

Sabrina ROUSSEAU

Formation complémentaire POST-BTS/DUT
Lycée St Louis, Bordeaux.

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

CARACTERISATION ENZYMATIQUE
DES HEMOCYTES D'HUITRES PLATES,
OSTREA EDULIS



*Stage encadré par Nathalie COCHENNEC
Au laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie*

IFREMER
B.P 133
17390 La Tremblade

IFREMER

Année 2000-2001

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier André Gérard pour m'avoir accueilli au sein de la station IFREMER de Ronce-les-Bains.

Je remercie également Nathalie sans qui ce stage n'aurait pas eu lieu.

Merci beaucoup pour son encadrement chaleureux, pour ces conseils et ces idées toujours plus nombreuses jours après jours, et également pour ces éclats de rires journaliers.

Merci également à Michel Auffret et à Nedzad Mujdzic pour m'avoir permis de travailler dans leur laboratoire à Brest pendant une semaine.

Un grand merci aussi à tout le personnel de la station, chercheurs, techniciens, administratif, pour leur chaleureux accueil qui m'a permis une intégration facilitée dans la station.

Un remerciement tout particulier «aux jeunes de la station» : Maeva, Gaëlle, Mélanie, Isabelle, Karine, etc. pour les soirées, les repas que l'on a passé ensemble.

Mille mercis à Maeva et à Gaëlle pour leurs blagues, leurs éclats de rires qui rendent vos journées plus ensoleillées.

LISTE DES ABREVIATIONS

BO = *Bonamia ostreae*

°C = degrés Celcius.

CR = croate.

EMFST = eau de mer filtrée stérile – Tween 80.

H = heure.

MED = méditerranéenne.

Min = minute.

QE = quiberon éclosérie.

QW = quiberon sauvage.

1 SOMMAIRE

1	SOMMAIRE.....	1
2	INTRODUCTION.....	3
3	RAPPELS	4
4	MATERIEL ET METHODES	7
4.1	<u>MATÉRIEL :</u>	<u>7</u>
4.1.1	<u>Les échantillons d'huîtres plates : <i>Ostrea edulis</i></u>	<u>7</u>
4.2	<u>MÉTHODES :</u>	<u>8</u>
4.2.1	<u>Préparation hémoctaire :</u>	<u>8</u>
4.2.1.1	Prélèvement d'hémolymphe :	8
4.2.1.2	Apposition cardiaque :	8
4.2.1.3	La cyto centrifugation :	8
4.2.1.4	Colorations :	9
4.2.2	<u>Cytomètre en flux COULTER EPICS XL :</u>	<u>9</u>
4.2.2.1	Présentation du cytomètre :	9
4.2.2.2	Acquisition des données :	10
4.2.3	<u>Dosage des activités enzymatiques :</u>	<u>12</u>
4.2.3.1	Kit « CellProbe » :	12
4.2.3.1.1	« A.Aminopeptidase M » :	12
4.2.3.1.2	« Cathepsine.TP » :	12
4.2.3.1.3	« Gal.Galactosidase » :	12
4.2.3.1.4	« DCFH, PMA. Oxydative Burst » :	13
4.2.3.1.5	« FDA. Esterase » :	13
4.2.3.1.6	Mode d'emploi de ces kits :	14
4.2.3.2	Kit « IO Test myéloperoxydase-PE » :	15
4.2.3.2.1	Le réactif de fixation-perméabilisation :	15
4.2.3.2.2	Myéloperoxydase-PE :	15
4.2.3.2.3	Mode d'emploi :	16
4.2.3.3	Autres type de dosage, Kit « IO Test Mannose receptor-PE » :	16
4.2.4	<u>Purification du parasite <i>Bonamia ostreae</i></u>	<u>17</u>
4.2.5	<u>Infection expérimentale des huîtres :</u>	<u>18</u>
4.2.6	<u>Infection in vitro des hémocytes par le parasite <i>Bonamia ostreae</i> :</u>	<u>18</u>
4.2.7	<u>Marquage du parasite :</u>	<u>19</u>
4.2.8	<u>Fixation du parasite :</u>	<u>19</u>
5	RESULTATS DISCUSSION	20
5.1	<u>ANALYSE DE POPULATIONS D'ORIGINES GÉOGRAPHIQUES DIFFÉRENTES À L'AIDE DES INDICATEURS ENZYMATIQUES :</u>	<u>20</u>

