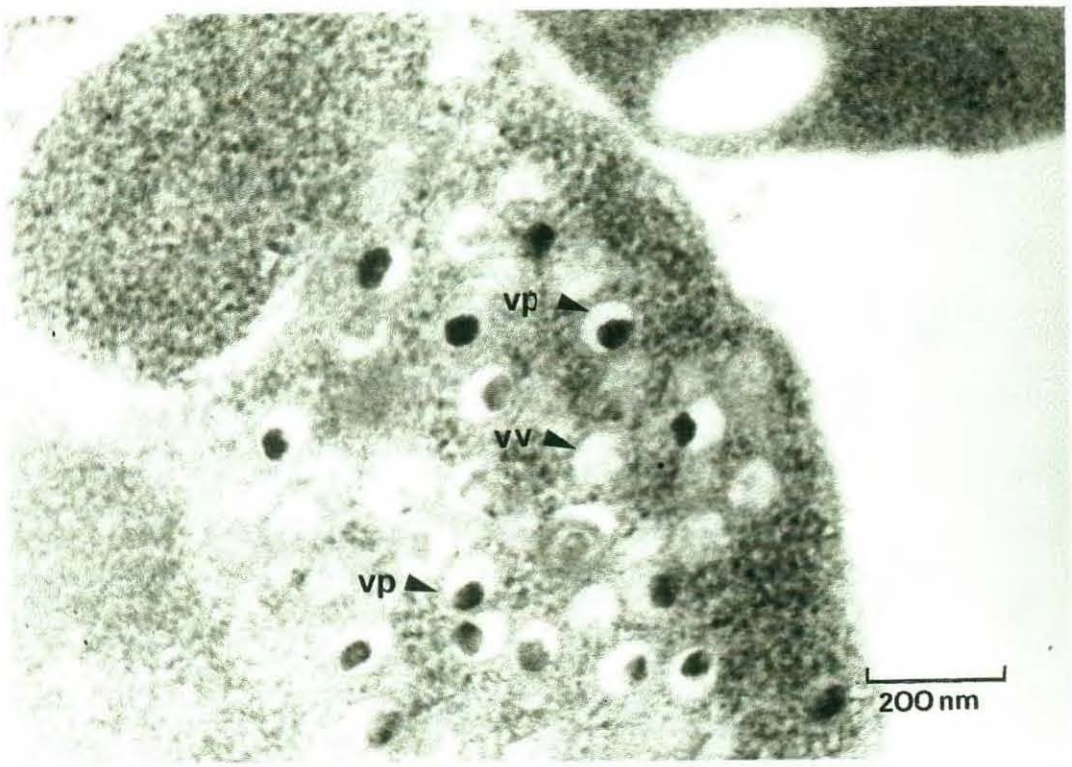


Figure 3 : Cliché en microscopie électronique à transmission d'une portion de cellule infectée montrant des particules virales non enveloppées dans un noyau : capsides virales vides (vv) et capsides présentant un nucléoïde dense aux électrons (vp).

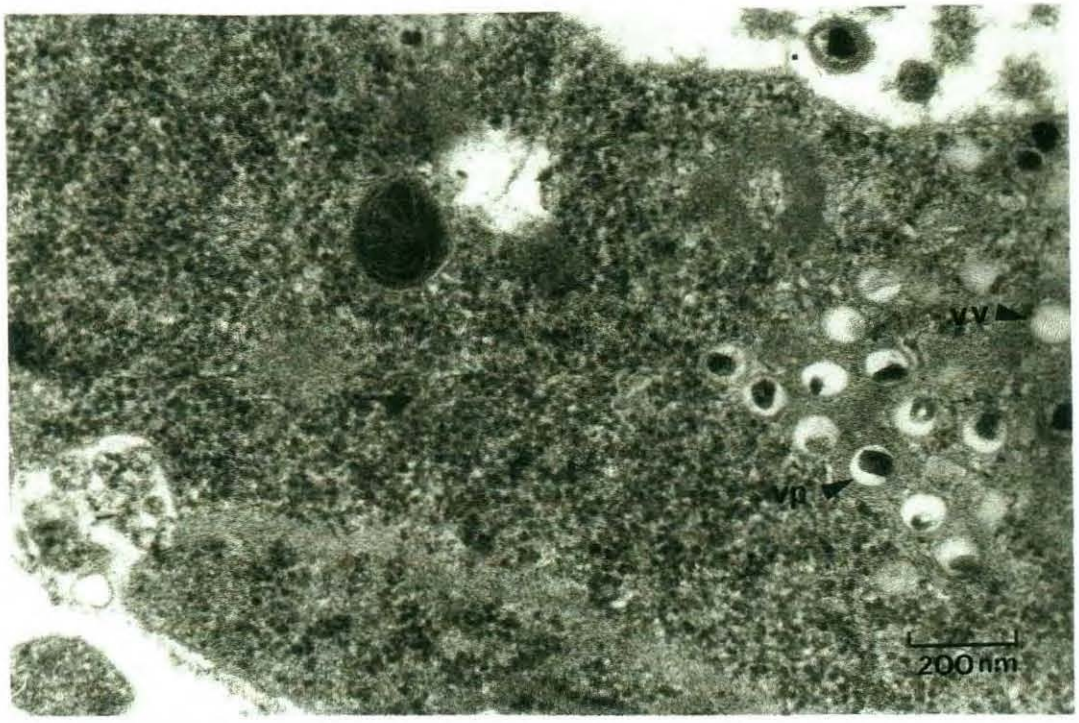


Figure 4 : Portion d'une cellule infectée présentant une plage de particules virales intranucléaires : capsides vides (vv) et capsides pleines (vp).

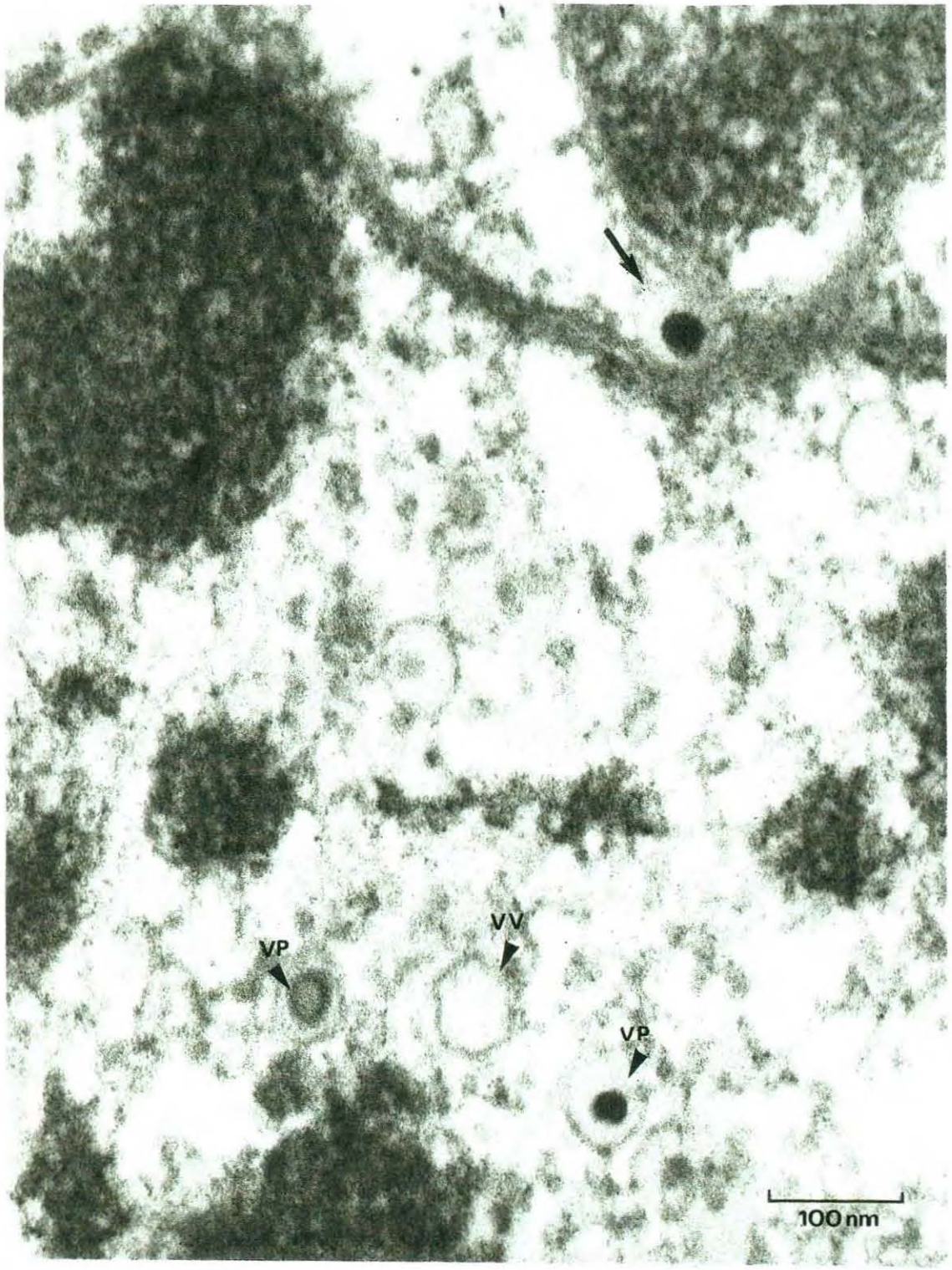


Figure 5 : Cliché en microscopie électronique à transmission d'une particule virale intracytoplasmique non enveloppée à la surface externe de la membrane nucléaire (⇒). Des capsides vides (vv) et des capsides pleines (vp) sont visibles dans le noyau.

Les particules intracytoplasmiques sont constituées d'une capside enfermant un corps dense aux électrons et présentant une enveloppe composée d'une membrane unitaire. Des virions enveloppés sont également observés en position extracellulaire (Figs. 6 et 7). Ces derniers apparaissent avec de fines fibrilles reliant la capside au core.

Les caractéristiques de ce virus (taille, assemblage intranucléaire, présence de fibrilles reliant la capside au nucléoïde...) permettent de l'apparenter à la famille des herpèsvirus (Furlong *et al.*, 1972 ; Roizman, 1990). Des virus de ce type ont déjà été décrits chez les mollusques bivalves marins (Farley *et al.*, 1972 ; Alderman, 1980 ; Nicolas *et al.*, 1992).

Les coupes fines de tissus virosés traitées selon la technique d'immunogold, puis observées au MET montrent un marquage spécifique de l'enveloppe des particules virales précédemment décrites (Fig. 8).

Ce résultat semble correspondre à la spécificité de l'anticorps monoclonal testé. En effet, celui-ci est dirigé contre une glycoprotéine d'enveloppe de l'herpèsvirus du poisson chat. Par ailleurs, l'absence de marquage de particules virales non enveloppées observées dans le noyau, ainsi que l'absence de billes d'or fixées sur les différents organites cellulaires, confirme la spécificité de cet anticorps (Fig. 8).

Ces observations (marquage spécifique de l'envelope virale) laissent supposer l'existence d'un épitope commun ou proche entre les herpèsvirus du poisson chat et de l'huître creuse. L'utilisation de réactifs non spécifiques de l'herpès de l'huître creuse, tels que ces anticorps dirigés contre le CCV, présente plusieurs intérêts : notamment, la comparaison plus précise qu'une simple description morphologique en MET de différents agents entre eux, et donc de préciser leur taxonomie.

Cependant, en ce qui concerne l'utilisation de ce réactif, les essais visant à tester cet anticorps à forte dilution se sont révélés peu encourageant. En effet, l'anticorps ne donne des images lisibles qu'à la dilution $1/10^{ème}$ alors qu'aux dilutions $1/100^{ème}$ et $1/1000^{ème}$ pratiquement aucun marquage n'est observé. Ce résultat peut être expliqué par une fixation inadaptée en glutaraldéhyde/acide osmique qui n'assure qu'une conservation médiocre des sites antigèniques. Par ailleurs, étant donné la spécificité du marquage obtenu, l'anticorps testé pourrait éventuellement être utilisé par des méthodes immunocytochimiques pour le diagnostic de routine.

En ce qui concerne les essais de reproduction de l'herpèsvirus-like de l'huître creuse, sur culture cellulaire, seule la technique sur larves axéniques donne des résultats concluants.

Le suivi quotidien, au microscope inversé, de l'état des larves axéniques inoculées avec l'herpèsvirus, permet de constater un rapide changement de comportement de celles-ci. Au bout du deuxième jour suivant l'inoculation des broyats de larves virosées, des lésions macroscopiques apparaissent au niveau du velum de certaines larves, entraînant ainsi leur sédimentation dans le fond du flacon d'élevage (Fig. 9). L'analyse en microscopie électronique des animaux ayant sédimentés, révèle des particules virales dans le noyau des cellules conjonctives du velum. L'examen de larves mortes trois à quatre jours après inoculation met en évidence, dans le même type de cellules, des virions en position intranucléaire et intracytoplasmique. Ces observations semblent indiquer que la virogénèse se déroule dans le noyau. Ces résultats indiquent donc la possibilité de reproduire l'herpèsvirus sur culture de larves axéniques et, par la même occasion, que celui-ci n'est pas altéré après conservation à -20°C (broyat réalisé à partir de larves virosées stockées à -20°C).

Les particules virales, observées lors des mortalités chez les larves et le naissain, possèdent les mêmes caractéristiques (morphologie, taille...) ce qui laisse suspecter une identité des virus décrits, mais à des stades différents.

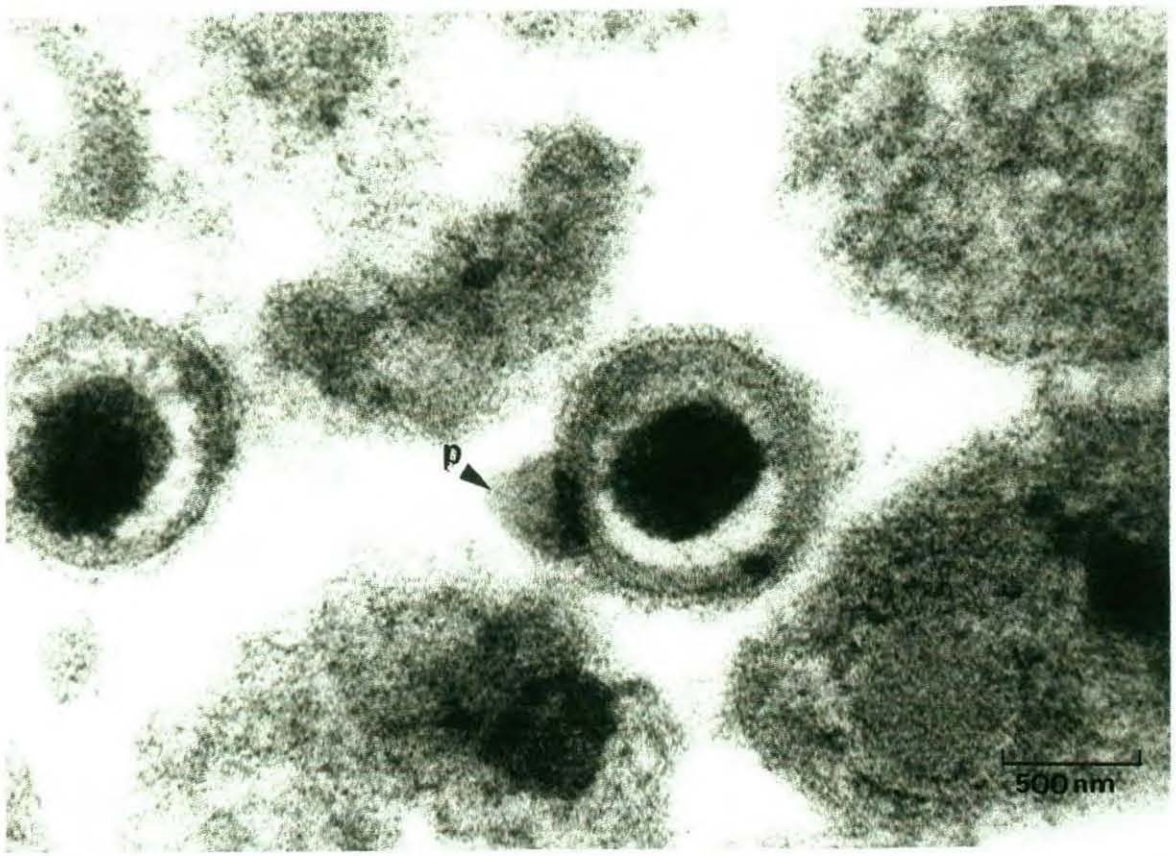


Figure 6 : Particules virales extracellulaires, en microscopie électronique à transmission, possédant une enveloppe formée d'une membrane unitaire trilamellaire et présentant des prolongements (p) à leur surface.

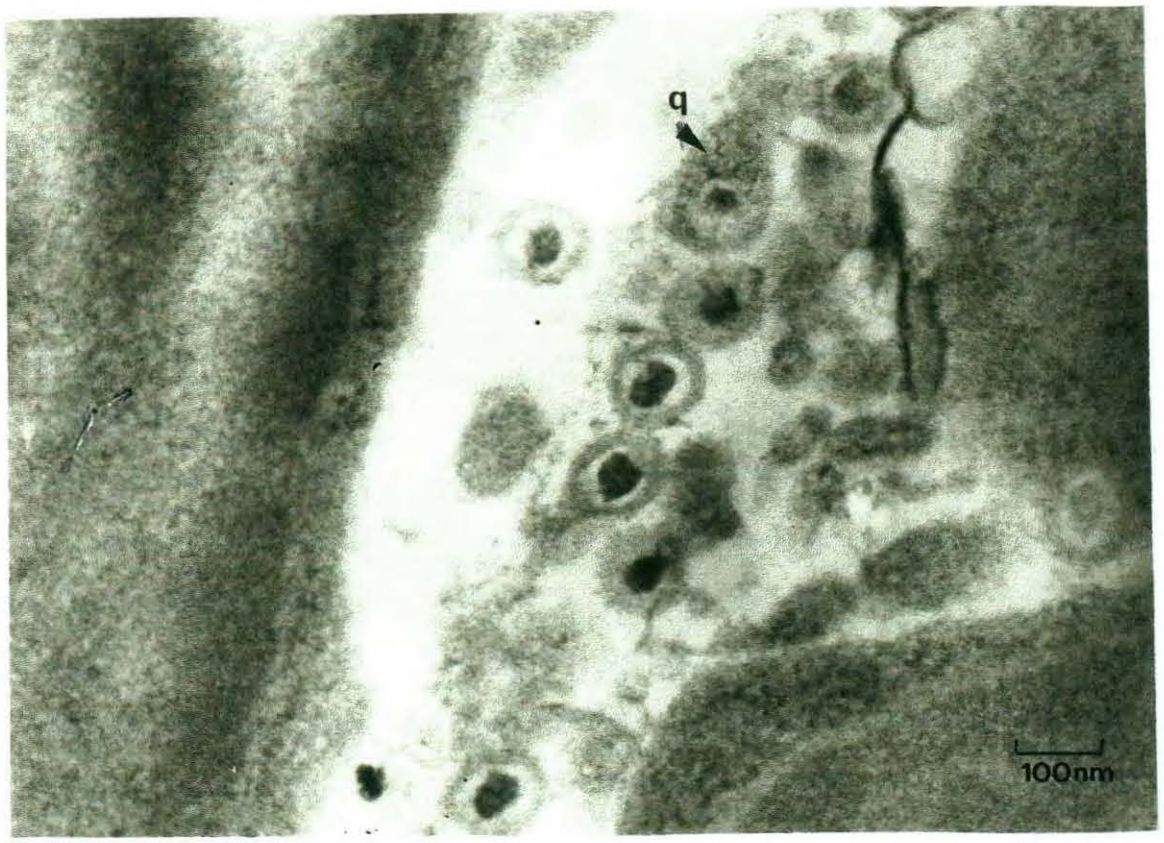
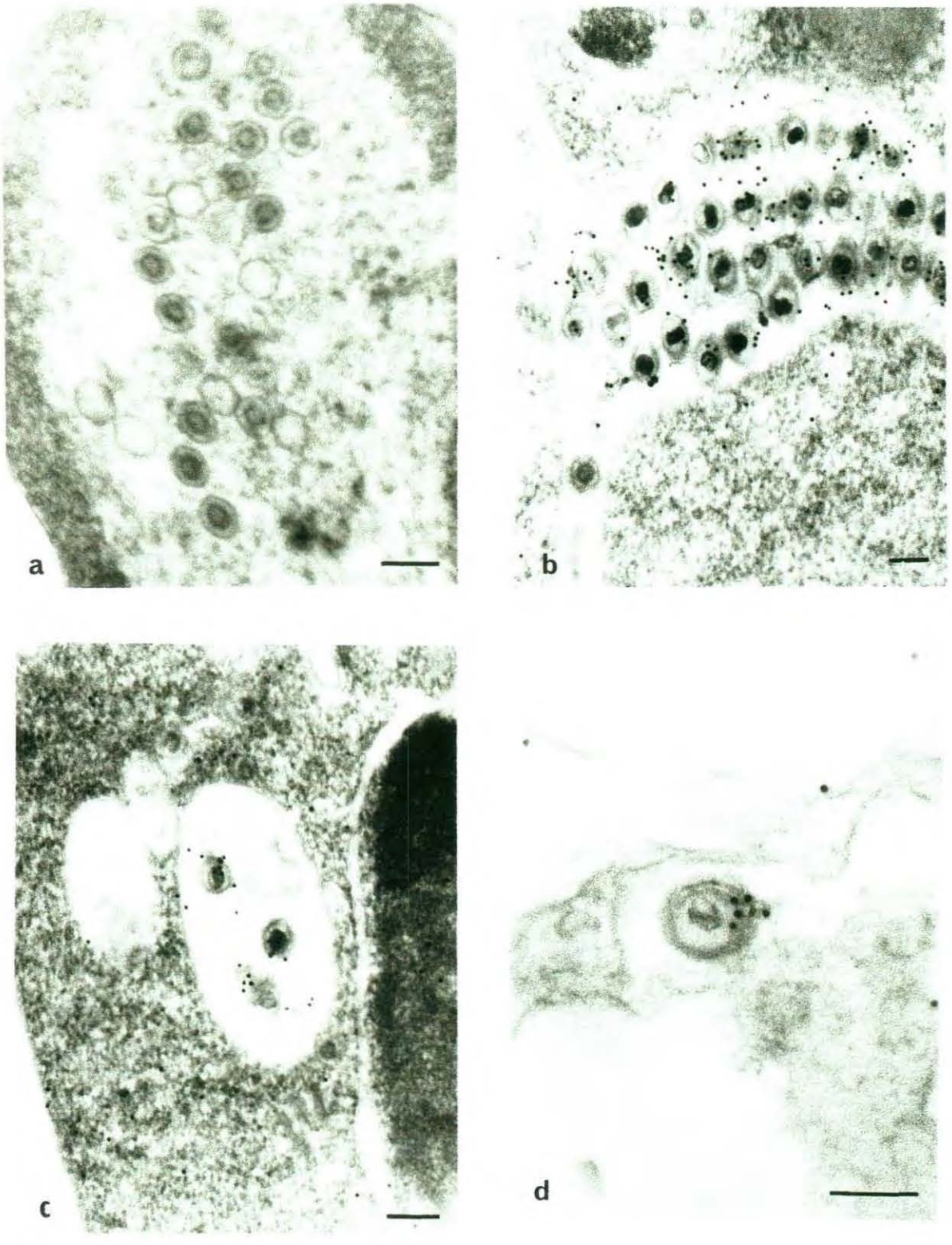