5.1.1	<i>Activité estérase :</i>	22
5.1.2	<i>Activité du mécanisme oxydatif :</i>	24
5.2	ANALYSE DES POPULATIONS D'ORIGINES GÉOGRAPHIQUES DIFFÉRENTES MAINTENUES À 10°C À L'AIDE DES INDICATEURS ENZYMATIQUES :	25
5.2.1	<i>Activité estérase :</i>	26
5.2.2	<i>Activité oxydative burst :</i>	27
5.3	ANALYSE DE POPULATIONS D'ORIGINES GÉOGRAPHIQUES DIFFÉRENTES MAINTENUES À 20° C À L'AIDE DES INDICATEURS ENZYMATIQUES :	28
5.3.1	<i>Activité estérase :</i>	29
5.3.2	<i>Activité du mécanisme oxydatif :</i>	30
5.4	ANALYSE DES GÉNITEURS SENSIBLES ET RÉSISTANTS À LA BONAMIOSE À L'AIDE DES INDICATEURS ENZYMATIQUES :	31
5.4.1	<i>Répartition cellulaire :</i>	32
5.4.2	<i>Activité estérase :</i>	33
5.4.3	<i>Activité du mécanisme oxydatif :</i>	34
5.4.4	<i>Phagocytose de billes calibrées :</i>	35
5.5	ETUDE DE LA PHAGOCYTOSE DU PARASITE BONAMIA OSTREAE IN VITRO :	36
5.5.1	<i>Expérience réalisée sur les populations d'origines géographiques diverses :</i>	36
5.5.2	<i>Comparaison de la phagocytose de billes et du parasite Bonamia ostreae :</i>	36
5.5.3	<i>Etude des indicateurs enzymatiques des hémocytes après phagocytose du parasite :</i>	37
5.5.3.1	<i>Activité estérase :</i>	37
5.5.3.2	<i>Activité du mécanisme oxydatif :</i>	38
5.6	ETUDE DES INDICATEURS ENZYMATIQUES DES HÉMOCYTES APRÈS PHAGOCYTOSE DE PARASITES MORTS, DE PARASITES VIVANTS :	39
5.6.1	<i>Etude comparative de la phagocytose de billes calibrées, de parasites morts et de parasites vivants.</i>	39
5.6.1.1	<i>Activité estérase :</i>	40
5.6.1.2	<i>Activité du mécanisme oxydatif :</i>	41
5.7	ETUDE DE NOUVEAUX MARQUEURS FONCTIONNELS POUR CARACTÉRISER LES POPULATIONS HÉMOCYTAIRES :	42
5.7.1	<i>Dosage des enzymes de type cathepsine :</i>	42
5.7.2	<i>Dosage des enzymes de type aminopeptidase :</i>	43
5.7.3	<i>Dosage des enzymes de type galactosidase :</i>	43
5.7.4	<i>Dosage des enzymes de type myéloperoxidase :</i>	44
5.7.5	<i>Dosage des récepteurs de type mannose :</i>	44
6	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	46
7	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	48
8	ANNEXES	49

2 INTRODUCTION

Depuis la fin des années soixante, la conchyliculture française doit faire face à des mortalités importantes d'huîtres plates, *Ostrea edulis*, causées entre autres, par le protozoaire, *Bonamia ostreae*, responsable de la bonamiose. Peu de moyens sont à la disposition des professionnels, vis-à-vis de cette maladie, pour protéger ces animaux élevés en milieu ouvert.

Pour combattre la bonamiose et tenter d'apporter des solutions aux conchyliculteurs, IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER) a développé un programme de sélection pour obtenir des animaux résistants. Ces derniers sont obtenus en exerçant une pression de sélection par inoculation de parasites purifiés dans la cavité péricardique d'animaux anesthésiés. Ce processus se faisant sans connaissances exactes du phénomène de résistance, l'étude des mécanismes cellulaires impliqués semble indispensable. Ainsi, les hémocytes de l'huître plate, *Ostrea edulis*, qui sont à la fois les cellules cibles des parasites et les cellules impliquées dans les mécanismes de défense chez les bivalves sont étudiés.

Toutes ces expériences ont été réalisées en utilisant un cytomètre en flux (Beckman-Coulter)

Pendant ce stage, nous avons utilisé les deux marqueurs enzymatiques mis au point l'année dernière (Sandrine Garcia, 2000), pour étudier des populations d'origines géographiques diverses. Celles-ci ont été mises à trois températures différentes afin de voir si les conditions du milieu extérieur (eau de mer) influencent les activités enzymatiques des hémocytes.

Ces deux marqueurs ont également été utilisés pour l'étude des géniteurs sensibles et des géniteurs résistants à la bonamiose. Cette expérience permettra peut-être de voir l'existence d'une concordance entre une activité enzymatique donnée et la résistance accrue au parasite *Bonamia ostreae*.

Par ailleurs, des hémocytes provenant d'animaux sains ont été infectés, *in vitro*, par différentes concentrations de parasites. La réaction des hémocytes face aux différents taux d'infection a été étudiée en utilisant le marqueur estérase et l'activité du mécanisme oxydatif. Enfin pour essayer de compléter la caractérisation déjà entreprise des types hémocytaires, une recherche d'autres marqueurs a été effectuée.

3 RAPPELS

1. L'OSTREICULTURE FRANÇAISE :

L'huître plate, *Ostrea edulis*, est consommée depuis longtemps en France. En effet, c'est au milieu du XIX^{ème} siècle que l'ostréiculture est née, grâce aux essais de captage effectués par Coste (1861). Au même moment, pour faire face à une pénurie d'huîtres plates, des huîtres creuses, *Crassostrea angulata*, furent importées du Portugal. Au cours de leur transport, une tempête provoqua leur dissémination dans l'embouchure de la Gironde. Cette espèce proliféra rapidement, et très vite, elle colonisa les bancs de l'estuaire de la Gironde (1873), de Marennes, d'Oléron et de l'estuaire de la Charente, ceux de La Rochelle et de l'île de Ré, puis les côtes du sud de la Vendée quelques années plus tard. La compétition entre les deux espèces ne fut pas favorable à l'huître plate, *Ostrea edulis*.

A la suite de mortalités massives entre 1967 et 1973, l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, disparut du littoral français (implication de virus). L'importation de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, originaire du Pacifique, a alors permis de démarrer une nouvelle production d'huîtres en 1967. Parallèlement, la production d'huîtres plates, *Ostrea edulis*, de 1970 à nos jours, a chuté de façon importante suite à l'apparition de deux maladies : la marteillose (causée par *Marteilia refringens*) à partir de 1968 et la bonamiose (causée par *Bonamia ostreae*) à partir de 1979. Cette dernière pathologie s'est très rapidement propagée à l'ensemble des centres d'élevage français, faisant chuter la production annuelle de 20 000 à 1500 tonnes.

Actuellement, une reprise de la culture de l'huître plate est souhaitée par les conchyliculteurs, car la valeur économique de cette espèce est nettement supérieure à celle de l'huître creuse. Même si cette dernière a une bien meilleure production ; de 150 000 tonnes en 1997 contre 2500 pour l'huître plate. La production de l'huître plate semble reprendre doucement.

2. LE PARASITE PROTOZAIRE *BONAMIA OSTREAE* :

C'est en 1979, à la suite de fortes mortalités d'huîtres plates, *Ostrea edulis*, sur l'île Tudy en Bretagne, que Comps *et al.* (1980), ont mis en évidence un nouveau protozoaire,

Bonamia ostreae, parasite intracellulaire des hémocytes. Très vite, la présence de ce parasite a été décrite dans tous les centres ostréicoles français, puis européens. On le retrouve aussi en Nouvelle-Zélande et aux Etats-Unis.

Il apparaît sur coupes histologiques de tissus d'huîtres observés en microscopie photonique, comme de petites inclusions de deux ou trois μm de diamètre. Il induit parfois une ulcération des branchies avec des indentations. Il affecte essentiellement les huîtres âgées de plus de deux ans. Et il provoque des mortalités entre 50 et 80 %.

L'impossibilité à l'heure actuelle de cultiver *in vitro* ce parasite rend son étude difficile. Il a été nécessaire de mettre au point un protocole de purification de celui-ci (Cochennec, 1997). Cette technique a permis de mettre en place un programme de sélection, dont le principe est basé sur l'inoculation de parasites purifiés afin d'obtenir des huîtres résistantes (pression de sélection).

3.LES MECANISMES DE DEFENSE CHEZ LES MOLLUSQUES :

Pour protéger les mollusques vis-à-vis des parasites ou des maladies, peu de moyens existent. En effet, les traitements pour ces derniers, élevés en pleine mer, posent des problèmes de quantité de substances à utiliser mais aussi de fortes probabilités de recontamination. De plus, l'absence de lymphocytes B et T associée à l'absence de production d'anticorps rend la vaccination de ces animaux impossible.

Leur système de défense est essentiellement basé sur une réponse cellulaire assurée par les hémocytes, cellules véhiculées par l'hémolymphe dans un système circulatoire semi-ouvert qui les met en contact avec tous les tissus conjonctifs. De multiples critères de caractérisation existant (taille, forme, rapport nucléocytoplasmique, affinités tinctoriales et présence d'organites observés en microscopie électronique à transmission), plusieurs classifications des hémocytes ont été décrites et discutées. Néanmoins, le schéma général proposé par Cheng (1981), pour classer les hémocytes en deux grandes catégories : granulocytes et agranulocytes, a été retenu.

Leurs rôles sont variés ; ils jouent un rôle de transport du calcium et des protéines nécessaires à la réparation de la coquille et interviennent aussi dans la cicatrisation des blessures (Lorteau *et al.*, 1995). Ils permettent également le transport et la digestion des nutriments et excréments. Mais, leur rôle principal, est la défense contre les particules étrangères assurée essentiellement par la phagocytose ou l'encapsulation (quand les particules sont trop grosses).

En ce qui concerne les types d'hémocytes impliqués dans les phénomènes de phagocytose, malgré multiples controverses, Brereton et Alderman (1979) considèrent que les agranulocytes à activité phagocytaire sont peut être des granulocytes ayant perdu leur granules. Par contre, en réponse à certaines agressions, la réaction hémocytaire d'intensité et d'évolution variable, fait intervenir les granulocytes (Auffret, 1986).

4 MATERIEL ET METHODES

4.1 MATERIEL :

4.1.1 Les échantillons d'huîtres plates : *Ostrea edulis*

Les huîtres utilisées pendant ce stage sont âgées de 2 ans et sont d'origines diverses.

•Huîtres plates sauvages de Quiberon :

Elles sont récoltées quelques mois avant expérience dans la baie de Quiberon et sont maintenues en salle de quarantaine au laboratoire IFREMER de Ronce-les-Bains.

Elles ont servi pour la mise au point de l'analyse de certaines activités enzymatiques (myéloperoxidase, mannose-receptor).

•Huîtres d'origine diverses :

Elles ont diverses origines : Croatie, Méditerranée, Quiberon (**cf. annexe 1**).

Elles sont issues de reproducteurs sauvages, et correspondent à la troisième génération. Nous étudions quatre populations différentes : huîtres croates, méditerranéennes, quiberons sauvages et quiberons écloséries.

Trois lots de chacune des quatre populations ont été étudiés (huîtres croates, méditerranéennes, quiberons sauvages et quiberons écloséries), des conditions de température différentes leur ont été appliquées :

- un lot a été maintenu à la température du laboratoire (environ 15°C).
- un autre a été maintenu pendant 1 mois à 10°C
- le dernier a été maintenu pendant 1 mois à 20°C

•Le parasite de l'huître plate : *Bonamia ostreae*

Il est obtenu après purification réalisée à partir d'huîtres plates fortement parasitées. Le protocole de purification est décrit au paragraphe 4.2.4.

4.2 METHODES :

4.2.1 Préparation hémostaïque :

4.2.1.1 Prélèvement d'hémolymphe :

Après ouverture de l'huître par la charnière pour ne pas abîmer la membrane péricardique, l'hémolymphe est prélevé directement dans la cavité péricardique à l'aide d'une seringue stérile munie d'une aiguille contenant 300µL de PBS 1100 mOsm (NaCl = 29,454g ; Na₂HPO₄ anhydre = 1,48g ; KH₂PO₄ = 0,43g ; H₂O distillée = 1000ml) (cf. annexe 2).

4.2.1.2 Apposition cardiaque :

Elle permet de vérifier l'état d'infection de l'huître plate par le parasite *Bonamia ostreae* (l'huître creuse étant naturellement résistante à ce parasite).

Après ouverture précautionneuse de l'huître, le ventricule est prélevé puis essoré sur un papier filtre. Une série d'apposition est alors effectuée sur une lame histologique. La lame est ensuite colorée puis observée au microscope photonique (x1000).