Figure 7 : Particule virale extracellulaire enveloppée présentant une queue (q).

Figure 8 : Marquage à l'or colloïdal des glycoprotéines d'enveloppe des virus herpès-like de *Crassostrea. gigas*. **a** : Aucune bille d'or n'est associée aux particules virales non enveloppées. **b, c** et **d** : Des billes d'or colloïdal sont systématiquement associées aux particules enveloppées, au niveau de l'enveloppe virale. Barres : 100 nm.



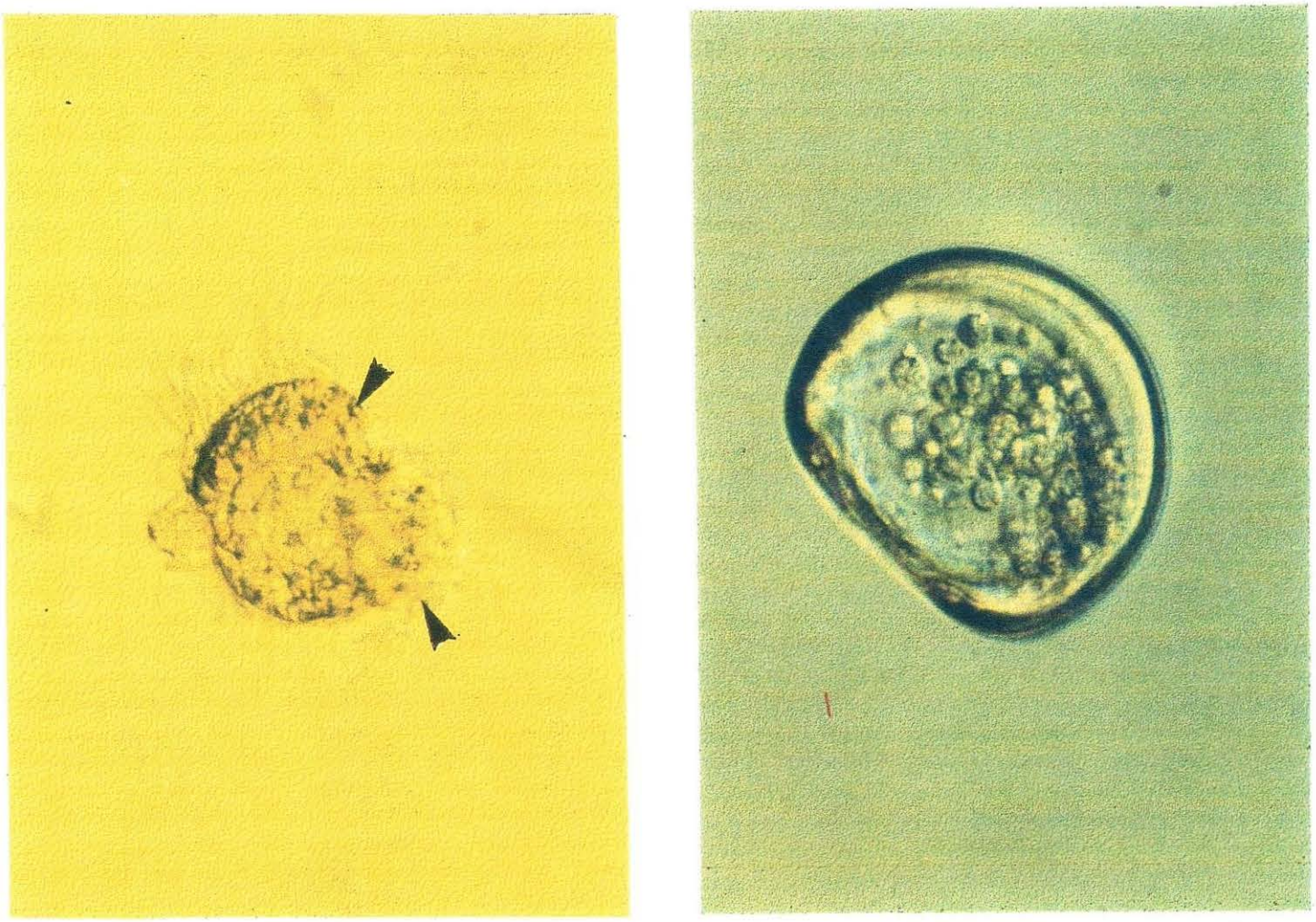


Figure 9 : Lésions macroscopiques du velum de larves axéniques d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, après inoculation de l'herpèsvirus-like dans les récipients d'élevage.

Un problème majeur se pose néanmoins quant à l'utilisation de cette technique en plus grand volume ; dans ce cas, les risques de contaminations bactériennes sont accrus. De ce fait, la production d'importantes quantités de virus sur culture de larves axéniques s'avère peu aisée. En outre, intervient également la difficulté à récupérer ces agents. Les tentatives de purification réalisées avec des larves faiblement virosées ont permis d'isoler une petite quantité de capsides vides ou pleines mais aucune particule enveloppée. De nouvelles expérimentations avec des huîtres fortement infestées vérifieraient la fiabilité du protocole utilisé et permettraient le cas échéant de l'améliorer.

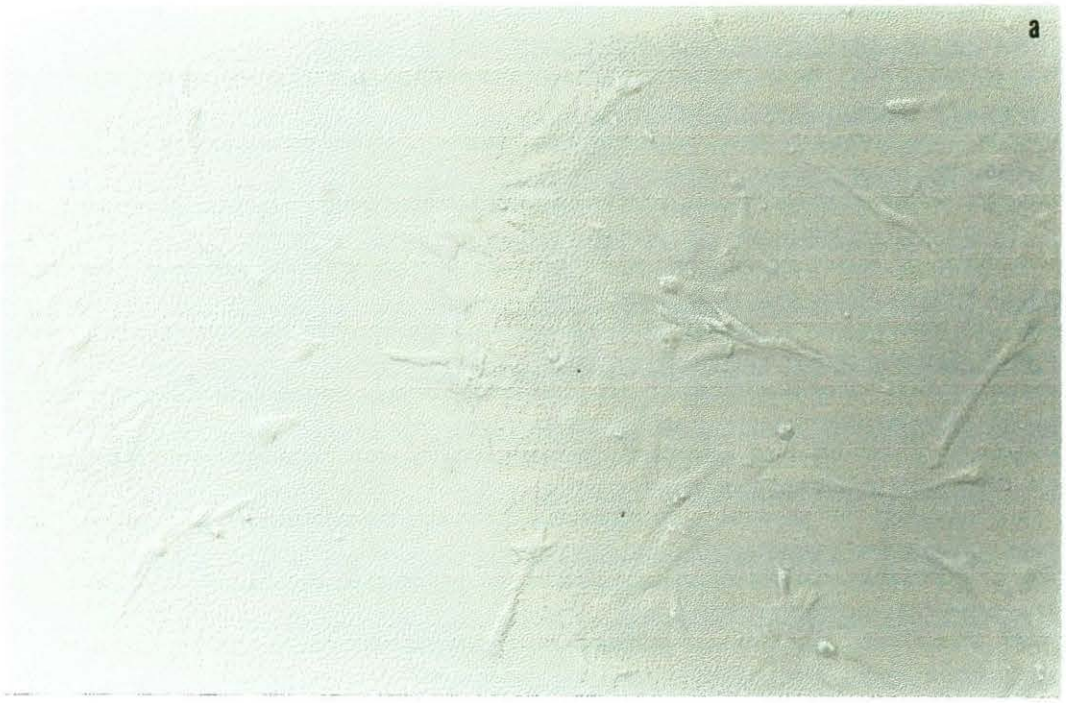
Pour leur part, les inoculations des cultures de lignées cellulaires BF2 par l'herpèsvirus se sont avérées intéressantes. En effet, bien qu'elles n'aient pas permis de le reproduire, certaines observations laissent supposer que les cellules BF2 sont tout de même infectées.

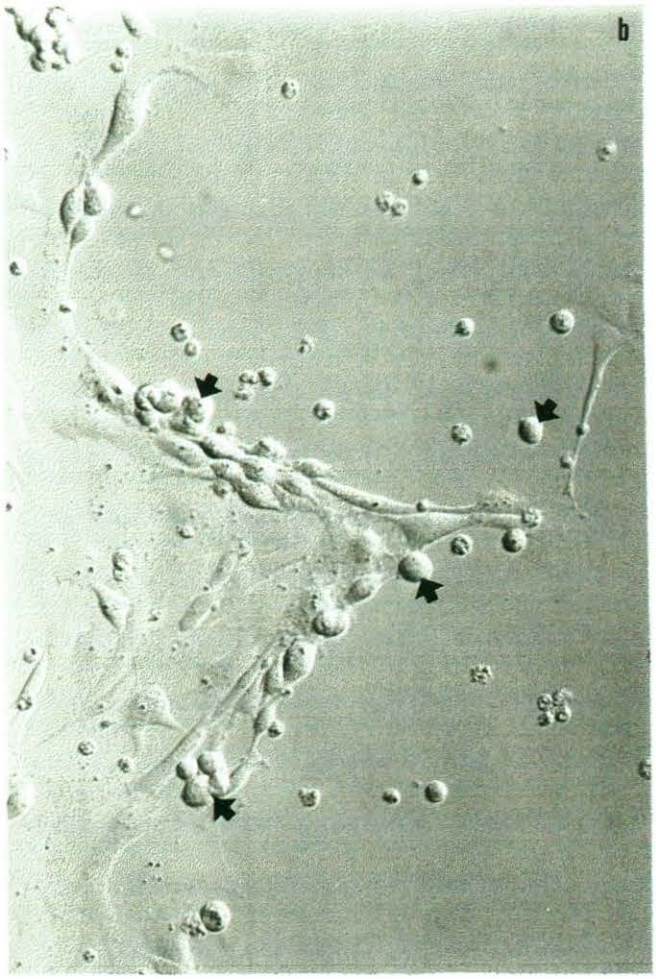
Les broyats virosés mis en contact avec les tapis cellulaires engendrent sur ceux-ci un effet cytopathogène se traduisant par un décollement et un arrondissement des cellules (Fig. 10). Cependant leur observation en microscopie électronique n'a jusqu'à présent révélé aucune particule virale. De ce fait, plusieurs hypothèses sont possibles quant à la cause de ces effets. Les anomalies observées sur les cultures cellulaires peuvent être attribuées à la toxicité de l'inoculum vis-à-vis des cellules.Toutefois, comme ces modifications interviennent même à forte dilution du broyat de larves, la présence de substances toxiques dans celui-ci est peu probable.

Ces changements peuvent également être le résultat du déroulement de certaines étapes précoces de la réplication virale (cycle non productif) ou de la fusion du génome viral avec celui des cellules infectées (cycle lysogénique). Dans ce cas, des modifications du protocole de contamination pourraient faciliter la multiplication du virus et ainsi confirmer l'origine des effets cytopathogènes observés. Un tel résultat ouvrirait alors de nouvelles perspectives de diagnostic.

La reproduction de l'herpèsvirus-like sur lignée cellulaire de poissons ne donnant pas de résultats immédiats et d'interprétations simples, il est apparu intéressant de visualiser les éventuels effets cytopathogènes dus à ce virus sur des cellules d'huître en culture. Jusqu'alors aucune lignée cellulaire d'huître n'a pu être établie, seul un protocole assurant l'obtention de primocultures de cellules d'huître a pu être mis au point (Le Deuff et al., comm. pers.) (Figs. 11 et 12).

Figure 10 : Recherche d'un effet cytopathogène sur lignée cellulaire à partir de broyats de larves virosées. **10a** : Culture de cellules BF2 saines. **10b** : Culture de cellules BF2 inoculée par un broyat ultrafiltré de larves virosées, certaines cellules se décollent et s'arrondissent après quatre à cinq jours d'incubation (⇒). **10c** : Huit à dix jours post inoculation, toutes les cellules se sont décollées du support et tendent à s'aggréger.





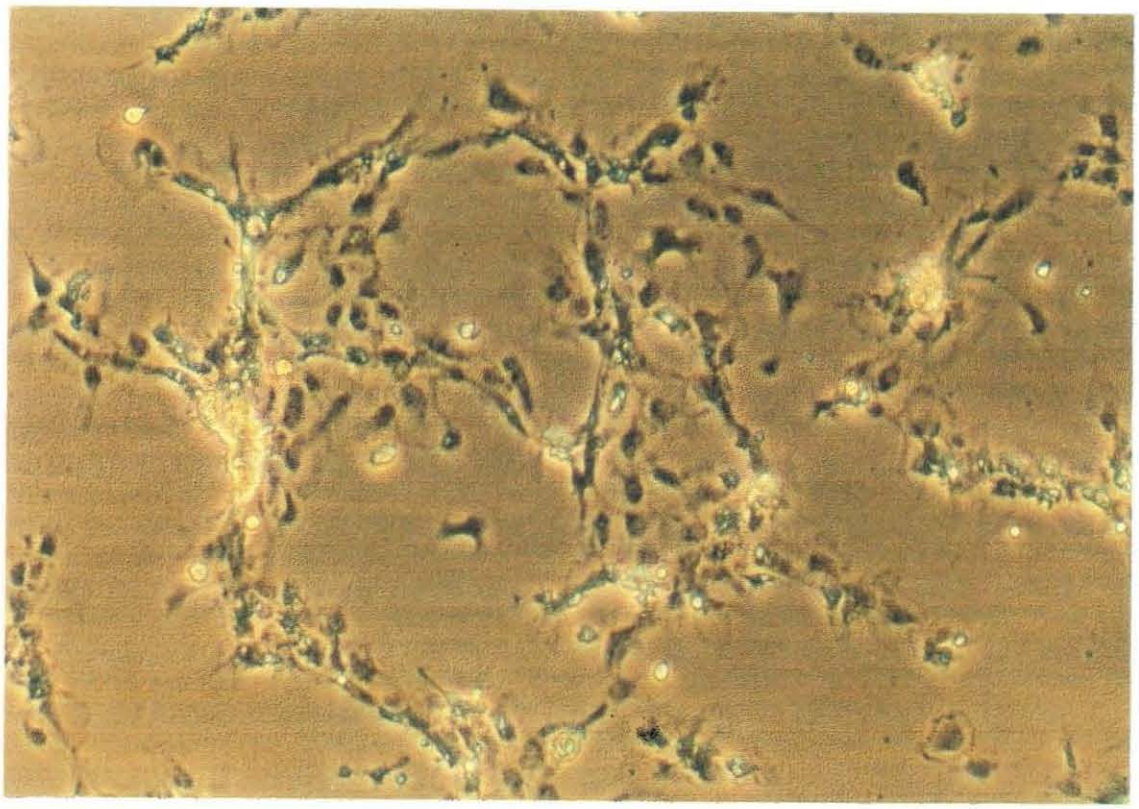


Figure 11 : Monocouche de cellules de ventricule cardiaque (*Crassostrea. gigas*) après 7 jours de culture.

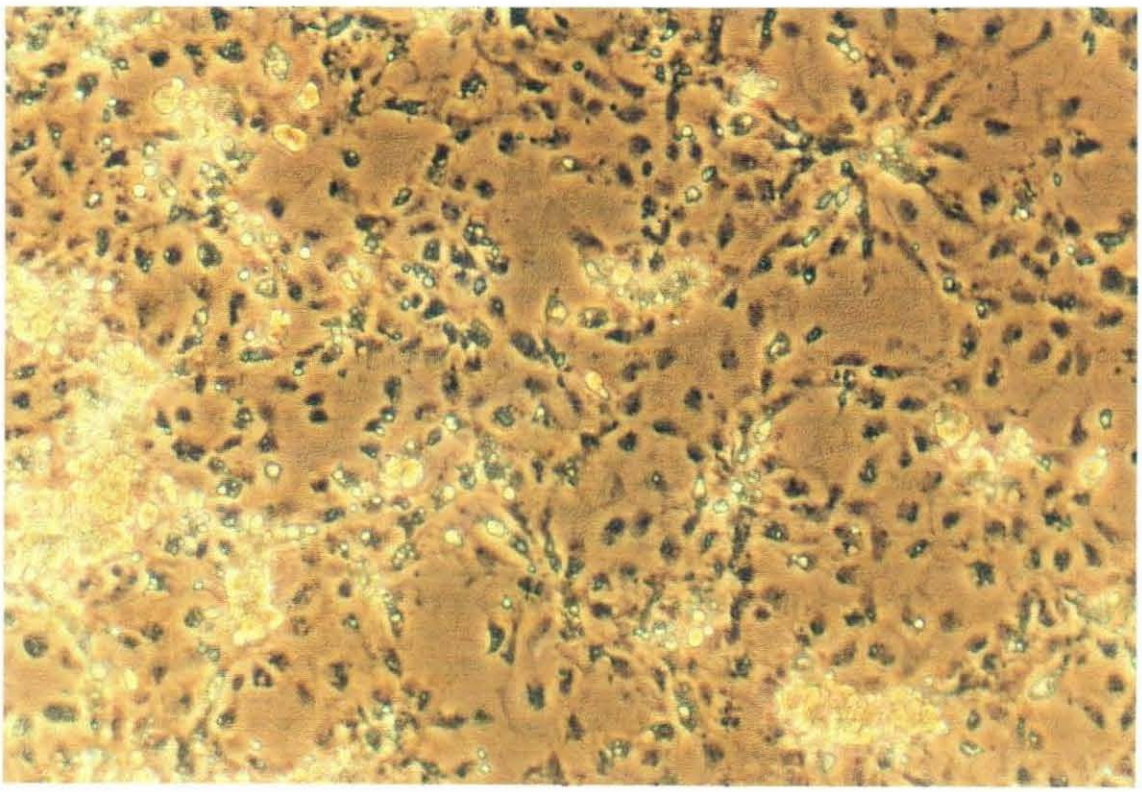


Figure 12 : Monocouche de cellules de ventricule cardiaque (*Crassostrea. gigas*) après 12 jours de culture.