4.2.1.3 La cyto-centrifugation :

Cette technique permet de déposer les hémostaies sur une lame histologique à la suite d'une centrifugation à 500 tours pendant une minute à l'aide d'une centrifugeuse 16R (Hettich).

La préparation est colorée grâce aux techniques citées ci-dessous.

4.2.1.4 Colorations :

On peut utiliser deux techniques de coloration qui servent aussi bien à colorer les appositions cardiaques que les préparations cyto centrifugées.

- **La coloration de May-Grünwald-Giemsa :**

C'est une coloration qui se fait directement sur les lames. Elle consiste à mettre 1 ml de May-Grünwald, de le laisser agir pendant 5min puis de rajouter 1 ml d'eau neutre (pH = 7) avec un temps d'incubation égal au premier. Enfin, les lames sont égouttées et 1ml de Giemsa dilué au 30^{ème} est ajouté sur les lames, le temps d'incubation sera de 15min. La lame est ensuite lavée à l'eau courante puis observée au microscope photonique.

- **Kit hémacolor (MERCK) :**

C'est une variante de la coloration au May-Grünwald-Giemsa. Elle consiste en trois bains successifs de quelques secondes dans une solution de méthanol permettant de fixer les cellules, dans une solution A colorant les éléments acidophiles en rouge, soit essentiellement le noyau, puis dans une solution B colorant les éléments basophiles en bleu, soit principalement le cytoplasme. Après rinçage à l'eau courante, et séchage à l'air, les lames sont montées avec une lamelle en utilisant l'Eukitt.

4.2.2 Cytomètre en flux COULTER EPICS XL :

4.2.2.1 Présentation du cytomètre :

Le COULTER XL est composé de trois parties : **(cf. annexe 3)**

- Le cytomètre qui permet le passage physique de l'échantillon dans la chambre d'analyse et le recueil des signaux lumineux de diffraction et de fluorescence.
- Le poste informatique qui gère l'ensemble des signaux issus du cytomètre et qui permet le traitement des données.
- L'alimentation pneumatique et électrique qui renferme les alimentations électriques du laser et du cytomètre ainsi que le compresseur nécessaire aux circuits pneumatiques.

Le trajet optique :

La partie optique de l'appareil comprend le laser, la chambre d'analyse, les filtres, les miroirs dichroïques et les détecteurs.

La chambre d'analyse est une cellule de mesure, dans laquelle les cellules défilent une à une devant le faisceau laser. Lorsqu'un élément traverse le laser, il diffuse la lumière et émet des signaux de fluorescence en fonction des sondes utilisées.

Le cytomètre EPICS XL est équipé de 10 filtres permettant l'analyse simultanée de 4 fluorochromes. Les paramètres accessibles sur ce cytomètre sont donc au nombre de six : FS (taille des cellules), SS (complexité des cellules), FL1, FL2, FL3, FL4.

4.2.2.2 Acquisition des données :

Un préchauffage du laser d'environ 20 min et une acquisition de réactif fluorescent spécifique est nécessaire à chaque utilisation du cytomètre. Ce réactif facilite les réglages automatiques et vérifie le bon fonctionnement du système. En ce qui nous concerne, il est composé de billes fluorescentes Flow-Check permettant de vérifier le bon alignement du laser et la stabilité de la fluidique.

L'automate compte, pour chaque analyse, 10 000 cellules passant une à une dans un faisceau excitateur (laser d'argon 488 nm). Ces cellules émettent alors plusieurs signaux :

La diffraction du laser : FS et SS (cf. annexe 3).

Ces 2 premiers signaux sont recueillis sur des détecteurs situés dans la première partie du banc optique.

•FS :

La quantité de lumière diffractée dans l'axe du faisceau laser, également appelée diffraction aux petits angles est proportionnelle à la **taille des événements mesurés.**

•SS :

La lumière diffractée à 90°C par rapport à l'axe du laser, également appelée diffraction aux grands angles, donne **une information sur la granularité, la structure interne, le rapport nucléocytoplasmique des éléments analysés.**

Les fluorescences :

Elles sont mesurées aux grands angles.

Des miroirs dichroïques «LONG PASS» (inclinés à 45°) ont la propriété de réfléchir à 90° les longueurs d'onde inférieures à une valeur donnée, et de transmettre les longueurs d'onde supérieures à cette valeur.

La lumière réfléchie à 90° traverse un miroir «Band-pass» qui ne transmet que les longueurs d'onde comprises dans une fourchette étroite.

Dénomination des signaux	Fluorochromes détectés	Longueurs d'onde en nanomètre sélectionnées par les filtres
FL1	FITC (isothiocyanate de fluorescéine) DiOC₁₈ (3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine) FDA (diacétate de fluorescéine) DCF (dichlorofluorescéine)	500 à 550
FL2	PE (phycoérythrine)	550 à 600
FL3	IP (iodure de propidium)	600 à 650

Tableau 1 : Les signaux détectés par le cytomètre.

L'intensité de fluorescence mesurée est fonction du nombre de molécules fluorescentes fixées à la cellule. L'unité informatique convertit et numérise les signaux optiques en signaux électriques proportionnels. C'est ainsi que des histogrammes représentant l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cellules sont obtenus.

Un autre type de graphique est utilisé, il représente la complexité des cellules en fonction de leur taille. Un nuage de point est ainsi visualisé où chaque point représente une cellule.

Divers réglages (gain et voltage) peuvent être adoptés afin de mieux visualiser les différentes populations d'hémocytes. Les réglages utilisés sont les mêmes tout le long de ce stage pour permettre la comparaison de l'ensemble des résultats obtenus.

4.2.3 Dosage des activités enzymatiques :

Les enzymes détectées sont des enzymes intracellulaires impliquées dans les mécanismes de défense post - phagocytaire de l'huître plate.

4.2.3.1 Kit « CellProbe » :

4.2.3.1.1 « A.Aminopeptidase M » :

Ala-Rho-110 est le substrat de l'aminopeptidase M. Les aminopeptidases constituent un groupe d'enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques du côté N-terminal des polypeptides.

L'aminopeptidase M a été identifiée grâce au marqueur de surface : le CD13. Elle peut avoir un rôle dans la régulation des cellules myéloïdes.

On observe une augmentation de l'inhibition de l'aminopeptidase M dans différents procédés tel que la phagocytose, les réponses immunitaires contre un antigène et contre des stimuli de cellules tumorales.

4.2.3.1.2 « Cathepsine.TP » :

Thr-pro-Rho-110 est identifié comme un substrat pour la cathepsine C mais aussi pour la cathepsine G. La cathepsine C (dipeptidyl-peptidase I, DPPI) est une cystéine peptidase lysosomiale qui se trouve en abondance dans les cellules cytotoxiques.

La cathepsine G est une serine endopeptidase qui est un composant majoritaire des granules azurophiles des leucocytes. Le taux de cathepsine G active est élevé dans les promonocytes mais diminué dans les monocytes matures.

4.2.3.1.3 « Gal.Galactosidase » :

La di-galactopyranoside fluoresceine est un substrat pour les galactosidases qui sont des enzymes lysosomiales. Elles coupent les résidus des sucres terminaux pour différents substrats physiologiques, y compris pour les glycoprotéines.

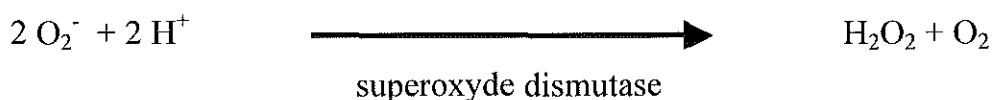
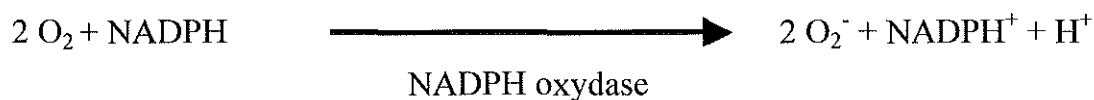
La Galactosidase contenu dans ce substrat, est hydrolysée à la fois par la α -galactosidase et la β -galactosidase.

4.2.3.1.4 « DCFH, PMA. Oxydative Burst » :

La conversion du dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) non fluorescent en un composé hautement fluorescent, le 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) peut être utilisé pour mettre en évidence la réaction de la flambée oxydative dans les leucocytes polynucléaires. Les enzymes responsables de cette flambée oxydative sont rapidement activées lors de la stimulation des neutrophiles.

DCFH, PMA. Oxydative Burst contient un composant, le phorbol myristate acetate (PMA). Ce composant est un analogue du diacétylglycérol (DAG), sa présence active la réaction de flambée oxydative de la cellule.

Pendant la flambée oxydative, les enzymes cellulaires la NADPH oxydase et la superoxyde dismutase produisent l'anion superoxyde (O_2^-) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) suivant les réactions ci-après :



Quand la myéloperoxydase est présente, le DCFH-DA est hydrolysé en DCF en présence de peroxyde d'hydrogène.

La fluorescence mesurée en FL1 est donc directement liée à la quantité de peroxyde d'hydrogène présent dans le milieu et à la présence de l'enzyme, la peroxydase.

4.2.3.1.5 « FDA. Esterase » :

La fluoresceine diacetate est un substrat de nombreuses estérases non spécifiques.

La sonde est hydrolysée par les estérases présentes en un groupe non fluorescent et en un composé fluorescent qui peut être analysé par cytométrie en flux en FL1.



4.2.3.1.6 Mode d'emploi de ces kits :

Tout d'abord, l'hémolymphe des huîtres est prélevée par ponction dans la cavité cardiaque puis analysée aussitôt par une première acquisition correspondant à la taille des cellules en fonction de leur complexité (FS/SS). En parallèle, des appositions cardiaques sont réalisées afin de connaître l'état de parasitisme des huîtres. L'hémolymphe des huîtres parasitées ne sera pas utilisée pour la mise au point technique des tests.

Les tests sont ensuite réalisés soit en individuel pour les techniques déjà mises au point, soit en pool pour les techniques à mettre au point. Le fait de regrouper les hémolymphe en pool permet de récupérer une quantité d'hémocytes importante pour la technique mais aussi permet de lisser les variations individuelles.

Le nuage de point obtenu en FS/SS lors de l'acquisition au cytomètre en flux du pool est alors représentatif de la population étudiée.

Ces analyses requièrent un volume d'hémolymphe de 200 μl auxquels 25 μl d'enzymes sont ajoutés, dans des tubes eppendorfs préalablement chauffés dans un bain-marie à 37°C.

Le tout est incubé 10 min à 37°C pour activer la réaction enzymatique, puis 10 min à 4°C. Ensuite, ces mélanges réactionnels sont transférés dans des tubes spéciaux adaptés pour le cytomètre COULTER contenant 100 μl de PBS 1100 mOsm (ceci pour avoir un volume suffisant lors de l'acquisition).

Sur les graphes représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence, les hémocytes ayant une réponse fluorescente au-delà de 10^0 , sont considérés comme possédant l'activité enzymatique étudiée. Ceux-ci peuvent être sélectionnés manuellement afin de réaliser les analyses statistiques.

4.2.3.2 Kit « IO Test myéloperoxydase-PE » :

Pour certaines de ces techniques, il est nécessaire de réaliser une fixation cellulaire et une perméabilisation de la membrane cytoplasmique des cellules fixées.