DEUXIEME PARTIE

DEUXIEME PARTIE

Agents procaryotes

I - Agent de type chlamydien décrit chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

Suite à l'observation de baisses de performance, d'anomalies branchiales visibles macroscopiquement et de mortalités sporadiques, plusieurs lots d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* ont été analysés au laboratoire de pathologie de Ronce-les-Bains. L'examen de ces animaux, originaires de différents bassins ostréicoles de la côte atlantique française (Fouras, Marennes-Oléron et Arcachon), a révélé la présence d'un agent de type chlamydien dans le tissu conjonctif du manteau et des branchies (Renault *et al.*, comm. pers.). Une enquête épidémiologique conduite en 1993, sur tout le bassin de Marennes-Oléron a permis de préciser sa répartition géographique au sein de celui-ci. Par ailleurs, ce procaryote a été retrouvé, à la même période, dans d'autres centres d'élevage, notamment en Bretagne, mais à des taux de prévalence beaucoup plus faibles. Jusqu'alors la Méditerranée et la Normandie semblent ne pas être touchées par cette «infection bactérienne». Actuellement, afin de suivre l'évolution de l'infection, une nouvelle étude épidémiologique est en cours dans le bassin de Marennes-Oléron.

1 . Matériel et méthodes.

1.1 . Histologie.

Après ouverture et observation macroscopique des huîtres, celles-ci sont coupées en deux selon un plan sagittal, puis fixées par moitié dans du Davidson et du Carson. La poursuite du traitement reste la même que celle exposée dans le paragraphe 1 de la première partie. Comme dans le cas d'agents viraux, la technique histochimique mettant en oeuvre une réaction spécifique des acides nucléiques (réaction de Feulgen et Rossenbeck) est utilisée pour détecter les foyers infectieux.

1.2 . Microscopie électronique à transmission (MET).

Lors des premières analyses, tous les échantillons ont été fixés en Carson et Davidson, aucun tissu n'a été préparé par un traitement direct pour la MET. Après observation en microscopie photonique, les animaux fortement infectés seront traités en microscopie électronique à transmission, en réutilisant des fractions d'organe de la moitié conservée dans du Carson. Dans ce cas, pour éliminer le Carson des structures tissulaires, les échantillons sont rincés en tampon cacodylate (quatre bains de 12 heures), puis fixés en glutaraldéhyde à 3%. Les étapes suivantes amenant les préparations jusqu'au stade de leur observation sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe 2 de la première partie. En revanche, pour les enquêtes épidémiologiques de 1993 et 1994, des fragments de branchies présentant des lésions macroscopiques ont été directement fixés en glutaraldéhyde à 3%..

1.3 . Techniques immunocytochimiques.

Des anticorps monoclonaux anti-*chlamydia psittaci,* variété *ovis* ont été testés en immunocytochimie.

1.3.1 . Technique d'immunofluorescence indirecte (IFI).

Les tests en IFI sont effectués sur coupe de tissus fixés au Davison ou Carson (protocole en annexe 8). Après déparaffinage et réhydratation des coupes, les sites antigéniques des préparations sont saturés par du Régilait à 3% dans un tampon phosphate (PBS). Les lames sont en suite incubées avec le premier anticorps. L'excès d'anticorps primaire est éliminé par rinçage au PBS. Les coupes sont alors incubées avec le conjugué couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine, puis, après de nouveaux rinçages, montées en milieu glycériné et observées au microscope à épifluorescence.

1.3.2 . Technique d'immunopéroxidase.

Le protocole utilisé pour la technique d'immunopéroxydase est comparable à celui de IFI, à l'exception d'une étape supplémentaire d'inhibition des péroxydases endogènes avant la saturation dans le Régilait. Cette inhibition est réalisée à l'aide d'un bain de méthanol contenant de l'eau oxygénée (600 µl d'eau oxygénée à 30% dans 200 ml d'alcool). La révélation du second anticorps marqué à la péroxydase se fait par l'intermédiaire de la diaminobenzidine (DAB). Le protocole détaillé de cette technique est donné en annexe 9.

2 . Résultats-discussion.

Après ouverture, chaque huître est examinée macroscopiquement, notamment au niveau des branchies où sont observées des anomalies qui correspondent à des indentations pouvant toucher les quatre lames branchiales (Fig. 1).

Sur coupes histologiques, des inclusions très basophiles intracytoplasmiques sont détectées dans le tissu conjonctif des branchies et du manteau des huîtres provenant de Fouras, Marennes-Oléron et Arcachon (Fig. 2). Ces corpuscules, de taille variable, se colorent en rose vif après coloration histochimique de Feulgen-Rossenbeck, indiquant ainsi la présence d'acides nucléiques (Fig. 3).

Des infiltrations hémocytaires et la nécrose des cellules des épithéliums branchiaux et du manteau sont observées associées à ces anomalies. Ces altérations provoquent dans certains cas la destruction complète des tissus, entraînant ainsi des modifications de la structure des organes atteints.

Les examens en MET révèlent dans le cytoplasme des cellules du tissu conjonctif des branchies et du manteau la présence de vacuoles contenant des microorganismes présentant diverses formes de développement. Différents types de corps bactériens, se distinguant les uns des autres par leur taille et leur aspect ultrastructural, sont observés.Les trois types de formes observées rappellent les différentes étapes du développement décrit chez les microorganismes de type chlamydien (Fig. 4). Les corps élémentaires, de petite taille (80 à 160 nm de diamètre), très denses aux électrons, renferment quelques ribosomes (Fig. 4). Les corps intermédiaires (300 à 500 nm de diamètre) ont leur protoplasme légèrement moins opaque (Fig. 4). Enfin, les corps réticulés, de plus grande taille (500 à 1500 nm de diamètre), renferment un matériel réticulé lâche au centre duquel se distinguent parfois un nucléoïde et de nombreux ribosomes (Fig. 4).

Des modifications ultrastructurales des cellules infectées du tissu conjonctif des branchies et du manteau sont également observables. Ces altérations touchent à la fois le cytoplasme, dans lequel se forment de nombreuses vésicules entourées de mitochondries, mais affectent également le noyau qui devient pycnotique.

Les anticorps anti-*chlamydia psittaci,* variété *ovis* testés en immunofluorescence indirecte donnent des plages de marquage positives dans les branchies et le manteau (Fig. 5). La localisation de la fluorescence semble correspondre à celle des ponctuations basophiles observées à l'hématoxyline-éosine. Ces résultats laissent supposer l'existence d'un site antigénique commun entre le microorganisme de type chlamydien décrit chez l'huître creuse et *Chlamydia psittaci.* La qualité des images obtenues avec ces anticorps à dilutions élevées (1/1000ème et 1/10 000ème) montre que ceux-ci possèdent une bonne spécificité pour le genre *Chlamydia.*

Figure 1 : Huître creuse, *Crassostrea gigas*. Anomalies macroscopiques des branchies, Présence d'indentations.

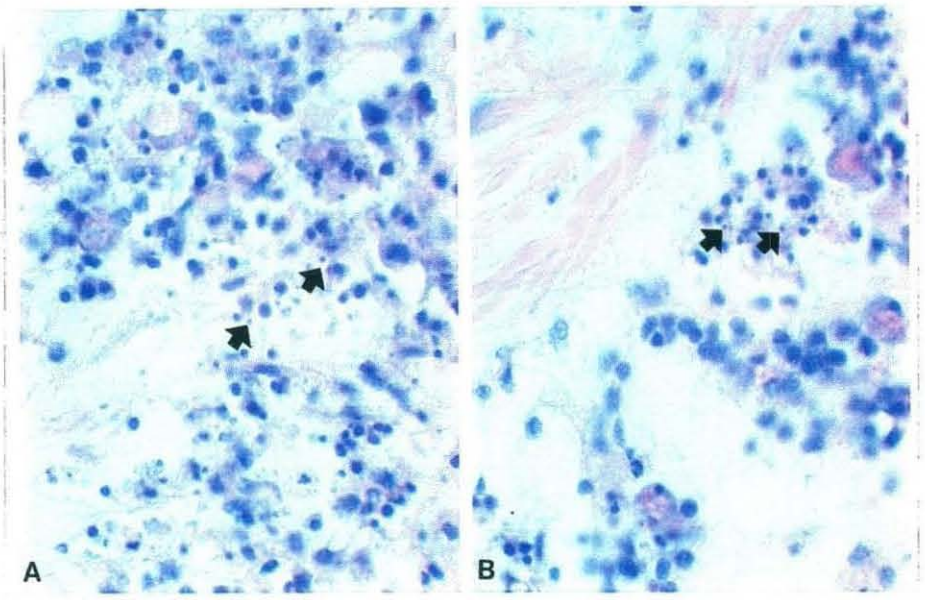


Figure 2 (A et B) : Lésions histologiques observées sur coupes de manteau d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Présence de corpuscules basophiles (⇒) intracytoplasmiques dans les cellules du tissu conjonctif. Coloration à l'Hémalun Eosine.

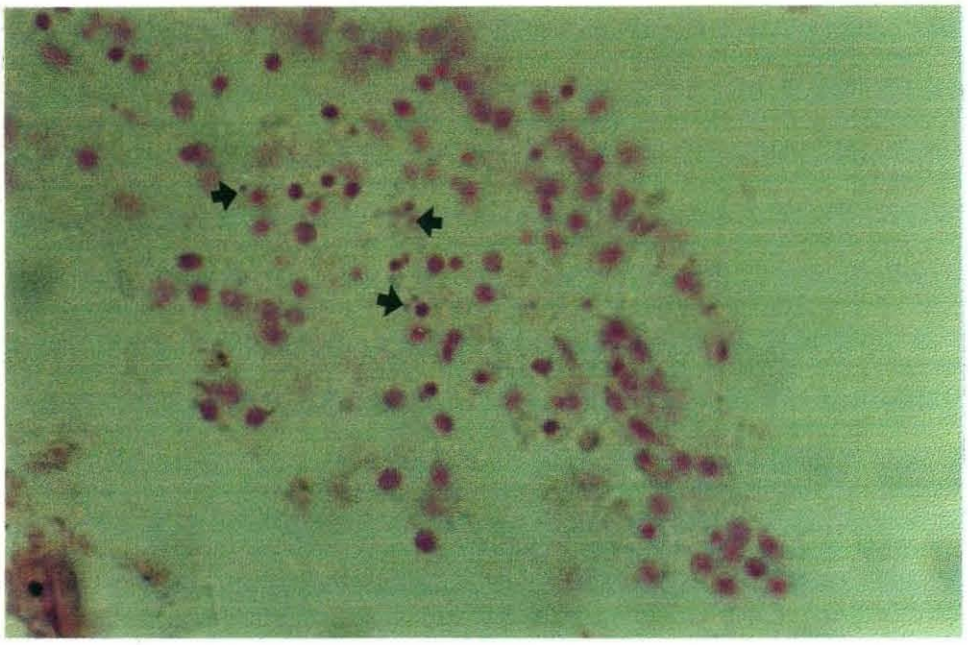


Figure 3 : Lésions histologiques observées sur coupe de manteau d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, après réaction de Feulgen et Rossenbeck : présence de corpuscules intracytoplasmiques conteneant de l'ADN.

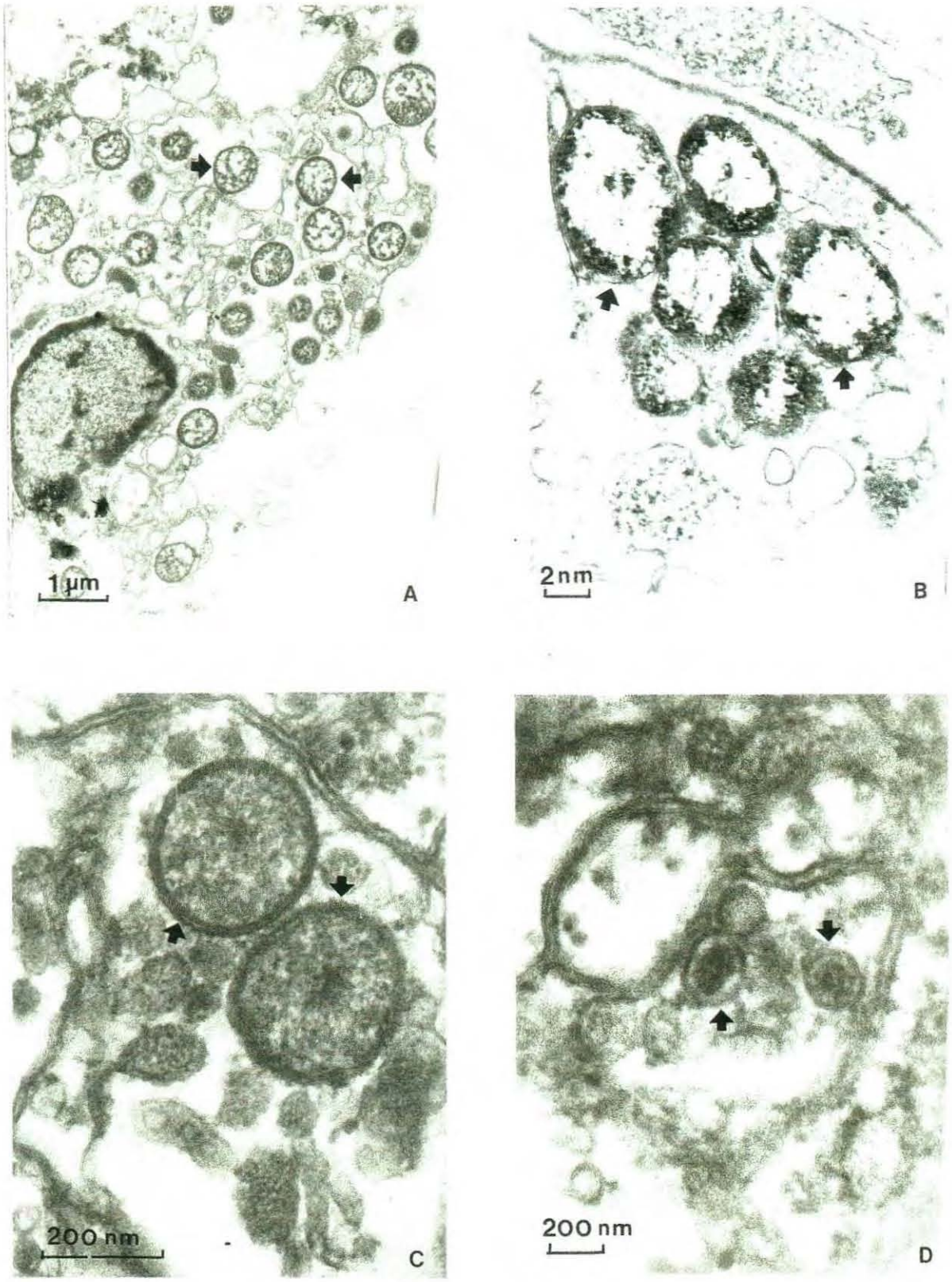


Figure 4 : Clichés en MET d'un microorganisme de type chlamydien chez l'huître creuse, *Crassostrea. gigas*. **A** : Cellule infectée ; présence de corps réticulés à l'intérieur de vacuoles cellulaires (⇒). **B** : Détails de corps réticulés. **C** : Détails de corps intermédiaires. **D** : Détails de corps élémentaires.

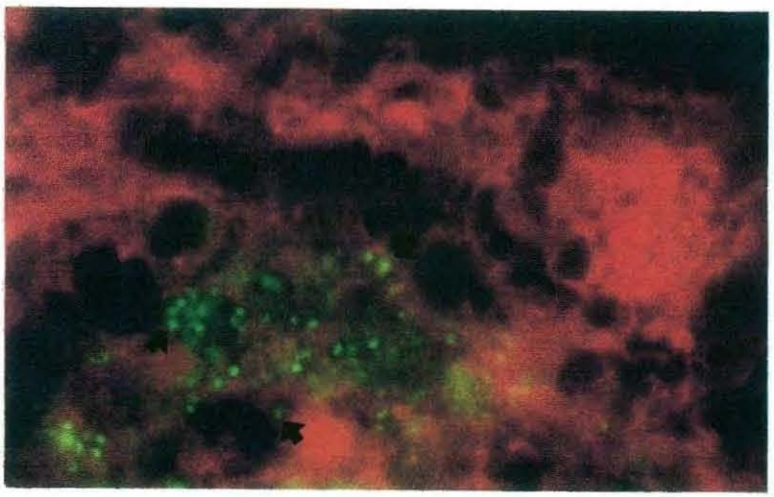


Figure 5 : Marquage obtenu par la technique d'immunofluorescence indirecte sur coupe de manteau d'huître creuse au moyen d'un anticorps monoclonal anti-*Chlamydia psittaci,* variété *ovis*.

Figure 6 : Coupe de manteau d'huître creuse traitée au moyen d'un anticorps monoclonal anti-*Chlamydia psittaci,* variété *ovis* par la technique d'immunoperoxydase.

De ce fait, en attendant la production d'anticorps spécifiques du procaryote mis en évidence chez l'huître creuse, ils pourraient être utilisés en complément de la microscopie photonique et permettraient alors un diagnostic rapide sans avoir recours à la microscopie électronique.

Les résultats obtenus après traitement des coupes par la technique d'immunopéroxydase sont quant à eux plus difficilement interprétables. En effet, les plages de marquages sont relativement discrètes et difficilement discernables du bruit de fond (Fig. 6). Cette différence de réponse entre les deux techniques utilisées pourrait être due au milieu de conservation des anticorps primaires, qui contient de l'azide de sodium, inhibiteur des péroxydases.

En ce qui concerne le pouvoir pathogène de cette chlamydie-like, l'effet de ce procaryote est clairement défini au niveau cellulaire où il entraîne la lyse des cellules infectées et la destruction du tissu périphérique. En revanche, à l'échelle animale, rien ne permet d'affirmer qu'il est responsable de mortalités chez l'huître. En effet, même si celui-ci est retrouvé chez des animaux moribonds ou dans un mauvais état physiologique, seuls des essais de reproduction expérimentale de l'infection permettront de mettre en évidence un éventuel effet pathogène. L'inoculation de ce microorganisme de type chlamydien à des huîtres saines nécessite au préalable d'établir un protocole de purification afin de disposer d'une quantité suffisante de procaryotes. Par manque de matériel biologique, les essais de purification en sont restés au stade expérimental.

A l'heure actuelle, l'étude de cette chlamydie-like se limite à un suivi épidémiologique sur plusieurs années. La compilation des données acquises permettra de mieux définir l'évolution de la maladie et par la même occasion de compléter les observations déjà réalisées. Les résultats de l'enquête épidémiologique réalisée en 1993 n'ayant fait l'objet d'aucune publication, ces données ne seront pas exploitées dans ce rapport.

II - Recherche de l'étiologie d'un syndrôme de type «anneau brun» chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*.

D'importantes mortalités ont été enregistrées en 1993 sur les productions de naissain d'huître américaine, *Crassostrea virginica*, élevé à l'écloserie d'IFREMER Ronce-les-Bains. L'examen macroscopique réalisé à l'ouverture des huîtres a révélé la présence d'un dépôt de matériel organique, ou anneau brun, sur la face interne des coquilles. Ce symdrôme a déjà été décrit chez la palourde, *Ruditapes philippinarum*, associé à la présence d'un vibrio, le VP1 (Paillard *et al.*, 1989 ; 1990). De ce fait, des études histologique et bactériologique ont été entreprises afin de rechercher la cause des mortalités et l'origine de cet anneau.

1 . Matériel et méthodes.

1.1 . Histologie.

Vu la petite taille des animaux (naissain), seul un type de fixateur est utilisé pour l'étude histologique. Les huîtres sont fixées entières (sans la coquille) dans du Carson, assurant ainsi leur éventuelle récupération pour une analyse en microscopie électronique à transmission. Les étapes suivantes, amenant les échantillons jusqu'à leur observation au microscope photonique, restent les mêmes que celles décrites dans le paragraphe 1 de la première partie.

Des colorations histochimiques sont également mises en oeuvre en complément de celle utilisée en routine, l'hématoxyline-éosine. La réaction de Feulgen-Rossenbeck permet de révéler les acides nucléiques alors que la coloration de Von Kossa (protocole en annexe 10) est une réaction de substitution des sels de calcium par des ions argent. Suite à l'action du nitrate d'argent les sels de

calcium sont dissous ; leur remplacement par des ions argent est ainsi possible. Ces derniers donnent alors en microscopie photonique de fines granulations brunes.

1.2 . Microscopie électronique à transmission (MET).

Les animaux présentant des anomalies observables au microscope photonique sont récupérés pour être traités en microscopie électronique à transmission. Les zones de tissu intéressantes sont alors extraites du bloc à l'aide d'un scalpel puis plongées dans du xylène afin d'éliminer la paraffine. Après déparaffinage, les échantillons sont rincés dans deux bains d'alcool (2 fois 12 heures) puis dans du cacodylate de sodium (deux bains de 12 heures pendant deux jours). Les tissus ainsi traités sont ensuite fixés en glutaraldéhyde à 3%. Les étapes suivantes sont les mêmes que celles exposées dans le paragraphe 2 de la première partie.

1.3 . Bactériologie.

Afin de pouvoir comparer les résultats, l'étude bactériologique est effectuée à la fois sur le liquide intervalvaire et sur le broyat de 15 huîtres présentant un anneau brun.

1.3.1 . Désinfection des huîtres.

Les huîtres sont lavées et brossées sous l'eau courante puis désinfectées dans un bain d'alcool à 70° pendant une minute. Après séchage sous une hotte à flux laminaire, les animaux sont ouverts stérilement avec une lame de scalpel, en prenant soin de ne pas éliminer le liquide intervalvaire.

1.3.2 . Récupération du liquide intervalvaire.

Le liquide intervalvaire est recueilli à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue d'un millilitre (matériel stérile). Les huîtres ponctionnées sont mises de côté afin d'être utilisées pour les broyats. Les 500 µl de liquide prélevés sont quant à eux transvasés dans un flacon stérile pour ensuite être dilués

1.3.3 . Réalisation du broyat.

Les animaux sont séparés de leur coquille avec un scalpel stérile puis déposés dans un récipient préalablement autoclavé et contenant 50 millilitres d'eau de Lewis stérile (composition en annexe 11). Les six grammes de tissus recueillis sont alors broyés jusqu'à obtention d'un liquide homogène, à l'aide d'un ultra-turrax préalablement javélisé et rincé en eau de Lewis stérile.

1.3.4 . Dénombrement.

Le dénombrement de la flore bactérienne du liquide intervalvaire et du broyat se fait par ensemencement sur quatre milieux de culture différents :

- Marine agar, milieu non sélectif.

- ZoBell, milieu non sélectif.

- ZMBBT (ZoBell, mannitol, bleu de bromothymol), milieu non sélectif permettant la différenciation entre les souches utilisant le mannitol de celles qui ne peuvent le dégrader.

- TCBS (thiosulfate, citrate, bile, saccharose), milieu sélectif pour les vibrionacés, il révèle également la possibilité d'utilisation du saccharose par certaines souches.

La composition des milieux est répertoriée en annexe 11.

Afin d'obtenir des résultats interprétables, les deux préparations initiales sont soumises à une série de dilutions successives de dix en dix.

Chaque solution est ensemencée sur le panel de milieu en déposant 100 µl d'inoculum qui sont étalés selon la technique du râteau.

Les géloses sont ensuite mises à incuber dans une étuve à 20°C pendant 48 heures.

1.3.5 . Repiquage des colonies.

En vue d'une description macroscopique et d'une identification, chaque type de colonie observée sur les milieux de dénombrement est isolée sur une même série de géloses.
Les milieux ensemencés sont alors placés dans une étuve à 20°C pendant 48 heures.

1.3.6 . Identification des souches bactériennes.

Sur chaque souche isolée sont réalisées une coloration de Gram et la recherche d'enzymes respiratoires. Par la suite, ces bactéries sont ensemencées sur des milieux classiques d'identification :

- Gélose VF (composition en annexe 11).
- Milieu MEVAG (composition en annexe 11).
- Galerie API 20 E.
- Galerie API 20 NE.

Les caractères observés sur ces milieux s'avèrent insuffisants pour identifier une bactérie marine. De ce fait, d'autres caractères sont recherchés à l'aide d'une technique de culture sur microplaque permettant de tester 33 sources de carbone. La liste des substances utilisées et leur mode de préparation sont joints en annexe 12.

Après réalisation, les solutions sont distribuées à raison de 150 µl par puits et ensemencées avec 50 µl d'une suspension bactérienne de densité optique voisine de 0,1 Unité d'absorbance. Les plaques sont lues, à 405 nm, juste après inoculation, puis une fois par jour pendant une semaine, à l'aide d'un spectrophotomètre (Titertek Multiskan MCC/340).

Les différentes préparations sont incubées à 25°C.

2 . Résultats-discussion.

Les animaux analysés présentent en bordure du manteau un dépôt brunâtre de matériel organique similaire, bien que moins adhérent, à celui décrit par Paillard *et al.*, en 1989, chez la palourde, *Ruditapes philippinarum* (Fig. 7).

Les coupes observées en histologie n'ont révélé aucun agent pathogène. Cependant, les branchies et le manteau comportent de nombreuses ponctuations basophiles au niveau des structures de soutien (Fig. 8). Les colorations histochimiques effectuées ont permis de préciser la nature chimique de ces granulations. De toute évidence, celles-ci ne contiennent pas d'acide nucléique (réaction de Feulgen négative) mais semblent composées de sels de calcium (coloration brune au Von Kossa) (Fig. 9).
Ces ponctuations retrouvées en microscopie électronique à transmission apparaissent sous forme de sphères de 500 nm à 1 µm de diamètre formées d'un matériel amorphe, dense aux électrons, arrangé en couches concentriques. Ces observations semblent confirmer la nature minérale de ces corpuscules.

Les images observées sur ce lot de naissain, tant sur le plan macroscopique que microscopique laissent suspecter un dysfonctionnement dans le métabolisme du calcium. Cette augmentation de minéralisation pourrait expliquer la formation de l'anneau de matériel organique déposé sur la face interne des valves et la mort des animaux. En effet, comme le signalent Paillard et

Figure 7 : Huître américaine, *Crassostrea virginica*. Présence d'un dépôt brunâtre de matériel organique à la face interne des valves (⇒).

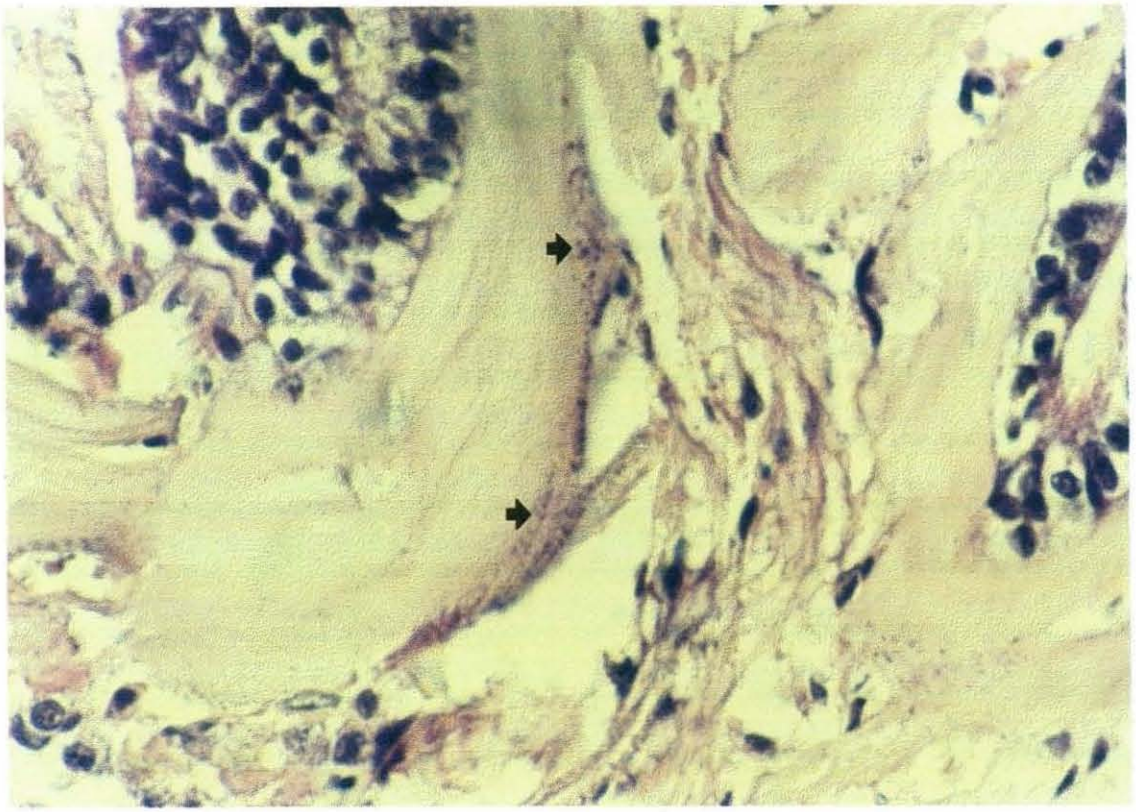


Figure 8 : Huître américaine, *Crassostrea virginica*. Coloration à l'Hémalun Eosine. Présence de ponctuations basophiles anormales au niveau du tissu de soutien des branchies (⇒).

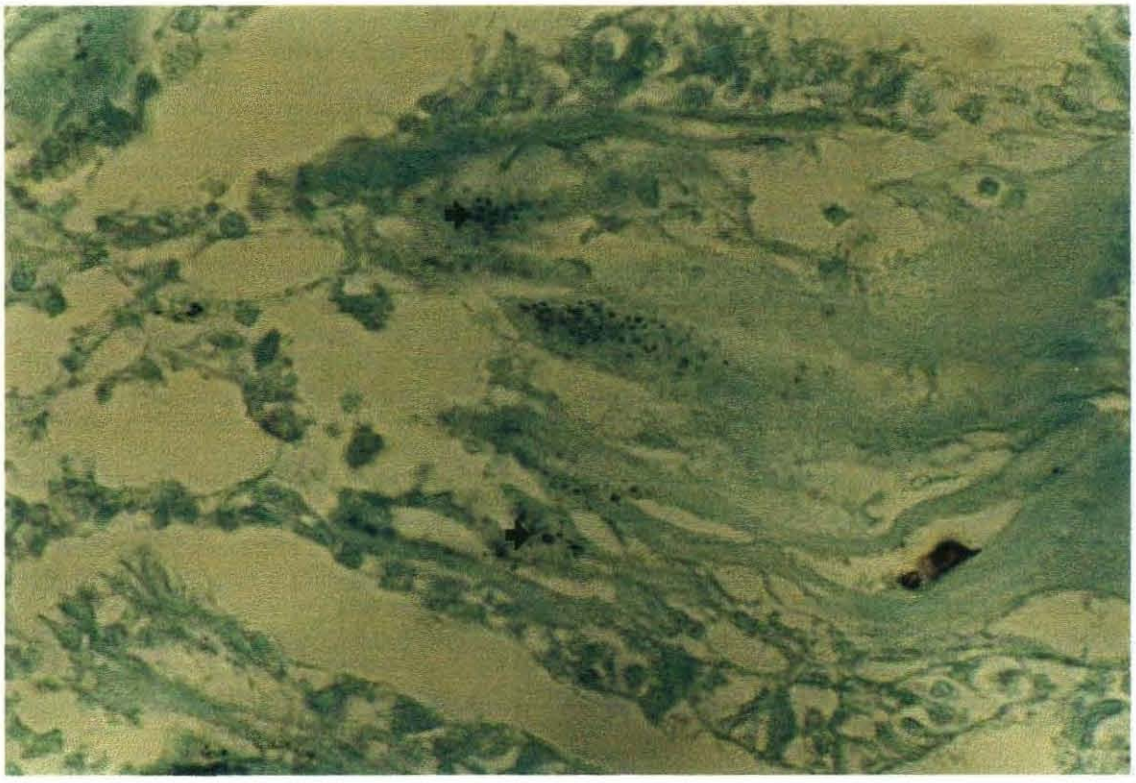


Figure 9 : Huître américaine, *Crassostrea virginica*. Présence de ponctuations positives à la réaction de Von Kossa dans les tissus de soutien des branchies (⇒).

Maes (1989), la formation du dépôt calcique provoque une altération majeure dans la croissance coquillière, présentant de ce fait un caractère épuisant pour l'animal. La mort de l'huître serait donc provoquée par un épuisement général induit par la présence de "l'anneau brun".

L'histologie n'ayant pas permis de préciser plus avant l'origine de ce dysfonctionnement, les analyses se sont donc orientées vers la bactériologie afin de rechercher la présence éventuelle d'une bactérie décrite comme pathogène chez les bivalves marins (VP1, *Vibrio anguillarum* ou *Vibrio alginolyticus*).

Sur le plan de la numération, après comptage des colonies observées sur les différentes géloses ensemencées (Marine agar, ZoBell, ZMBBT, TCBS), le nombre de bactéries présentes dans les milieux initiaux se calculent de la manière suivante :

- Nombre de bactéries par millilitre d'eau intervalvaire ou de broyat d'huître (Nb/ml)

$$Nb/ml = Nc \times 1/d \times 10$$

Nc : nombre de colonies observées
d : dilution utilisée

- Nombre de bactéries par gramme de tissu (broyat réalisé avec 6 g de tissus broyés dans 50 ml d'eau de Lewis)

$$Nb/g = Nb/ml \times 6/50$$

Nb/g : nombre de bactéries par gramme de tissu.

Origine de l'inoculum	Broyat								Eau intervalvaire			
Dilutions	10^{-1}		10^{-2}				10^{-3}		10^{-2}		10^{-3}	
Milieux	TCBS		TCBS		ZMBBT		TCBS		ZMBBT		ZMBBT	TCBS
Nombre de colonies	140J	2V	105J	1V	24J	6B	25J	1V	514B	97J	657J	85J
Nb/ml ($\times 10^{3}$)	14	0,2	105	1	24	6	250	10	514	97	6570	850
Nb/g ($\times 10^{1}$)	168	2,4	1260	12	288	72	3000	120				
Numéro d'identification	1	2	1	2	4	3	1	2	7	6	6	7

J : jaune V : verte B : bleue

Les données exprimées dans le précédent tableau sont, étant donné leur disparité, difficilement interprétables sur le plan de la numération. Il en ressort néanmoins que les bactéries 1 et 4 prédominent au niveau de la masse viscérale et qu'une espèce proche (n°6) soit également la plus abondante dans le liquide intervalvaire.

Les différentes colonies observées sont repiquées sur quatre milieux d'isolement (Marine agar, ZoBell, ZMBBT; TCBS) en vue d'une description macroscopique (exposée dans le tableau 1).

Tableau 1

Description macroscopique des bactéries isolées.

Numéro d'identification	Marine Agar	ZoBell	ZMBBT	TCBS
1	Colonie crêmes, bombées, contour régulier, 1à 2 mm de diamétre.	Colonies crêmes, bombées, ,contour régulier, 3 à 4 mm de diamétre.	Colonies oranges, bombées, contour régulier, 1à 2 mm de diamétre.	Colonies jaunes, plates, brillantes, contour régulier, 3 à 4 mm de diamétre.
2	Colonies beiges, bombées, contour régulier, 1à 2 mm de diamétre.	Colonies beiges, bombées, contour régulier, 1à 2 mm de diamétre.	Colonies vertes, bombées, contour régulier, 0,5 à 1 mm de diamétre.	Colonies vertes, bombées, contour régulier, 2 à 3 mm de diamétre.
3	Colonies marrons, bombées, contour régulier, 0,5 à 2 mm de diamétre.	Colonies beiges, bombées, contour régulier, 2 à 3 mm de diamétre.	Colonies vertes, alcalinisant la gélose, bombées, contour régulier, 0,5 à 1 mm de diamétre.	Colonies vertes, bombées, contour régulier, 0,5 à 2 mm de diamétre.
4	Colonies beiges, bombées, contour régulier, 1à 3 mm de diamétre.	Colonies beiges, bombées, contour régulier, 3 à 4 mm de diamétre.	Colonies oranges, bombées, contour régulier, 1à 2 mm de diamétre.	Colonies jaunes, plates, brillantes, contour irrégulier, 2 à 4 mm de diamétre.
5	Colonies beiges, bombées, contour régulier, diamétre inférieur à 1 mm.	Colonies beiges, bombées, contour régulier, 2 à 3 mm de diamétre.	Colonies oranges, bombées, contour régulier, 1à 2 mm de diamétre.	Colonies jaunes, plates, brillantes, contour irrégulier, 3 à 4 mm de diamétre.
6	Colonies beiges, bombées, contour régulier, 1à 2 mm de diamétre.	Colonies beiges, bombées, contour régulier, 2 à 4 mm de diamétre.	Colonies oranges, bombées, contour régulier, 1à 2 mm de diamétre.	Colonies jaunes, plates, brillantes, contour irrégulier, 3 à 4 mm de diamétre.
7	Colonies marrons, bombées, contour régulier, 2 à 4 mm de diamétre.	Colonies beiges, bombées, contour régulier, 3 à 4 mm de diamétre.	Colonies vertes, alcalinisant la gélose, bombées, contour régulier, 1 à 2 mm de diamétre.	Colonies vertes, bombées, contour régulier, 2 à 3 mm de diamétre.

Tableau 2

Caractères biochimiques observés

Caractères	1	2	3	4	5	6	7
ONPG	+	-	-	+	+	+	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	+	-	-	-	-	-
ODC	-	+	+	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	-
H_2S	-	-	+	-	-	-	+
Uréase	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	-	+	+	+	-
Gélatinase	-	-	+	-	-	-	-
Glucose	+	+	-	+	+	+	-
Mannitol	+	-	-	+	+	+	-
Inoditol	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	+	+	+	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	+	-	-	+	+	+	-
Mélibiose	-	-	-	-	-	-	-
Amylose	+	+	-	+	+	+	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
NO_2	+	+	+	+	+	+	+
Esculine	+	-	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	+	+	+	-
Caprate	+	-	+	+	+	-	+
Adipate	-	-	+	-	+	-	+
Lactose	+	-	-	+	+	+	-

Caractères	1	2	3	4	5	6	7
Raffinose	-	-	-	+	+	-	-
Tréhalose	-	+	-	+	-	-	-
Fructose	-	+	-	+	+	-	-
Galactose	+	+	-	+	+	+	-
Gluconate	-	-	-	-	-	-	-
Glycérol	-	-	-	-	-	-	-
Oxalate	-	-	-	+	-	-	-
Phénol	+	+	-	+	+	-	-
Acétate	+	+	-	+	+	+	-
Alanine	-	-	-	-	-	-	-
Lysine	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	+	+	-
Ornithine	-	-	+	-	-	-	-
Méthionine	-	-	-	-	-	-	-
Proline	-	-	-	-	-	-	-
Phényl-alanine	-	-	-	-	-	-	-
Pyruvate	-	-	-	+	+	-	-
Méthanol	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	-	-	-	+	-	-	-
Butanol	-	-	-	-	-	-	-
Malate	-	-	-	-	-	-	-
Tartrate	-	-	-	-	-	-	-
Lactate	+	+	+	+	+	-	+
Mannose	-	+	-	+	+	-	-

Après comparaison, il semblerait que les souches 1, 2, 4, 5 et 6 soient proches morphologiquement, de même pour les bactéries 3 et 7. Ces différentes données permettent également de vérifier qu'aucune de ces souches ne donne des colonies similaires à celles obtenues avec le VP1.

Les examens des colorations selon la méthode de Gram et le test de l'oxydase réalisés se sont révélés être respectivement négatifs et positifs sur toutes les souches isolées. De ce fait, les recherches doivent donc être orientées vers les familles des *Vibrionaceae* et des *Pseudomonadaceae*. La distinction entre les deux familles repose sur le type respiratoire et la voie d'utilisation du glucose. Les résultats de ces tests sont répertoriés dans le tableau suivant.

Souches	1	2	3	4	5	6	7
Type respiratoire	AAF	AAF	AS	AAF	AAF	AAF	AS
Voie d'utilisation du glucose	F	F	O	F	F	F	O

AAF : Aéro-anaérobie facultatif
F : Fermentatif
AS : Aérobie strict
O : Oxydatif

Les caractères observés, aéro-anaérobie facultatif et utilisation du glucose par voie fermentative, permettent de classer les souches 1, 2, 4, 5 et 6 dans la famille des *Vibrionaceae*, alors que les bactéries 3 et 7 semblent apparentées aux *Pseudomonadaceae*.