4.2.3.2.1 Le réactif de fixation-perméabilisation :

L'IntraPrep Permeabilization Reagent est constitué d'un ensemble de réactifs qui rend accessible les antigènes intracellulaires et qui permet le phénotypage immun (cytoplasmique et nucléaire) des leucocytes humains. Ce réactif crée une ouverture membranaire sans affecter la morphologie de la cellule et ainsi préserve ses caractéristiques de diffusion de la lumière lors de passage dans le cytomètre en flux. IntraPrep Pemeabilization Reagent permettre un marquage simultané des antigènes surfaces et des antigènes intracellulaires.

Ce réactif est indispensable pour la recherche des enzymes de type myéloperoxydase qui sont des enzymes intracellulaires recherchée à l'aide d'un anticorps monoclonal.

4.2.3.2.2 Myéloperoxydase-PE :

La myéloperoxydase est une glycoprotéine hétérodimérique de 150 kDa avec une structure α_2/β_2 . Ces deux sous - unités ont une taille moléculaire respective de 55 et de 15 kDa.

La synthèse de la MPO survient dans la moelle osseuse au stade précoce de la différenciation de la lignée myéloïde. La MPO est stockée dans les granules des polynucléaires neutrophiles et dans les macrophages, mais n'est pas exprimée dans les lymphocytes, les plaquettes et les érythrocytes.

La MPO agit comme un agent acidifiant puissant, il catalyse la formation d'acide hypochlorique (HOCl) en présence d'hydroxyde d'oxygénée (H_2O_2). La MPO intracellulaire peut aussi aider à la protection de l'ADN contre les dommages causés par la production des radicaux oxygénés durant la maturation et le fonctionnement cellulaire.

L'anticorps monoclonal CLB-MPO-1 reconnaît la myéloperoxydase intracellulaire humaine et le précurseur de la MPO (proMPO) qui est la forme inactive de l'enzyme.

L'anticorps est couplé à la phycoérythrine, c'est donc en FL2 que la fluorescence des cellules peut être visualisée.

4.2.3.2.3 Mode d'emploi :

Pour cette expérience, un volume de 200 µl d'hémolymphe est nécessaire, auxquels un volume de 200 µl de IntraPrep Reagent 1 est ajouté. Le mélange est incubé 15 min à température ambiante dans le noir. L'expérience est réalisée en tube eppendorf. Ensuite, 1 ml de PBS filtré (à 0,22µm) est ajouté au mélange, le tout est centrifugé 5 min à 300 g. Cette étape permet de fixer les cellules.

Sur le culot, sont ajoutés 100µl d'IntraPrep Reagent 2, le mélange est incubé 5 min à température ambiante dans le noir. Cette étape consiste en la perméabilisation de la cellule. 20 µl d'anticorps CLB-MPO-1 sont ajoutés à ce mélange. Cette solution contenant l'anticorps est incubé 2 h dans le noir, à température ambiante. Une nouvelle centrifugation est réalisée (5 min, 300 g), le culot est repris dans 250 µl de PBS filtré, puis transféré dans un tube pour cytomètre.

4.2.3.3 Autres type de dosage. Kit « IO Test Mannose receptor-PE » :

Le récepteur mannose est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 175 kDa avec une structure servant de récepteur pour plusieurs lectines.

Le récepteur mannose est détecté sur les macrophages, sur les cellules dendritiques immatures et sur de nombreuses autres cellules. Par contre, il est absent des lymphocytes et des monocytes, il est surexprimé sur les monocytes durant leur différenciation en macrophages.

Mode d'emploi :

L'hémolymphe est prélevée par ponction péricardique. Cette analyse requière 200 µl d'hémolymphe auxquels 20 µl de réactif sont ajoutés. Ce mélange est incubé de 1H00 à 2H00 température ambiante, dans le noir. Afin d'avoir un volume suffisant lors de l'acquisition, 100 µl de PSB 1100 mOsm sont ajoutés à cette solution.

4.2.4 Purification du parasite *Bonamia ostreae*

Le protocole utilisé a été établi par Mialhe *et al.* (1988), et modifié par Hervio *et al.* (1995).

Pour obtenir un bon rendement de purification, il est nécessaire de disposer de deux ou trois huîtres fortement parasitées (diagnostique effectué par apposition cardiaque), c'est-à-dire des animaux considérés comme +++ ou ++.

Le système circulatoire des huîtres étant semi-ouvert, les hémocytes sont disséminés dans différents organes. Le corps entier de l'animal est donc utilisé pour la purification à l'exception du muscle adducteur dont la nature fibreuse empêche une homogénéisation correcte des tissus.

Les tissus infectés sont lavés avec de l'eau de mer filtrée stérile, additionnée de détergent, le tween 80, à la concentration finale de 1 % (EMFST). Broyés à l'ultrat urax, les tissus sont ensuite filtrés sur des toiles de porosité décroissante (100, 60, 20 μm) afin d'éliminer les débris fibreux. Le filtrat ainsi obtenu est ensuite centrifugé (3500 rpm, 9°C, 30 min) à la centrifugeuse Beckman J6/ME. Le culot est repris dans un petit volume d'EMFST, puis à nouveau broyer à l'homogénéisateur. Les parasites et les éléments particuliers présents dans le culot sont séparés par une centrifugation différentielle (3500 rpm, 9°C, 30min) dans une solution de sucrose 20% (p/p dans de l'EMFST) qui concentre les parasites mais aussi des cellules non dissociées et des débris cellulaires.