Les caractéres biochimiques recherchés sur les galeries API 20E et 20NE ansi que sur microplaques sont compilés dans le tableau 2. Ces données expérimentales sont, pour chaque espèce, comparées avec les caractéristiques des Vibrios et des Pseudomonas décrits dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Il ressort de cette recherche qu'aucune des bactéries isolées à partir du liquide intervalvaire ou du broyat des huîtres américaines n'est identifiable. En effet, toutes les espèces étudiées diffèrent d'au moins neuf caractères de celles exposées dans le Bergey's. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette dissemblance entre les bactéries cultivées et celles décrites dans la littérature. Tout d'abord, du fait de la grande diversité de la flore bactérienne marine et de la faible influence qu'elle revêt chez l'homme, très peu d'espèces ont jusqu'alors été décrites. Il se pourrait donc que les bactéries étudiées n'aient fait l'objet d'aucune recherche approfondie. La seconde hypothèse remet en cause la fiabilité des résultats observés. Afin de vérifier la reproductibilité de la méthode utilisée, plusieurs essais de culture sur microplaques ont été entrepris sans aucun résultat. D'autres tentatives sont en projet mais par manque de temps celles-ci ne seront réalisées qu'ultérieurement.

TROISIEME PARTIE

TROISIEME PARTIE

Agents protozoaires

Cette troisième partie sera consacrée à *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*, parasites protozoaires de l'huître plate, *Ostrea edulis*.
Ces procaryotes décrits en France pour la première fois, respectivement en 1968 et 1979, ont été responsables dans les années 1970 à 1980 d'épizooties ayant considérablement affecté l'élevage de cette espèce. Actuellement, *M. refringens* et *B. ostreae* subsistent à l'état endémique sur les côtes européennes, empêchant ainsi la reprise de ce secteur d'activité. De ce fait, afin de limiter leur expansion, ces deux parasites ont été retenus dans la législation européenne comme agents à recherche obligatoire. Cette règlementation permettra, après classement des zones du littoral européen en secteurs indemnes ou non indemnes, de réguler les échanges commerciaux entre celles-ci.

I - *Marteilia refringens*.

La recherche de *Marteilia refringens* dans le cadre de la règlementation européenne ne peut se faire que par l'histologie classique. Néanmoins, une technique, plus rapide, d'apposition d'organe est utilisée pour le suivi des mortalités d'huîtres plates mises en stabulation au laboratoire.

1 . Matériel et méthodes.

1.1 . Appositions de glande digestive.

Marteilia refringens se retrouve au niveau des épithéliums stomacaux et des diverticules digestifs. La recherche de ce parasite est donc effectuée à partir du tissu de la glande digestive. Après ouverture des huîtres, un morceau de masse digestive est prélevé avec un scalpel puis légèrement séché sur du papier filtre. Les appositions de glande digestive sont obtenues en mettant en contact les tissus sur une lame ; ce simple geste suffit pour obtenir une empreinte de tissu. Les préparations sont alors fixées dans un bain de méthanol (pendant une minute) puis colorées à l'Hémacolor (solutions commercialisées par Merck) avant d'être observées au microscope photonique.

1.2 . Histologie et microscopie électronique à transmission.

Les traitements des échantillons en vue d'observations en microscopie photonique et électronique à transmission sont respectivement exposés dans les paragraphes 1 et 2 de la première partie.

1.3 . Immunofluorescence indirecte (IFI).

Des anticorps polyclonaux anti-*Marteilia maurini*, parasite de la moule, *Mytilus galloprovincialis*, ont été testés en IFI selon la technique décrite dans le paragraphe 1.3.1 de la deuxième partie.

2 . Résultats-discussion.

L'examen microscopique des huîtres parasitées révèle au niveau des épithéliums de l'estomac et des diverticules digestifs, la présence de cellules bi ou polynuclées caractéristiques du cycle de reproduction de ce protozoaire. La cellule primaire de forme ovoïde, contenant un noyau excentré, se retrouve le plus fréquemment au niveau de la bordure marginale de l'épithélium stomacal (Fig. 2). Cette cellule souche, mesurant de sept à 34 µm de diamètre, renferme souvent dans son cytoplasme une ou deux cellules secondaires. Ces dernières plus petites, de quatre à cinq µm de diamère, possèdent un cytoplasme très basophile entourant un noyau contenant un volumineux nucléole. Les cellules secondaires, en se divisant, évoluent en pansporoblastes comportant trois ou quatre cellules tertiaires (spores) (Fig. 2).

Sur apposition de glande digestive, les différents stades du cycle de développement de *M. refringens* se distinguent nettement des autres cellules par leur aspect en «cocarde». Ces cellules se composent d'un cytoplasme basophile entourant le noyau peu chromophile au sein duquel le seul nucléole est visible (Fig. 1).

En microscopie électronique à transmission, la cellule souche apparaît délimitée par une membrane unitaire en contact étroit avec les membranes des cellules avoisinantes. Son cytoplasme contient de nombreux ribosomes lui conférant un aspect granuleux distinctif des autres cellules, des inclusions paracristallines denses aux électrons et des haplosporosomes (Fig. 3). Les cellules secondaires délimitées par une double membrane ont une ultrastructure très proche des cellules précédemment décrites. Lors de leur maturation, les pansporoblastes s'entourent d'une paroi constituée de quatre feuillets membranaires. Dans le même temps, de grosses inclusions amorphes très denses aux électrons (granules refringents) se forment dans le cytoplasme de ceux -ci.

Les spores incluses dans les pansporoblastes sont entourées d'une paroi constituée de deux à trois zones concentriques. Ces cellules tertiaires, en fin de maturation, renferment trois sporoplasmes uninucléés repoussant le noyau de la spore contre la paroi.

L'anticorps anti-*Marteilia maurini* testé en immunofluorescence indirecte se révèle être spécifique des stades parasitaires matures. En effet, seules les cellules contenant des pansporoblastes présentent une fluorescence (Fig. 4).

Ce marquage semble localisé au niveau du cytoplasme des pansporoblastes et non sur leur membrane. Par ailleurs, l'observation de cellules souches contenant une ou deux cellules secondaires non marquées laisse supposer que cet anticorps polyclonal ne reconnaît qu'un épitope porté par les stades avancés du parasite. Cet anticorps ne peut donc être utilisé à des fins de diagnostic car les animaux en début d'infestation seraient dans ce cas faussement négatifs. La fluorescence observée sur les coupes d'huître plate parasitée par *M. refringens* suggère en outre l'existence d'un site antigénique commun à *M.maurini* et *M.refringens*.

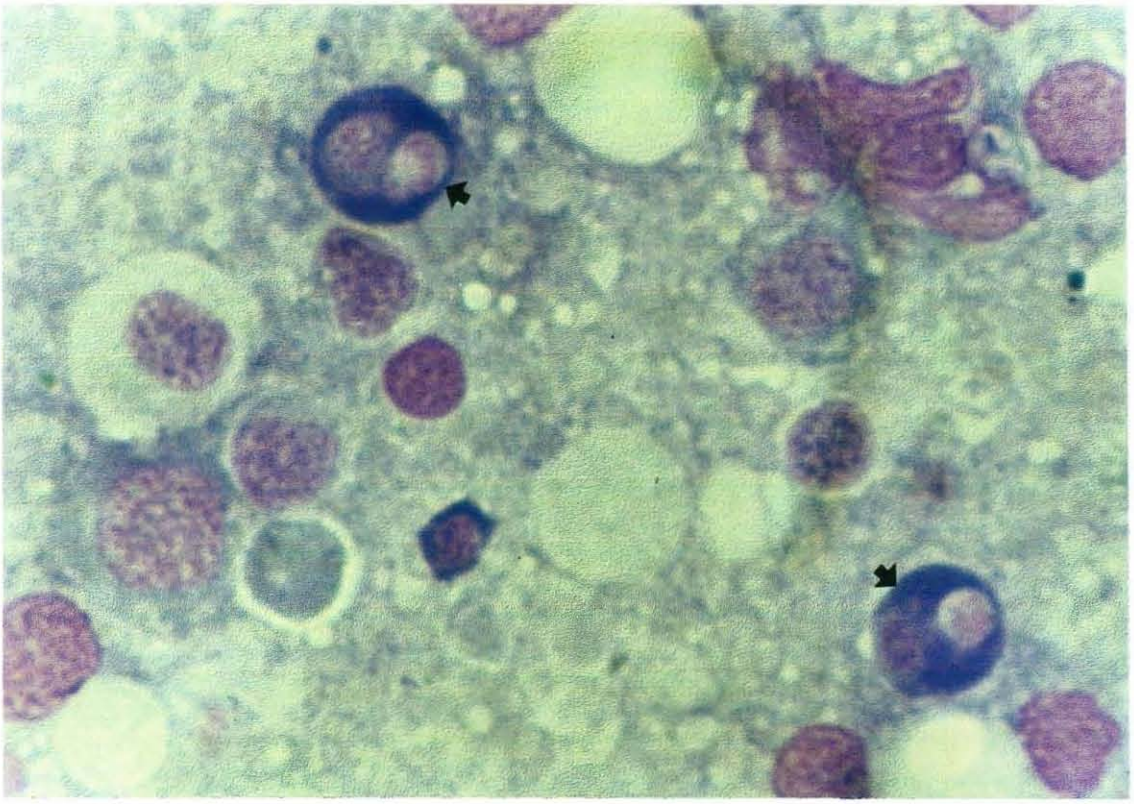


Figure 1 : Huître plate, *Ostrea edulis*. Apposition de glande digestive d'un animal infesté par le parasite, *Marteilia refringens* (⇒).

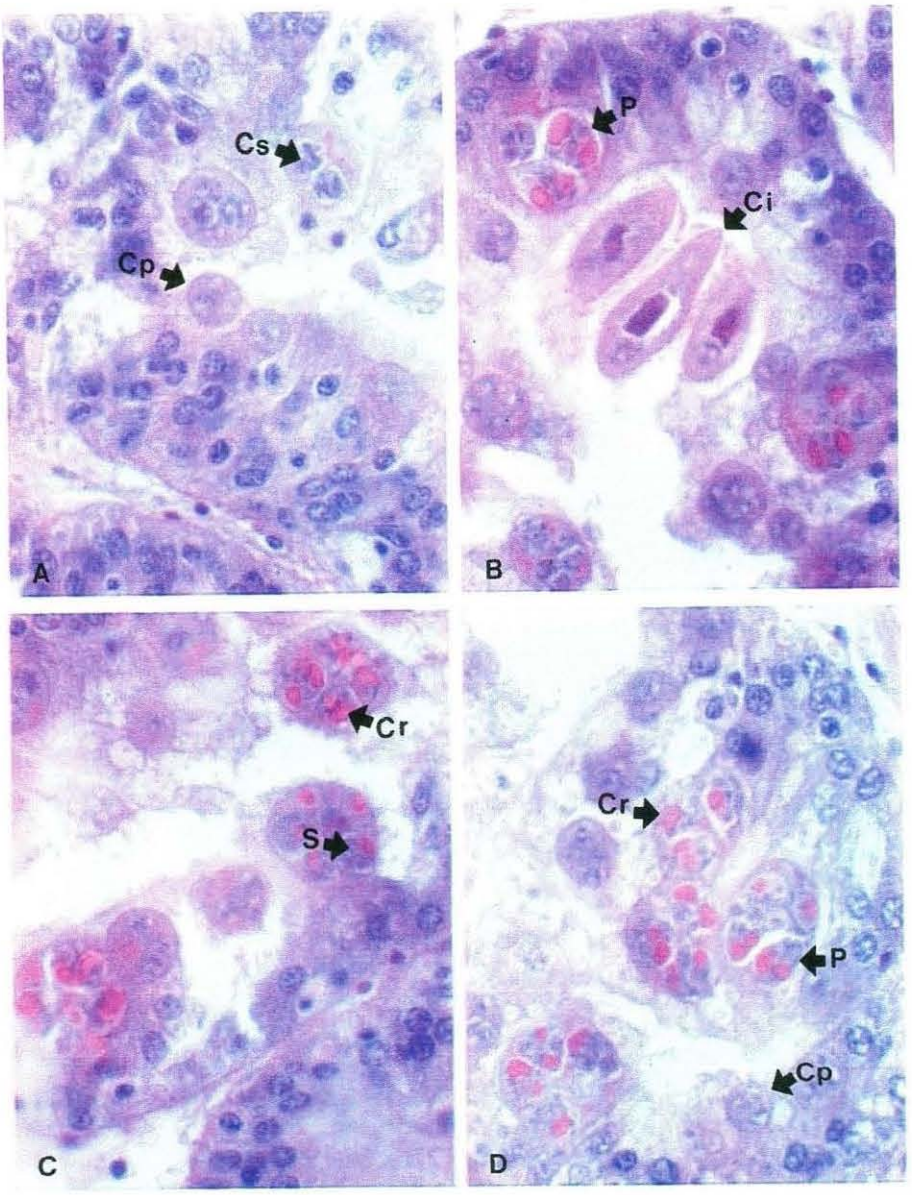


Figure 2 (A, B, C, D) : Huître plate, *Ostrea edulis*, parasitée par *Marteilia refringens*. Coupes histologiques colorées à l'Hémalun Eosine. Ci : Ciliés. Cp : Cellule primaire. Cr : Corps réfringents. Cs : Cellule secondaire. P : Pansporoblastes. S : Spores.

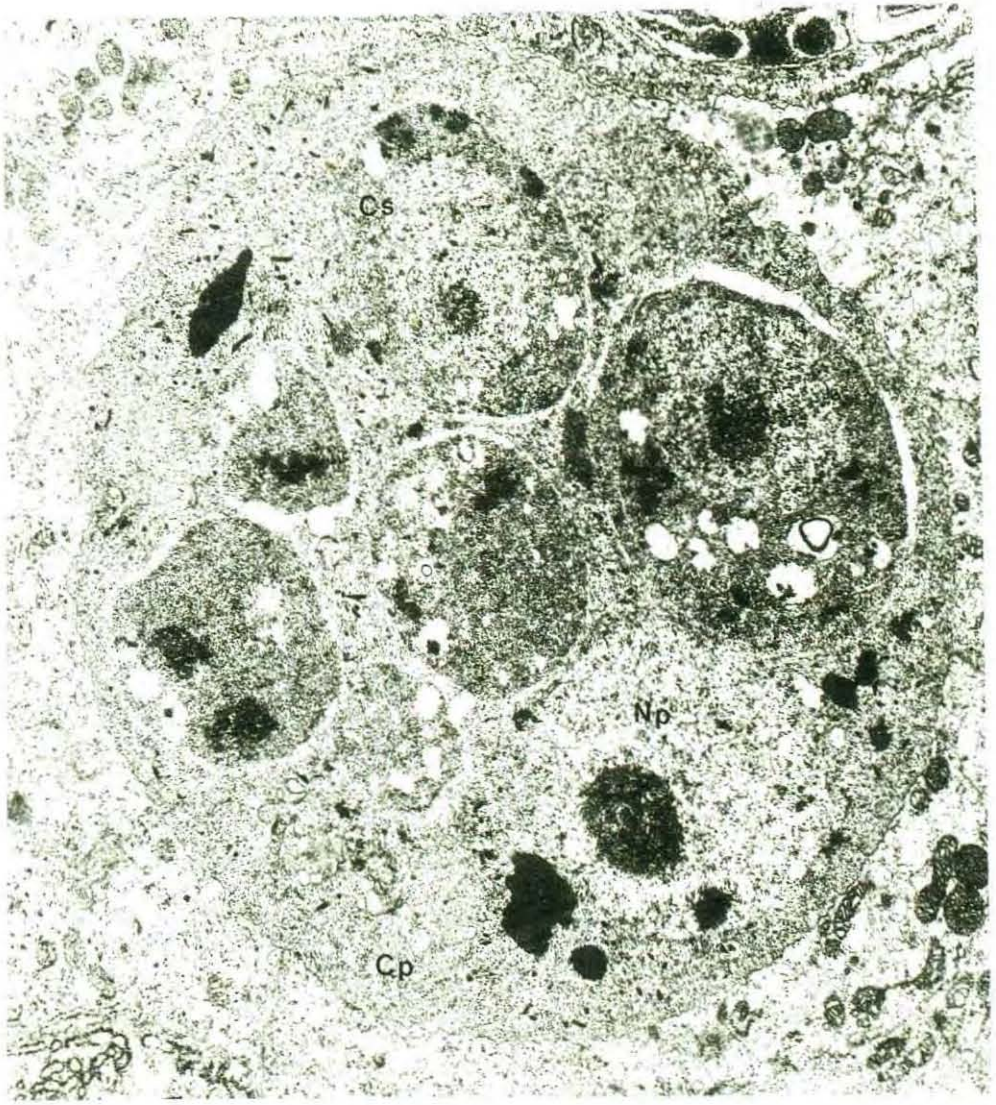


Figure 3 : Cellule de *Marteilia refringens*, parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis*, renfermant quatre cellules secondaires. Np : Noyau de la cellule primaire. Cp : Cellule primaire. Cs : Cellule secondaire.

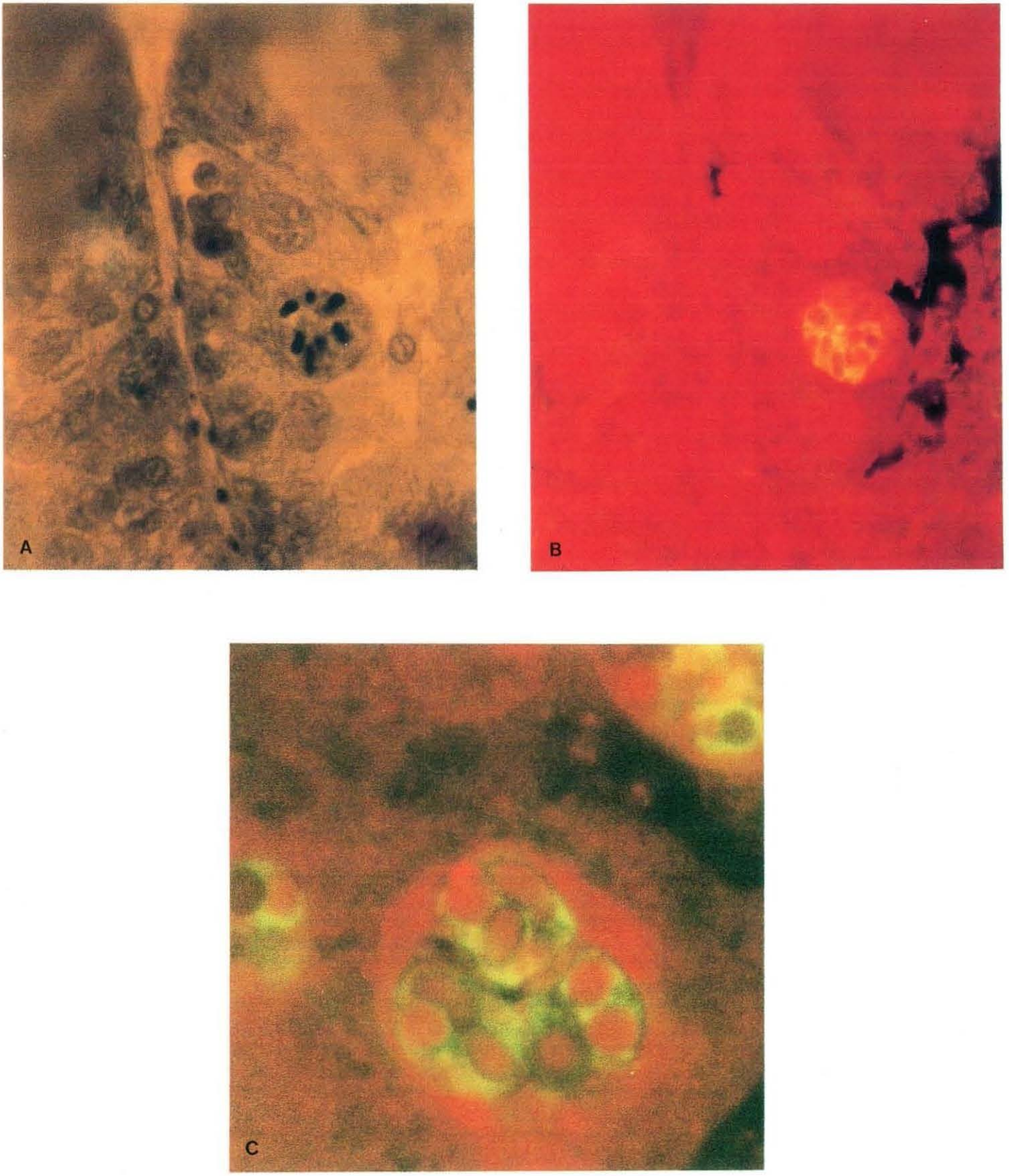


Figure 4 : Huître plate, *Ostrea edulis*. Marquage de coupes histologiques en IFI avec un anticorps polyclonal anti-*Marteilia maurini*, parasite de la moule. **A** : Champs observé en lumière visible. **B** : Même champs observé en épifluorescence. Noter l'absence de marquage des stades primaires. **C** : Marquage des pansporoblastes. Absence de marquage de la cellule primaire et des corps réfringents.

II - *Bonamia ostreae.*

Contrairement au *Marteilia refringens*, la mise en évidence de *Bonamia ostreae*, dans le contexte européen doit être réalisé par deux techniques différentes, sur coupes histologiques et sur apposition de tissu.

1 . Matériel et méthodes.

1.1 . Apposition cardiaque.

Bonamia ostreae parasite les hémocytes de l'huître plate, il peut donc être observé dans tous les tissus de l'animal infesté et plus particulièrement au niveau du coeur. De ce fait, le ventricule cardiaque est l'organe de prédilection pour la recherche de ce protozoaire par la technique d'apposition. Comme dans le cas de *M. refringens*, après contact des cellules cardiaques sur la lame, les préparations sont fixées puis colorées à l'Hémacolor.

1.2 . Histologie et microscopie électronique à transmission (MET).

Les animaux traités selon les techniques détaillées dans les paragraphes 1 et 2 de la première partie, sont observés au microscope photonique et au MET.

1.3 . Immunofluorescence indirecte (IFI).

Des anticorps monoclonaux anti-*Bonamia ostreae* (15C2 et 20B2) ont été testés en immunofluorescence indirecte afin de déterminer leur spécificité vis-à-vis de ce parasite (méthodologie exposée dans le paragraphe 1.3.1 de la deuxième partie). Leur réactivité vis-à-vis de ce protozoaire n'ayant été jusqu'alors analysée que sur frottis en IFI, ces anticorps méritent donc d'être controlés sur coupes histologiques, avant d'être éventuellement utilisés comme outils de diagnostic.

1.4 . Purification de B. ostreae (protocole en annexe 13).

Les huîtres plates utilisées pour purifier le parasite sont préalablement contrôlées en microscopie photonique par la technique d'apposition cardiaque afin de déterminer leur taux d'infestation. Seules deux à trois huîtres fortement parasitées suffisent pour avoir un bon rendement en fin de purification.

Les huîtres sont lavées dans leur coquille avec de l'eau de mer filtrée contenant 1% de Tween 80 (EMFT). Tous les tissus, à l'exception du muscle adducteur, sont broyés dans de l'EMFT, à l'aide d'un ultra-turrax, jusqu'à obtention d'un liquide homogène. Ce broyat est ensuite filtré sur des toiles de maillage décroissant (200, 60 et 20 µm) afin d'éliminer les débris cellulaires non dissociés. Le filtrat obtenu est réparti dans des tubes, puis centrifugé pendant 30 minutes (2000 g à 8°C). En fin de centrifugation le surnageant est éliminé, le culot est lavé avec de l' EMFT, homogénéisé puis déposé à l'aide d'une pompe péristaltique dans des tubes contenant du sucrose à 20% (20 g de sucrose pour 80 ml de EMFT). Cette première centrifugation différentielle permet de concentrer les parasites mais aussi des cellules et des noyaux. Ces débris sont éliminés par une nouvelle centrifugation (2000 g, 30 minutes, 8°C) sur un gradient discontinu de sucrose (20%-40% en EMFT). Les parasites prélevés à l'interface sont lavés très lentement avec de l'EMFT (volume à volume) afin d'éviter un choc osmotique puis concentrés par centrifugation (2000 g, 30 minutes, 8°C) et enfin, remis en suspension dans l'EMFT. L'étape suivante de la purification consiste en une centrifugation isopycnique dans un gradient discontinu de Percoll (30%, 40%, 50%, 60%, 70%). Les parasites localisés aux interfaces 50-60% et 60-70% sont prélevés, dilués dans de l'eau de mer filtrée (sans Tween), puis centrifugés sur un coussin de sucrose 20%. Cette dernière étape permet d'éliminer le Percoll et de concentrer les protozoaires. Les culots obtenus sont repris dans un millilitre d'eau de mer filtrée puis, après dilution au $1/10^{ème}$, le nombre de *B. ostreae* purifié est déterminé par comptage à la cellule de Malassez.

1.5 . Technique de reproduction de la maladie au laboratoire.

1.5.1 . «Anesthésie» et triage des huîtres.

Les huîtres plates à inoculer sont «anesthésiées» par un bain d'une nuit dans une solution à 5% de chlorure de magnésium (50 g de $MgCl_2$ par litre d'eau de mer). Les huîtres vont, en filtrant l'eau, ingérer le magnésium qui agit comme myorelaxant, empêchant ainsi la fermeture des valves. Les animaux «anesthésiés» vont être triés afin d'éliminer du lot les huîtres déjà parasitées. La recherche de *Bonamia ostreae* sur celles-ci se fait par biopsie de branchie. Les tissus prélevés sont traités de la même façon que les appositions cardiaques puis observés au microscope photonique.

1.5.2 . Inoculation du parasite.

Après triage, les huîtres indemnes de parasite sont inoculées par une injection intrapéricardique de 50 µl d'une suspension de *Bonamia ostreae* fraîchement purifié. Les animaux sont alors mis en stabulation dans des bacs d'eau de mer dans la salle de quarantaine de l'écloserie. Celles-ci sont quotidiennement suivies afin de noter les mortalités. Dans ce cas, la recherche du parasite est réalisée par apposition de ventricule, colorée à l'Hémacolor, puis observée au microscope photonique. Les animaux fortement infestés seront utilisés pour de nouvelles purifications.

2 . Résultats-discussion.

L'examen des coupes histologiques révèle la présence de foyers inflammatoires, plus ou moins importants, autour des sinus veineux de tous les organes ; ils résultent d'une infiltration hémocytaire. Les hémocytes observés sont généralement hypertrophiés et renferment pour un bon nombre d'entre eux de petites cellules chromophiles de deux à trois µm de diamètre, *Bonamia ostreae* (Fig. 6). Dans de nombreux cas, ce parasite se retrouve également à l'état libre dans le tissu conjonctif avoisinant. Lors de fortes infestations, ce protozoaire et les infiltrations hémocytaires qui lui sont associées peuvent envahir le tissu conjonctif de tous les organes, désorganisant ainsi toute la structure tissulaire de l'animal.

Sur les deux types d'apposition utilisés (coeur et branchie), *B. ostreae* en position intra ou extrahémocytaire apparaît sous forme de petites cellules plus ou moins sphériques (Fig. 5). Ce protozoaire peut se présenter sous deux formes cellulaires distinctes l'une de l'autre par leur taille et leur basophilie. La plus fréquemment observée mesure deux à trois µm de diamètre. Cette cellule de forme sphérique fortement basophile comporte une ou deux petites vacuoles claires intracytoplasmiques. La seconde forme cellulaire observée est nettement moins basophile, mesurant trois à cinq µm de diamètre et de forme légèrement allongée.

L'observation, en cas de forte infestation, de certains parasites renfermant quatre à cinq noyaux laisse supposer l'existence d'une phase de multiplication schizogonique.

En MET, les formes basophiles précédemment décrites apparaissent avec un cytoplasme riche en ribosomes uniformément répartis. Ces cellules nommées par Pichot *et al* (1980), formes de résistance, ont un noyau contenant un nucléoplasme homogène finement granuleux. Leur cytoplasme renferme une à deux mitochondries, des inclusions de nature lipidique et des particules denses structurées réparties en périphérie (Fig. 7). L'autre type de cellule ou forme végétative (Pichot *et al* , 1980) s'observe préférentiellement dans les tissus peu infectés. Celles-ci se distinguent des formes de résistance par leur noyau renfermant un nucléoplasme granuleux caractérisé par la présence d'un nucléole dense et par la présence de corps de Golgi dans leur cytoplasme.

Les coupes de tissus parasités traitées en IFI puis observées au microscope à épifluorescence montrent différents marquages selon les anticorps considérés. Les préparations testées avec le monoclonal 15C2 dilué au 1/100ème permettent d'observer un marquage des noyaux cellulaires de

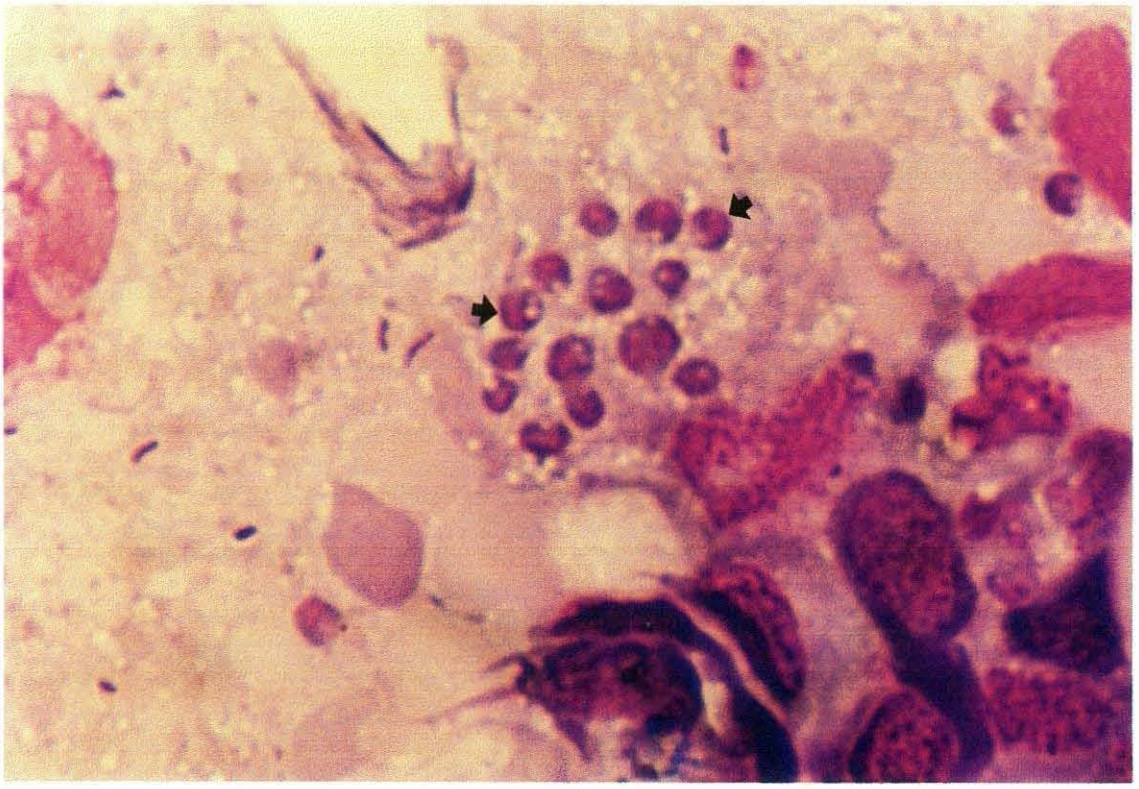


Figure 5 : Huître plate, *Ostrea edulis*. Appositions de coeur d'un animal infesté par le parasite *Bonamia ostreae* (⇒).

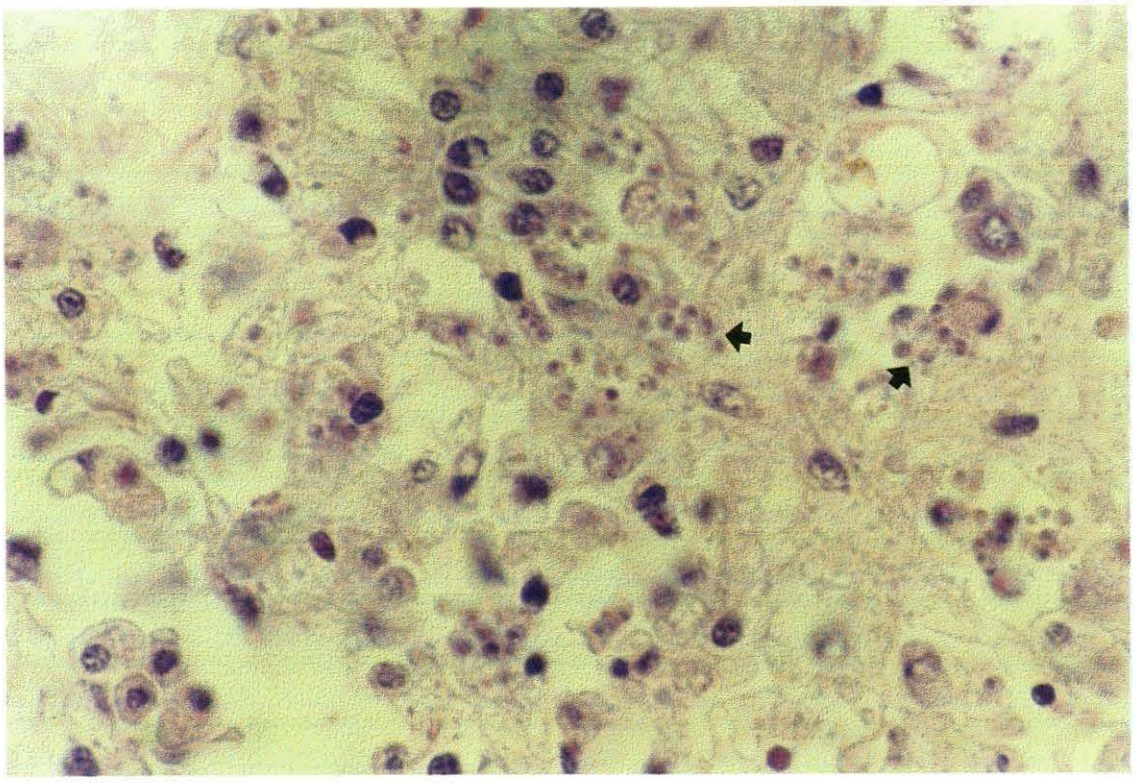


Figure 6 : Huître plate, *Ostrea edulis*. Coupes histologiques colorées à l'Hémalun Eosine. Présence de nombreux parasites, *Bonamia ostreae* (⇒) dans le tissu conjonctif de la masse digestive.

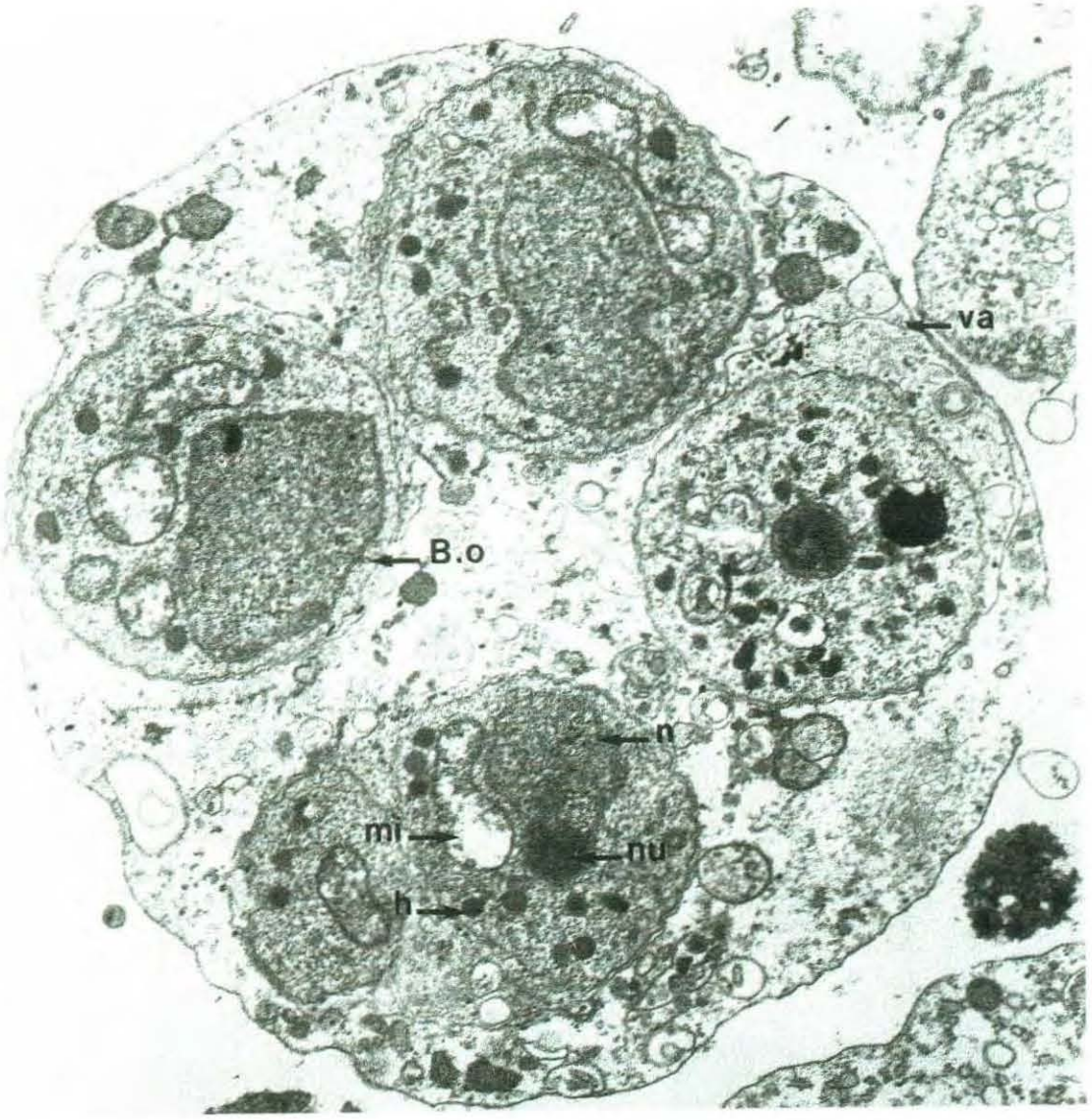


Figure 7 : Hémocyte d'huître plate, *Ostrea edulis*, infecté renfermant quatre parasites, *Bonamia ostreae* ; n : noyau d'un parasite avec son nucléole (nu), mi : mitochondrie, h : haplosporosome, va : vacuole parasitophore.

l'huître (Fig. 8). En effet, la plupart des noyaux de l'huître plate et également de l'huître creuse 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. Afin de vérifier la réactivité du 15C2 vis-à-vis du parasite, cet anticorps (dilué au 1/50ème) a été incubé sur des cytospines de parasites purifiés fixés à l'acétone ou au méthanol et préalablement traités à la trypsine. L'observation de ces préparations en épifluorescence révèle un marquage intracytoplasmique du protozoaire. Ce résultat semble concorder avec ceux des expériences précédentes.

Pour sa part, le second anticorps monoclonal utilisé, le 20B2, s'avère beaucoup plus intéressant. Les coupes testées avec cet anticorps dilué au 1/100ème semblent révéler un léger marquage du parasite mais également de certaines sécrétions cellulaires. Cette faible fluorescence observée au niveau du présumé parasite pourrait être due au fixateur utilisé, le Davidson, qui bloquerait certains épitopes et de ce fait atténuerait le marquage (Fig. 8).

Pour confirmer cette hypothèse il nous a semblé utile de refaire la même expérience mais en faisant préalablement agir de la Trypsine à 0.25 % avant de saturer les tissus dans du Régilait. Cette enzyme assurant la libération de nouveaux sites antigéniques pourrait ainsi permettre une meilleure reconnaissance du parasite par l'anticorps. En outre, afin de vérifier si le résultat observé n'est pas simplement dû à un manque de spécificité du 20B2, celui-ci a été testé à de plus faibles dilutions et également sur des cytospines de parasites purifiés. Sur ces dernières préparations fixées à l'acétone, les anticorps marquent spécifiquement le cytoplasme du protozoaire (Fig. 8). En revanche, avec du méthanol utilisé comme fixateur, aucune cellule parasitaire n'émet de fluorescence, il peut être supposé que le 20B2 ne réagit qu'avec du *B. ostreae* fixé à l'acétone.

Sur coupe histologique préalablement traitée ou non avec de la trypsine, les résultats obtenus restent difficilement interprétables. L'observation de parasites non marqués laisse supposer que le 20B2 ne reconnaît pas ses épitopes ; néanmoins certains hémocytes présentent dans leur cytoplasme de petites plages sphériques légèrement fluorescentes. Sous éclairage en lumière normale, ces corpuscules de taille identique à *B. ostreae* paraissent amorphes et ne permettent donc pas une quelconque interprétation. De nouveaux essais assureraient peut-être une réponse plus sûre quant à la spécificité de cet anticorps.