Ces contaminants sont éliminés par une nouvelle centrifugation sur un gradient discontinu de sucrose (20-40% p/p dans de l'EMFST). Les parasites sont prélevés à l'interface 20-40% à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille rodée, et sont dilués lentement avec de l'EMFST afin d'éviter un choc osmotique. Ils sont ensuite lavés dans de l'EMFST (volume à volume), puis remis en culot par une centrifugation (3500 rpm, 9°C, 30 min). Le culot obtenu est repris en EMFST, puis déposé sur un gradient discontinu de Percoll en EMFST de 30 % à 70 % (2,5 ml de chaque fraction de Percoll 30, 40, 50, 60, 70 %). Deux interfaces (50 % - 60 % et 602 % - 70 %), contenant une suspension de *Bonamia ostreae* sont obtenues après une nouvelle centrifugation. Prélevée, lavée en EMFST, la suspension de parasites est remis en suspension en EMFST, puis recentrifugé. Le culot est repris dans 1 ml d'EMFST.

La numération des parasites ainsi purifiés est réalisée à l'hématimètre de Malassez.

4.2.5 Infection expérimentale des huîtres :

Les huîtres sont anesthésiées dans une solution de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) à 5 % dans un mélange eau de mer filtrée - eau douce (volume à volume). Cette solution après quelques heures de contact, permet l'ouverture des valves sans tronçonner préalablement la coquille. Cette anesthésie permet d'inoculer la suspension de parasites purifiés directement dans la cavité péricardique des animaux (Hervio *et al.*, 1995).

Après inoculation, les animaux sont replacés dans de l'eau de mer, sans chlorure de magnésium. Ils récupèrent complètement après 2 ou 3 heures d'immersion.

Pour l'expérience de cytologie comparative d'huîtres sélectionnées et témoins, une vingtaine d'huîtres de chaque groupe : quiberons écloseries, quiberons sauvages, croates écloseries, méditerranéennes écloseries, ont subi une inoculation par injection de 100 000 parasites purifiés, sous un volume de 50 μ l d'eau de mer filtrée, stérile, dans la cavité péricardique. L'inoculum est injecté à l'aide d'une seringue stérile de 1 ml munie d'une aiguille (0,9 x 40mm).

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

4.2.6 Infection *in vitro* des hémocytes par le parasite *Bonamia ostreae* :

Le parasite, après purification, est remis en suspension dans de l'EMFST. Environ 10 à 30 parasites par hémocyte sont distribués soit dans des tubes pour le cytomètre, soit dans les puits d'une plaque ELISA.

Après 12 H d'incubation à 15°C, 100 μ l de PBS filtré sont ajoutés dans chaque tubes qui sont ensuite passés au cytomètre.

Les parasites utilisés peuvent être vivants, morts, marqués ou non marqués.

4.2.7 Marquage du parasite :

Pour pouvoir observer la phagocytose de *Bonamia ostreae*, il est nécessaire que ce dernier soit marqué. Pour cela nous utilisons du DIOC 6 à raison de 50 μ l à 100 μ M pour 1 ml de suspension parasitaire.

Le DIOC 6 est un marqueur de la différence de potentiel membranaire (donc un marqueur de cellules vivantes).

4.2.8 Fixation du parasite :

Nous avons utilisé le réactif de fixation IntraPrep à raison de 200 μ l de réactif pour 200 μ l de suspension parasitaire.

5 RESULTATS DISCUSSION

L'année dernière, différentes analyses en cytométrie en flux ont été utilisées pour essayer de différencier les trois populations hématocytaires décrites en microscopie photonique (Sandrine Garcia, 2000). La discrimination de celles-ci n'étant pas toujours bien définie par la taille et la complexité (FS/SS), des indicateurs fonctionnels tels que l'activité estérase et l'activité du mécanisme oxydatif ont été étudiées. Les résultats obtenus ont permis, d'une part, d'obtenir une discrimination des types hématocytaires décrit en microscopie photonique (granulocytes, grandes cellules agranuleuses, petits hyalinocytes), et d'autre part, de montrer que la population des granulocytes présentait des activités enzymatiques plus importantes que la population des cellules agranuleuses et des petits hyalinocytes. Nous avons utilisé ces deux indicateurs pour relever d'éventuelles différences fonctionnelles chez des populations d'huîtres géographiquement différentes, et de statuts d'infection différents.

Pour faciliter la lecture des graphiques, j'ai décidé de noter :

- Les huîtres quiberons écloséries QE
- Les huîtres quiberons sauvages QW
- Les huîtres méditerranéennes MED
- Et les huîtres croates CR.

5.1 Analyse de populations d'origines géographiques différentes à l'aide des indicateurs enzymatiques :

Pour que la comparaison soit possible, les huîtres utilisées lors de ces expériences ont suivi le même parcours. Les huîtres croates, méditerranéennes, quiberons éclosérie sont issues de géniteurs sauvages. En fait, des huîtres sauvages importées de Croatie, de Méditerranée et de Quiberon ont pondu en éclosérie (une génération en éclosérie) au début du mois d'avril 1999. Les huîtres utilisées lors de cette expérience sont issues de cette ponte et ont donc un an.

Les huîtres quiberons sauvages sont des huîtres captées sur des collecteurs en 1998, puis au printemps 1999, elles ont été détroquées (mises en poches). Ce sont ces huîtres qui ont servi pour nos expériences et elles ont deux ans.

L'année de moins des huîtres produites en éclosion est du à leur parcours zootechnique (production en éclosion).

Pour cette expérience nous avons pris : 10 huîtres MED, 10 huîtres QW, 10 huîtres CR et 5 huîtres QE.