D'après les différentes manipulations entreprises, les deux anticorps monoclonaux testés sont soit non spécifiques dans le cas du 15C2, soit peu réactifs (20B2) vis-à-vis de *B. ostreae*. De ce fait, ils ne peuvent être utilisés à des fins de diagnostic.

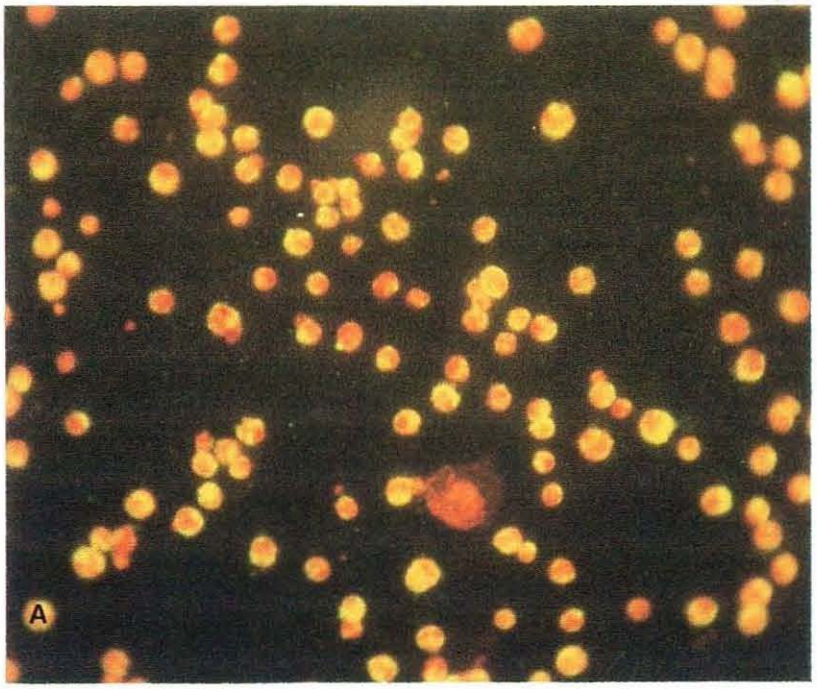
En ce qui concerne la purification du *B. ostreae*, le protocole existant permet de recueillir en moyenne 300 millions de parasites à partir de deux à trois huîtres fortement infestées. Ce protozoaire purifié pourra être utilisé différemment :

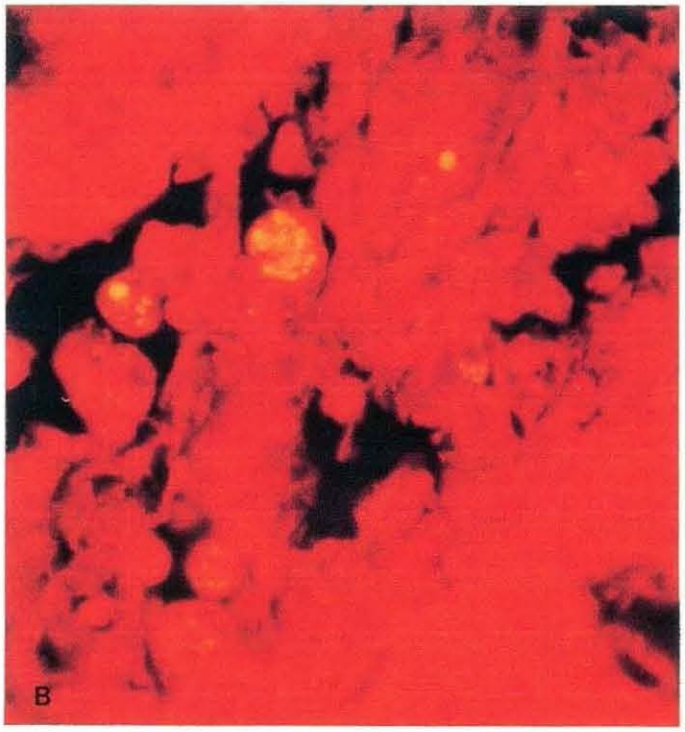
- Ou il sera traité par des enzymes protéolytiques, puis conservé au congélateur.

- Ou celui-ci sera utilisé pour inoculer des huîtres plates saines.

Dans le premier cas, après action d'un tampon de lyse et sonication, le parasite se désagrège en fragments protéiques. Les lysats obtenus seront par la suite étudiés en électrophorèse en vue d'une caractérisation. Ces «protéines» pourront alors être utilisées pour produire des anticorps et permettront également de tester différents réactifs immunologiques par des techniques de Western-blotting.

Les inoculations d'huître avec ce parasite fraîchement purifié permettent de disposer d'un stock de *B. ostreae* constant au laboratoire, ce qui facilite son étude. Par ailleurs, ces inoculations sont également effectuées dans le but de sélectionner des huîtres résistantes au *B. ostreae*. En effet, après injection du parasite à des huîtres saines, celles-ci vont soit développer la maladie puis finir par mourir, soit rester indemnes. Dans ce cas, la descendance de ces animaux résistants sera à nouveau testée, de génération en génération, il est ainsi possible d'espérer fixer des caractères de résistance à ce pathogène.





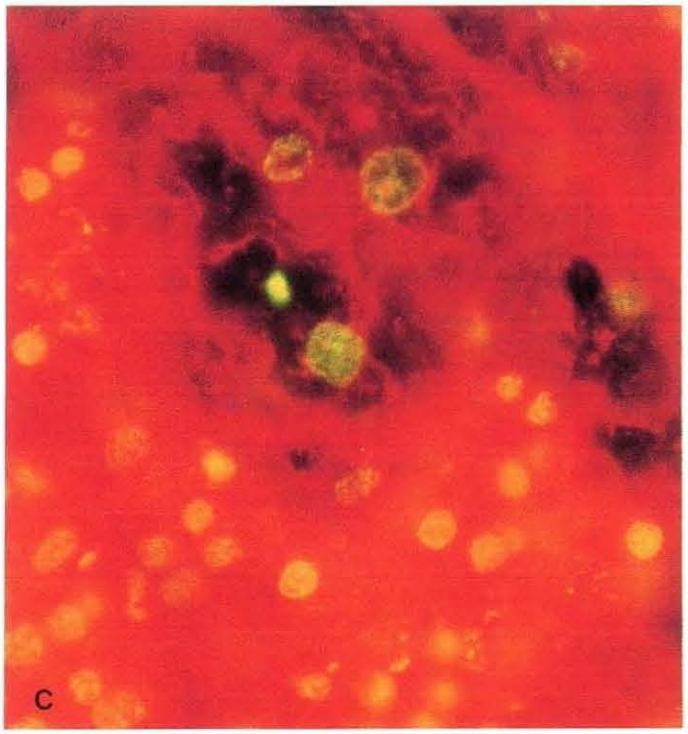


Figure 8 : Huître plate, *Ostrea edulis*. Marquage en IFI avec des anticorps monoclonaux anti-*Bonamia ostreae* (20B2 et 15C2). **A**: Marquage obtenu avec l'anticorps monoclonal 20B2 sur des parasites purifiés cytocentrifugés sur lames et fixés à l'acétone. **B** : Marquage obtenu avec l'anticorps monoclonal 20B2 sur coupe histologique d'un individu fortement infesté par le parasite *Bonamia ostreae*. Fixation des tissus en Davidson. **C** : Marquage obtenu avec l'anticorps monoclonal 15C2 sur coupe histologique d'un individu fortement infecté par le parasite *Bonamia ostreae*. Fixation des tissus en Davidson. Noter le marquage non spécifique intense des noyaux.

CONCLUSION

Conclusion

La recherche d'agents pathogènes chez les mollusques bivalves marins nécessite l'utilisation de techniques histologiques complémentées dans de nombreux cas par la microscopie électronique à transmission. Ces moyens d'étude sont et resteront les outils de base pour la mise en évidence de nouveaux pathogènes. En revanche, dans le cas d'agents inconnus, ceux-ci sont amenés petit à petit à être remplacés par des techniques plus rapides, moins lourdes à mettre en place et permettant de traiter un plus grand nombre d'échantillons. En effet, pendant longtemps, faute de matériels biologiques, les chercheurs ont du se contenter de décrire les différents agents rencontrés chez ces invertébrés. Actuellement, depuis la mise au point de protocole de purification, les pathologistes orientent leurs travaux vers l'étude des constituants cellulaires des agents pathogènes. Cette caractérisation, réalisée par électrophorèse, permettra l'identification de molécules leur appartenant et pouvant être utilisées pour produire des anticorps et/ou des sondes nucléiques. Ces réactifs, après avoir testé leur sensibilités par différentes techniques, pourront être utilisés comme outils de diagnostic et assureront alors le traitement d'une importante quantité d'échantillons en peu de temps.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

ALDERMAN D. J., 1980. Shellfish disease problems - past, present and future. Proc. 11 tha. Conf. Shellf. Ass. Great Britain : 30-40.

ALDERMAN D. J. et GRAS P., 1969. "Gill disease of Portuguese oysters. Nature, Lond., 224 : 616-617.

AUFFRET M., PODER M., 1985. Recherches sur *Marteilia maurini*, parasite de *Mytilus edulis* sur les côtes de Bretagne-Nord. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 47 (1-2) : 105-109.

AZEVEDO C., 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (*Apicomplexa, Perkinsea*) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. J. Parasitol., 75 (4) : 627-635.

BARRY M. M., YEVICH P. P., 1972. Incidence of gonadal cancer in the quahaug *Mercenaria mercenaria*. Oncology, 26 : 87-96.

BUCHANAN J. S., 1978. Cytological studies on a new species of rickettsia found in association with phage in digestive gland of the marine bivalve mollusc, *Tellina tenuis* (da costa). J. Fish. Dis., 1 : 27-43.

BUCHANAN J. S., 1979b. Ultrastructural studies of a rickettsialike organism (with phage) from the digestive gland of the marine bivalve, *Tellina tenuis* (da costa). Haliotis, 8 (1977) : 309-316.

CAHOUR A., 1979. *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. Mar. Fish. Rev., 41 : 19-20.

COMPS M., 1970a. La maladie de branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*, caractéristiques et évolution des altérations, processus de cicatrisation. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 34 (1) : 23-44.

COMPS M., 1970b. Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (*Ostrea edulis* L.) dans le bassin de Marennes. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 40 (2) : 347-349.

COMPS M., 1977. *Marteilia lengehi* n. sp. parasite de l'huître *Crassostrea cucullata* Born. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 40 (2) : 347-349.

COMPS M., 1980. Infections rickettsiennes chez les mollusques bivalves marins. Haliotis, 10 (2) : 39.

COMPS M., 1983a. Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. Thèse de Doctorat d'Etat en Sciences, Université de Montpellier II, p. 128.

COMPS M. et BONAMI J. R., 1977. Infection virale associée à des mortalités chez l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg. C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 285 : 1139-1140.

COMPS M., DUTHOIT J. L., 1976. Infection virale associée à la "maladie des branchies" de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* (LmK.). C. R. Acad. Sci., Paris, Série D, 283 : 1595-1596.

COMPS M., RAIMBAULT R., 1978. Infection rickettsienne de la glande digestive de Donax trunculus. Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit., 281 : 11-12.

COMPS M. et DELTREIL J. P., 1979. Un microorganisme de type rickettsien chez l'huître portugaise *Crassostrea angulata* (Lmk.). C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, Série D, 289 : 169-171.

COMPS M., DUTHOIT J. L., 1979. Infections virales chez les huîtres *Crassostrea angulata* (LmK.) et *Crassostrea gigas* Th., Haliotis, 8 (1977) : 301-308.

COMPS M., CHAGOT D., 1987. Une parasitose nouvelle chez la palourde Ruditapes decussatus L. C. R. Acad. Sci., Paris, Série III, 304 (1) : 41-44.

COMPS M., PICHOT Y., 1991. Fine spore structure of a haplosporidan parasiting *Crassostrea gigas* : taxonomic implications. Dis. Aquat. Org., 11 : 73-77.

COMPS M., GRIZEL H., TIGE G., DUTHOIT J. L., 1975. Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* L. et *Cardium edule* L.. C. R. Acad. Sci., Paris, Série D, 281 : 179-181.

COMPS M., BONAMI J. R., VAGO C., 1977. Mise en évidence d'une infection rickettsienne chez les huîtres. C. R. Acad. Sci., Paris, Série D, 285 : 427-429.

COMPS M., TIGE G., GRIZEL H., 1980. Recherches ultrastructurales sur un protiste parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* L. C. R. Acad. Sci., Paris, Série D, 290 : 383-384.

COMPS M., PICHOT Y., PAPAGIANNI P., 1982. Recherches sur *Marteilia maurini* n. sp. parasite de la moule *Mytilus galloprovincialis* LmK. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 45 : 211-214.

DAVEY J. T., GEE J. M., 1988. *Mytilicola intestinalis*, a copepod parasite of blue mussels. In "Disease processes in marine bivalve molluscs". W. Fisher (éd.). Amer. Fish. Soc., Special publication, 18 : 64-73.

DINAMANI P., HINE P. M., JONES J.B., 1987. Occurence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. Dis. Aquat. Org., 3 : 37-44.

ELSTON R., 1979. Virus-like particles associated with lesions in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). J. Invertebr. Path., 33 : 71-74.

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

FARLEY C. A., 1976. Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve molluscs. Prog. Exp. Tumor. Res., 20 : 283-294.

FARLEY C. A., 1978. Virus and viruslike lesions in marine molluscs. Mar. Fish. Rev., 40 (10) : 18-20.

FARLEY C. A., BANFIELD W. G., KASNIC G., FOSTER W. S., 1972. Oyster Herpes-type virus. Science, 178 : 759-760.

FARLEY C. A., WOLF P. H., ELSTON R. A., 1988. A long term study of "Microcell" disease in oysters with a description of a new genus *Mickrocytos* (g. n.) and the new species, *Mickrocytos mackini* (sp. n.). Fish. Bull., 86 : 581-592.

FURLONG D., SWIFT A., ROIZMAN B., 1972. Arrangement of herpes virus desoxyribonucleic acid in the core. J. Virol. 10 : 1071-1074.

GOGGIN C. L., 1990. *Perkinsus spp.* (Protozoa, Apicomplexa) from tridacnid clams and other molluscs in Australia. Thesis submitted for the degree of Philosophy in the Departement of Parasitology. The University of Queensland, April, 1990, pp. 172.

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J. R., COUSSERANS F., DUTHOIT J. L., LE PENNEC M. A., 1974. Recherches sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit., 240 : 7-30.

GUILLARD R. R. L., 1959. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole, 117 : 258-266.

HARSHBARGER J., CHANG S. C., OTTO S. V., 1977. *Chlamydia* (with phages), *Mycoplasma* and *Rickettsiae* in Chesapeake Bay bivalves. Science, 196 : 666-668.

HARSHBARGER J. C., CHANG S.C., OTTO S.V., 1979. Proliferative disorders in *Crassostrea virginica* and *Mya arenaria* from Chesapeake Bay and intranuclear virus-like inclusion in *Mya arenaria* with germinomas from a Marine oil spill site. Haliotis, 8 (1977) : 243-248.

HASKIN H. H., STRAUBER L. A., MACKIN J. G., 1966. *Minchina nelsoni* n. sp. (*Haplosporida, Haplosporidiidae*) : causative agent of the Delaware Bay oyster epizootic. Science, New York, 153 : 1414-1416.

HASKIN H. H., ANDREWS J. D., 1988. Uncertainties and speculations about the life cycle of the eastern pathogen *Haplosporidium nelsoni* (MSX). Amer. Fish. Soc. Special Publication, 18 : 5-22.

HEWATT W. G. and ANDREWS J.D., 1956. Temperature control experiments on the fungus disease, *Dermocystidium marinum*, of oyster. Proc. natn. Shellfish. Ass., 46 (1955) : 129-133.

HILL B. J., 1976a. Properties of a virus isolated from the bivalve mollusc *Tellina tenuis* (da Costa). In "Wildlife disease",L. A. Page (éd.), Plennum Press, New York : 445-452.

HILL B. J., 1976b. Molluscan viruses : Their occurrence, culture and relationships. Proc. 1st Intern. Colloq. Invertebr. Pathol. (Kingston, Canada) : 25-29.

HINE P. M., WESNEY B., HAY B. E., 1992. Herpes virus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Dis. aquat. Org., 12 : 135-142.

KATKANSKY S. C., DALHLST ROM W. A., WARNER R. W., 1969. Observations on survival and grouth of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California. Calif. Fish. and Game, 55 (1) : 69-74.

KATKANSKY S. C., WARNER R. W., 1970. Sporulation of a haplosporidan in a Pacific oyster (*Crassostrea gigas)* in Humbold Bay, California. J. Fish. Res. Bd. Can., 27 : 1320- 1321.

LAUCKNER G., 1983. Diseases of Mollusca : Bivalvia. In "disease of marine animals" O. Kinne (éd.), Biologique. Université de Paris 6, p. 121.

LE GALL G., CHAGOT D., MIALHE E., GRIZEL H., 1988. Branchial rickettsial-like infection associated with a mass mortality of sea scallop *Pecten maximus*. Dis. aquat. Org., 10 : 139-145.

LEIBOVITZ L., 1989. Chlamydiosis, a newly reported serious disease of larval and postmetamorphic bay scallops *Argopecten irradians* (Lamarck). J. Fish. Dis., 12 : 125-136.

LEIBOVITZ L., ELSTON R., LIPOVSKY V. P., DONALDSON J., 1978. A new disease of larval pacific oyster *Crassostrea gigas*. Sea Grant Reprint Series : 603-615.

LESTER R. J. G., DAVIS G. H. G., 1987. A new Perkinsus species (*Apicomplexa, Perkinsea*) from the abalone *Haliotis tuber*. J. Invert. Pathol., 37 : 181-187.

LEVINE N. D., 1978. Perkinsus gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum *Apicomplexa*. J. Parasit., 64 : 549.

LEVINE N. D., CORLISS J. O., COY F. E. G., DEROUX G., GRAIN G., LOEBLICH A. R., LOM J., LYNN D., MERINFELD E. G., PAGE F.C., POLJANSKY G., SPRAGUE V., VAVRA J., WALLACE F. G., 1980. A newly revised classification of the Protozoa. J. Protozol., 27 (1) : 37-58.

MACKIN J. G., 1956. *Dermocystidium marinum* and salinity. Proc. natn. Shellfish. Ass., 46 (1955) : 116-128.

MACKIN J. G., 1962. Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiania Publications of the Institute of Marine Science University of Texas, 7 : 132-229.

MACKIN J. G., OWEN H. M., COLLIER A., 1950. Preliminary note on the occurence of a new protistan parasite. *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* Gmelin. Science, 111 : 328-329.

MACKIN J. G., WRAY D. A., 1952. Report on the second study of mortality of oysters in Barataria Bay, Louisiana and adjacent areas. Part II. Disease caused by *Dermocystidium marinum.* Texas A. and M. Research Foundation. Project 9, pp. 40.

Mc GLADDERY S. E., CAWTHORN R. J., BRADFORD B. C., 1991. *Perkinsus karlssoni* n. sp. (*Apicomplexa*) in bay scallops *Argopecten irradians*. Dis. aqua. Org., 10 : 127-137.

MEYERS T. R., 1979. Preliminary studies on a chlamydial agent in the digestive divercular epithelium of hard clams, *Mercenaria mercenaria* (L.) from Great South Bay, New-York. J. Fish. Dis., 2 : 179-189.

MEYERS T R., 1981. Endemic diseases of cultured shellfish of Long Island, New-York : adult and juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*). Aquaculture 22 : 305-330.

NICOLAS J. L., COMPS M., COCHENNEC N., 1992. Herpes-like virus infecting pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas.* Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 12 (1) : 11-13.

OPRANDY J. J., CHANG P. W., PRONOVOST A. D., COOPER H. R., BROWN R. S., YATES V. J., 1981. Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria.* J. Invertebr. Path., 38 : 45-51.

OTTO S. V., HARSHBARGER J. C., CHANG S. C., 1975. Chlamydia infections in clams. 1. Incidence, distribution and histopathologie. Society of Invertebrate Pathology, 8 th A. Meet. (Corvalis, Oregon) : p29.

OTTO S. V., HARSHBARGER J. C., CHANG S. C., 1979. Status of selected unicellular eucaryote pathogens, and prevalence and histopathology of inclusions containing obligate procaryote parasite in commercial bivalve molluscs from Malyland estuaries. Haliotis, 8 : 285-295.

PAILLARD C. PERCELAY L., LE PENNEC M., LE PICARD D., 1989. Origine pathogène de "l'anneau brun", chez *Tapes philippinarum* (Mollusque bivalve). C. R. Acad. Sci., Paris, Série III, 309 : 235-241.

PAILLARD C., MAES P., 1990. Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* : pathogénicité d'un Vibrio sp. C. R. Acad. Sci., Paris, Série III, 310 : 15-20.

PERKINS F. O., 1976a. Zoospores of the oyster pathogen *Dermocystidium marinum.* Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. J. Parasit., 62 : 959-974.

PERKINS F.O., 1988. Structure of protistan parasites found in bivalve molluscs. In "Disease processes in marine bivalve molluscs". W. Fisher (éd.) . Amer. Fish. Soc. Special Publication, 18 : 93-111.

PERKINS F. O., WOLF P. H., 1976. Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n., Haplosporidian pathogen of australian oysters. J. Parasitol., 62 : 528-538.

PICHOT Y., COMPS M., DELTREIL J. P., 1979. Recherches sur Haplosporidium sp. (*Haplosporida : Haplosporidiidae*) parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* L. Rev. Inst.Pêches marit., 43 : 131-140.

RENAULT T., COCHENNEC N., LE DEUFF R. M., CHOLLET B., 1994. Herpes-like virus infecting japanese oyster (*Crassostrea gigas).* Spat. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 14 (2) : 64.

ROIZMAN B., 1990. Herpesviridae : a brief introduction. In : Fields. B. N., Knipe, D. M. (eds.). Virology. Raven Press, New-York, pp. 1787-1793.

SPRAGUE V., 1954a. Protozoa. Fish. Bull. Fish. Wildl. Serv. U.S, 89 : 243-256.

TUBIASH H. S., CHANLEY P. E., LEIFSON E., 1966. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenil bivalve molluscs. I. Etiologiy and epizootiology. J. Bact., 90 : 1036-1044.

TUBIASH H. S., COLWELL R. R., SAKAZAKI R., 1970. Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusc. J. Bact., 103 : 271-272.

VAN BANNING P., 1977. *Minchinia armoricana* sp. nov. (*Haplosporida*) a parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. J. Invertebr. Pathol., 30 : 199-206.

VILELA H., 1951. Sporozoaires parasites de la palourde *Tapes decussatus* L. Revta Fac. Ciénc. Univ. Lisb. (Ser. 2C), 1 : 379-386.

VIVARES C. P., BREHELIN M., COUSSERANS F., BONAMI J. R., 1982. Mise en évidence d'une nouvelle Haplosporidie parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* L. C. R. Acad. Sci., Paris, Série III, 295 : 127-130.

YEVICH P. P. et BARSZCZ C. A., 1980. Histopathology as a monitor for marine pollution. Results of the histopathologie examination of the animals collected for the U.S. 1976 mussel watch programm. Int. counc. Explor. Sea, Special Meeting on Disease of commercially Important Marine Fish and Shellfish (Copenhagen, 1980), NO. 56.

WOOD J. L., ANDREWS J. D., 1962. *Haplosporidium costale* (*Sporozoa)* associated with a disease of Virginica oysters. Science, 136 : 710-711.

ANNEXES

ANNEXE 1

Composition des fixateurs.

Carson : formol 10%, NaH_2PO_4 (pH : 7,2-7,4).

- NaH_2PO_4, $2H_2O$	23,8 g.
- NaOH	5,2 g.

A dissoudre dans 900 ml d'eau distillée.

- Formaldéhyde à 40%	100 ml.

Davidson :

- Eau de mer	1200 ml.
- Alcool à 95°	1200 ml.
- Formol	300 ml.
- Glycérol	400 ml.

- Acide acétique cristallisable 10% (ajouter au moment de l'emploi).

ANNEXE 2

Coloration à l'hémalun-éosine.

Réactifs :

Hémalun :

- Hématoxyline	4 g.
- Alcool à 95°	200 ml.
- Potassium aluminium sulfate	11 g.
- Eau distillée	200 ml.
- Glycérol	200 ml.
- Acide acétique	20 ml.
- Iodate de potassium	0,8 g (ou KMnO ; 4,07 g).

Dissoudre séparément l'hématoxyline dans l'alcool, l'alun de potassium dans l'eau distillée. Mélanger les deux solutions puis ajouter les autres constituants dans l'ordre énuméré.

Eosine :

- Eosine	2,5 g.
- Eau courante	250 ml.

Protocole :

- Déparaffinage et réhydratation.	
- Hémalun	1 à 2 min.
- Rincer à l'eau courante	
- Eosine	3 min.
- Rincer à l'eau courante	1 min.
- Ethanol absolu	3 bains de 3 min.
- Xylène	2 bains de 10 min.
- Monter les lames.	

ANNEXE 3

Coloration de Feulgen et Rossenbeck.

Réactif de schiff (pour 100 ml) :

- Dissoudre 1 g de pararosaniline dans 25 ml d'acide chlorydrique 1N.

- Dissoudre 4 g de métabisulfite de sodium (sodium disulfite) dans 75 ml d'eau distillée.

- Mélanger les deux solutions et laisser reposer 24 heures à l'abri de la lumière au réfrigérateur.

- Ajouter 0,3 g de charbon actif, agiter puis filtrer.

Le réactif doit être transparent, se conserve à l'abri de ia lumière et au réfrigérateur. A jeter dès qu'une teinte rose apparaît.

Protocole :

- Déparaffinage et réhydratation des lames.	
- Hydrolyse acide HCl 1N à 60°C	6 min.
- Rincer à l'eau courante	5 min.
- Rincer à l'eau distillée	
- Réactif de Schiff	60 min.
- Rincer à l'eau courante	10 min.
- Ethanol absolu	3 bains de 2 min.
- Xylène	2 bains de 10 min.
- Monter les lames	

ANNEXE 4

Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission.

- Réactifs : (toutes les préparations se conservent au réfrigérateur)

Cacodylate de sodium 0,4 M : 8,6 g dans 100 ml.

Glutaraldéhyde à 3% :

- glutaraldéhyde à 25%	2,5 ml.
- Cacodylate 0,4 M	5 ml.
- NaCl 10%	3,5 ml.
Eau distillée	9 ml.

Tampon cacodylate (pH 7,4 ; 1100 mOsm) :

- Cacodylate 0,4 M	10 ml.
- NaCl 10%	4 ml.
- Eau distillée	6 ml.

Acide osmique à 1% :

- OsO_4 4%	1 vol.
- Cacodylate 0,4 M	1 vol.
- NaCl 10%	1 vol.
- Eau distillée	1 vol.

Mélange Epon :

- Epon 812	3,0 g.
- DDSA	1,5 g.
- MNA	1,5 g.
- DMP 30	0,075 g.

A préparer extemporanément. Agiter et laisser reposer jusqu'à éliminatin des bulles d'air.

- Protocole :

- Fixation :

- Glutaraldéhyde à 3% en tampon cacodylate	30 min.
- Rincer en tampon cacodylate	2 fois 10 min.
- Post-fixation à l'acide osmique à 1% en tampon cacodylate	60 min au réfrigérateur.
- Rincer en tampon cacodylate	2 fois 10 min.

- Déshydratation :

- Alcool à 70°	10 min.
- Alcool à 95°	2 fois 15 min.
- Alcool à 100°	3 fois 20 min.
- Oxyde de propylène	2 fois 15 min.

- Imprégnation :

- Mélange 50% oxyde de propylène-50% Epon	60 min.
- Mélange Epon	60 min.

- Inclusion : placer les pièces dans des moules remplis d'Epon et mettre à l'étuve à 60°C jusqu'à polymérisation.

ANNEXE 5

Coloration des grilles pour la microscopie électronique à transmission.

Réactifs :

- Acétate d'uranyle :

- Solution mère d'acétate d'uranyle à 5% en eau distillée.

- Solution pour contraste : 50% d'acétate d'uranyle à 5%, 50% d'alcool à 50°.

- Citrate de plomb :

- 0,04 g de citrate de plomb dans 10 ml d'eau distillée.

- 0,1 ml de NaOH 10N.

Protocole :

- Acétate d'uranyle	10 min à l'obscurité.
- Rincer à l'alcool à 25°.	
- Rincer à l'eau distillée	
- Sécher sur papier filtre	15 min environ.
- Citrate de plomb	15 min.

- Rincer 2 fois à l'eau distillée et laisser sécher avant observation.

ANNEXE 6

Technique d'immunogold.

- Déposer les coupes sur grilles de nickel.

- Rincer en eau distillée, 30 passages successifs dans une goutte.

- Perméabilisation avec du métapériodate de sodium à 4% en eau distillée (10-15 min en tube Eppendorf).

- Rincer en eau distillée, 2 fois 30 passages dans une goutte.

- Saturation des sites antigéniques en TBS à 1% Régilait (10 min en Eppendorf).

- Incuber avec le premier anticorps dilué en TBS (3 h à température ambiante et à l'obscurité).

- Rincer en TBS, 30 passages dans une goutte.

- Incuber avec le conjugué couplet avec des billes d'or, dilution 1/25ème en TBS (1 h en Eppendorf).

A partir de cette étape les grilles sont manipulées avec des pinces en plastique.

- Rincer en eau distillée, 5 fois 30 passages successifs

- Sécher à l'étuve 40°C (10 min).

- Contraster les coupes.

ANNEXE 7

Préparations des substances et des milieux utilisés en culture cellulaire.

Milieu de culture pour lignée cellulaire BF2 :

- Milieu BHK 21 (GIBCO BRL réf : 22100)	62,6 g.
- Tampon TRIS	5000 ml.
- Sérum de veau foetal	10%.
- Tryptose phosphate (DIFCO réf : 0060)	10%.
- Mélange antibiotiques (Pénicilline G, Streptomycine, Fluméquine)	1%.

Solution de trypsine-EDTA :

- Trypsine	2 g.
- EDTA	0,4 g.
- NaCl	8 g.
- KCl	0,2 g.
- Na_2HPO_4, $12H_2O$	2,77 g.
- KH_2PO_4	0,2 g.
- Eau distillée	1000 ml.

Ajuster le pH à 7,4 ; à conserver à -20°C.

Dakin modifié :

- Eau de javel à 50° de chlore	105 ml.
- $NaHCO_3$	15 ml.
- Sucre	365 g.
- Eau distillée	1,42 l.

Conservation à 4°C.

Milieu de culture pour primoculture d'huître creuse :

- milieu L15 (1,5 fois concentré)	850 ml.
- Sérum de veau foetal	100 ml.
- Hémolymphe d'huître creuse	50 ml.
- Mélange antibiotiques (Pénicilline G, Streptomycine, Fluméquine)	1ml.

ANNEXE 8

Technique d'immunofluorescence indirecte (IFI).

Composition du tampon PBS :

- NaCl	9 g.
- Na_2HPO_4 anhydre	1,48 g.
- KH_2PO_4	0,43 g.
- Eau distillée	1000ml.

Dilution du conjugué (pour 500 µl) :

- Anticorps couplet à l'isothiocyanate de fluorescéine	5 µl.
- Bleu d'evans	5 µl.
- Tampon PBS	490 µl.

Protocole :

- Déparaffinage et hydratation.	
- Traitement des coupes à la Trypsine 0,25% (si nécessaire)	30 min.
- Saturer avec du Régilait à 3% en PBS	30 min.
- Essuyer les lames en contournant les tissus.	
- Incuber avec le premier anticorps en chambre humide à 37°C	60 min.
- Rincer les lames avec du PBS	2 fois 10 min.
- Incuber avec le conjugué (température ambiante)	60 min.
- Rincer les lames avec du PBS	3 fois 10 min.
- Monter les lames en tampon glycériné.	
- Observer au microscope à épifluorescence.	

ANNEXE 9

Technique d'immunoperoxydase.

Solution d'inhibition des péroxydases endogènes :

- Méthanol	200 ml.
- Eau oxygénée	600 µl.

Solution de révélation :

- Diaminobenzidine (DAB)	120 mg.
- Eau oxygénée à 30%	60 µl.
- Tampon PBS	200 ml.

Protocole :

- Déparaffinage et hydratation.	
- Inhibition des péroxydases endogènes	30 min.
- Rincer en PBS	2 fois 10 min.
- Saturer en Régilait à 3%	30 min.
- Incuber avec l'anticorps primaire en chambre humide à 37°C	60 min.
- Rincer en PBS	2 fois 10 min.
- Incuber avec le second anticorps marqué à la péroxydase	60 min.
- Rincer en PBS	3 fois 10 min.
- Révéler l'enzyme	10 min.
- Rincer en PBS	2 fois 10 min.
- Monter les lames.	
- Observer.	

ANNEXE 10

Coloration de Von Kossà.

- Déparaffinage et réhydratation des coupes.	
- Nitrate d'argent à 2-5% dans l'eau distillée (à l'obscurité)	10 min.
- Rincer plusieurs fois à l'eau distillée.	
- Solution aqueuse d'hydroquinone à 0,5% (lumière du jour)	2 min.
- Rincer à l'eau distillée.	
- Thiosulfate de sodium à 0,5%	1 min.
- Rincer à l'eau courante.	
- Coloration de fond au bleu d'aniline	15 s.
- Déshydrater, monter les préparations.	

Les structures contenant des sels insolubles de calcium se colorent en brun.

ANNEXE 11

Milieux de culture de bactériologie.

Lewis base : à diluer au 1/10ème en eau distillée avant emploi

- NaCl	234 g.
- Kcl	15 g.
- $MgSO_4,7H_2O$	12 g.
- $CaCl_2,2H_2O$	1,5 g.
- $CaCl_2$ anhydre	1,5 g.
- Eau distillée	1000 ml.

Autoclaver, conservation à 4°C.

Marine agar : Milieu Difco réf.0979-01.

ZoBell :

- Agar	15 g.
- Extrait de levure	1 g.
- Tryptone	4 g.
- Eau de Lewis	100 ml.

ZMBBT :

- Agar	15 g.
- Extrait de levure	1 g.
- Tryptone	4 g.
- Mannitol	1 g.
- BBT	0,01 g.
- Eau de Lewis	100 ml.

TCBS : Milieu Pasteur réf 69456.

Gélose VF :

- Viande-foie	30 g.
- Glucose	2 g.
- Agar	6 g.
- Eau de Lewis	1000 ml.

MEVAG :

- Extrait de viande	15 g.
- Kcl	3 g.
- NaCl	5 g.
- Agar	3 g.
- Rouge de phénol (0,2%)	20 ml.
- Eau distillée	1000 ml.

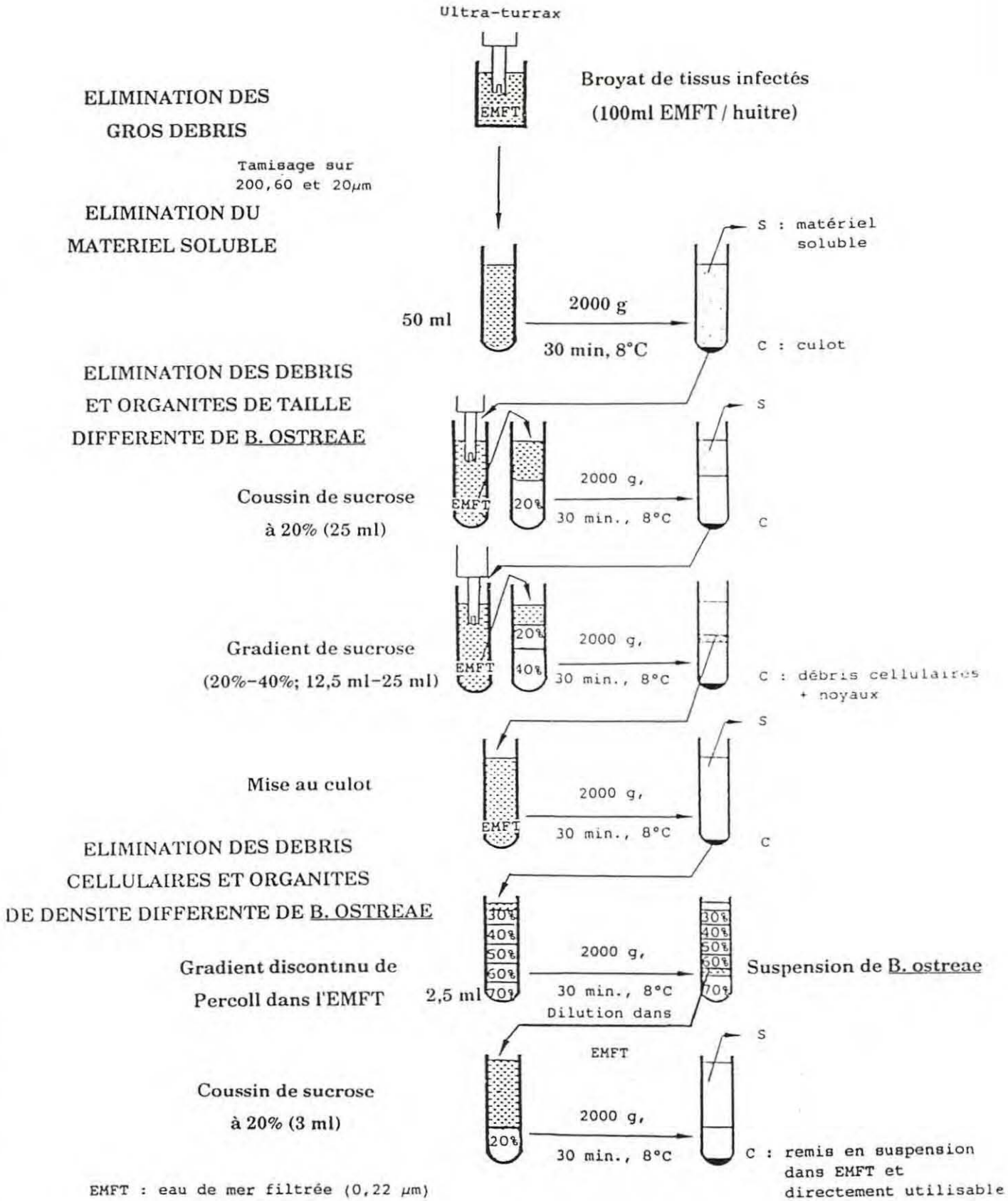
Répartir en tube, autoclaver. Après régénération au bain-marie, rajouter le glucose (filtré sur 0,22 µm) pour cbtenir une contration final de 1%.

ANNEXE 12

Culture bactérienne en microplaque.

A partir d'une solution mère à * % il faut ajouter ** ml à *** ml d'eau de Lewis

Composés carbonés	* Sol mère %	** Qu. sol. ml	*** Qu. Lewis ml	Composés carbonés	* Sol mère %	** Qu. sol. ml	*** Qu. Lewis ml
Xylose	20	0,1	7,5	Benzoate	10	0,1	7,5
Lactose	20	0,1	7,5	Phénol	5	0,1	7,5
Raffinose	20	0,1	7,5	Acétate	10	0,1	7,5
Tréhalose	20	0,1	7,5	Caprilate	10	0,1	7,5
Fructose	20	0,1	7,5	Caprate	10	0,1	7,5
Maltose	20	0,2	7,5	Proprionate	10	0,1	7,5
Galactose	20	0,1	7,5	Butyrate	10	0,1	7,5
Mannose	20	0,1	7,5	Alanine	10	0,1	7,5
Glucose	20	0,1	7,5	Lysine	10	0,1	7,5
Rhamnose	20	0,1	7,5	Arginine	10	0,1	7,5
Saccharose	20	0,1	7,5	Ornithine	10	0,1	7,5
Mélibiose	20	0,1	7,5	Méthionine	2	0,5	7
Arabinose	20	0,1	7,5	Proline	10	0,1	7,5
Ribose	20	0,1	7,5	Phényl-alani	1	1	6,5
Gluconate	20	0,1	7,5	Citrate	10	0,1	7,5
Salicine	3	1	10,25	α-cétogluta.	2	0,5	7
Glycérol	20	0,05	7,5	Pyruvate	10	0,1	7,5
Mannitol	20	0,05	7,5	Méthanol	10	0,1	7,5
Sorbitol	20	0,05	7,5	Ethanol	10	0,1	7,5
Oxalate	3,3	0,3	7,2	Butanol	5	0,2	7,5
Malonate	10	0,1	7,5	Malate	10	0,1	7,5
Succinate	10	0,1	7,5	Tartrate	10	0,1	7,5
Glutarate	10	0,1	7,5	Lactate	10	0,1	7,5
Adipate	10	0,1	7,5	Glycérate	10	0,1	7,5

ANNEXE 13

Purification de *Bonamia ostreae*.