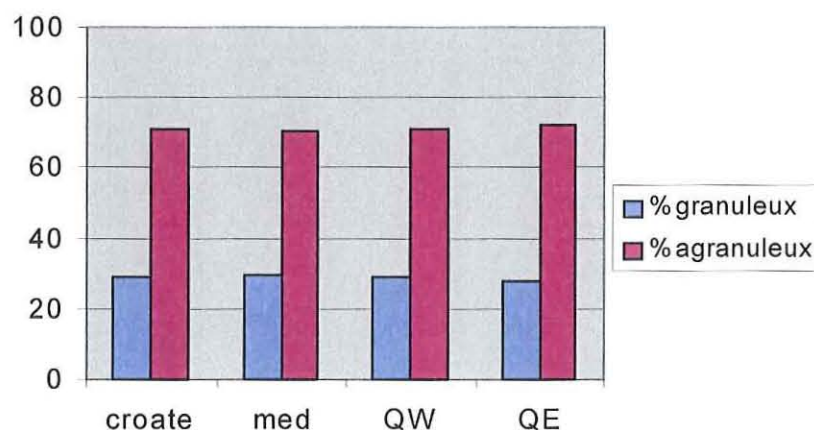
Une fonction intéressante du cytomètre de flux est exploitée pour permettre de connaître la répartition des trois types hémocytaires chez les huîtres plates. Pour cela nous pouvons utiliser deux méthodes :

Soit sélectionner un nuage de point correspondant à un type hémocytaire donné

Soit sélectionner un pic sur le graphique monoparamétrique (log SS) correspondant à un type hémocytaire donné.

Dans ces deux cas, nous observons une coloration du type hémocytaire que nous voulons visualiser sur le graphe représentant la complexité des cellules en fonction de leur taille.

Le graphique 1 ci-dessous montre la répartition cellulaire des populations étudiées. Le pourcentage des cellules granuleuses varie de 28 % à 30 %, et celui des cellules agranuleuses varie de 70 % à 72 %.



Graphique 1 : répartition cellulaire des différentes populations.

	Huîtres croates		Huîtres méd.		Huîtres QW		Huîtres QE	
	%	Ecart-type	%	Ecart-type	%	Ecart-type	%	Ecart-type
Cellules granuleuses	29,2	6,8	29,7	9,3	28,7	8,2	27,9	10,3
Cellules agranuleuses	70,8	6,8	70,3	9,3	71,2	8,2	72,1	10,3

Tableau 2 : valeurs statistiques pour la répartition cellulaire des populations d'origine diverses.

L'écart-type montre qu'il n'y a pas une grande variabilité individuelle.

La répartition cellulaire quelle que soit l'origine géographique des huîtres est comparable.

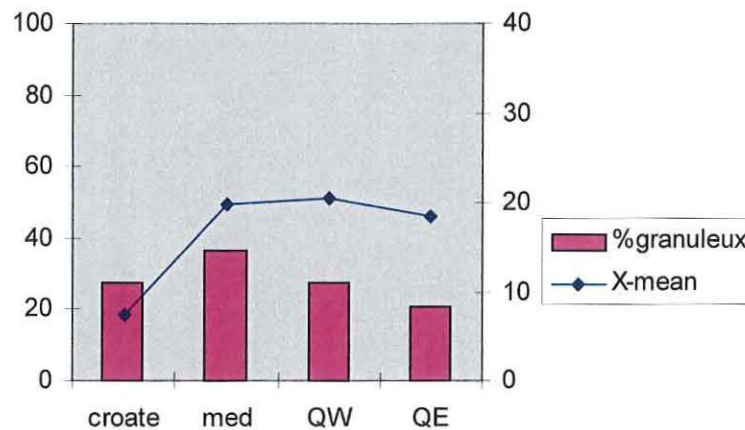
Pour compléter cette répartition cellulaire nous avons utilisé les indicateurs enzymatiques (estérase et oxydative burst). Ne sont présentés dans les résultats que les analyses enzymatiques obtenues pour les cellules granuleuses. En effet, ce type cellulaire est représentatif de la réponse enzymatique globale.

5.1.1 Activité estérase :

	croate		MED		QW		QE	
	%	écart-type	%	écart-type	%	écart-type	%	écart-type
cellules granuleuses	29	8,5	36,3	12,4	27,7	9,3	21	7,9
X-mean	7,4	7,1	19,8	5,2	20,5	11,8	18,5	5

Tableau 3 : valeurs statistiques pour l'activité estérase des populations d'origine diverses.

Le graphique 2 ci-dessous montre les résultats obtenus pour l'activité estérase des différentes populations.



Graphique 2 : activité estérase des granuleux de différentes populations.

Le pourcentage de cellules granuleuses actives varie entre 21% pour les huîtres QE et 36 % pour les huîtres MED. L'intensité de fluorescence, correspondant à la moyenne de fluorescence en fonction du nombre de cellules (X-mean), varie entre 7,4 pour les huîtres croates et 20,5 pour les huîtres QW. Cette intensité de fluorescence correspond à la quantité d'estérase présente dans les cellules

Les activités estérase sont différentes notamment pour le niveau d'intensité de fluorescence (X-mean) et donc à la présence d'estérase dans les cellules. En effet, les huîtres CR ont une moyenne d'intensité de fluorescence beaucoup plus faible que celle des autres huîtres.

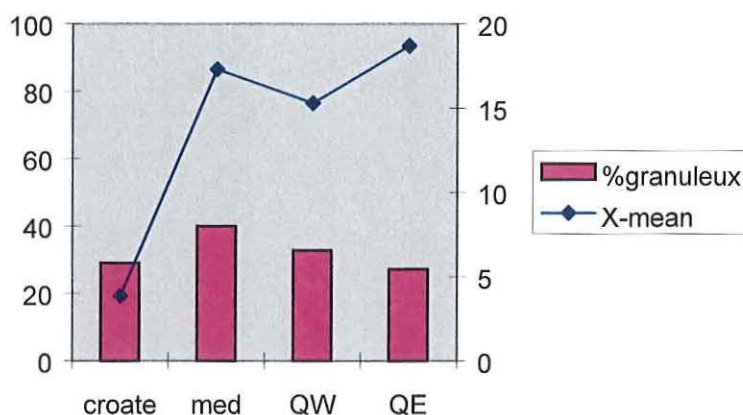
De plus, bien que les huîtres QE aient peu de cellules actives, elles présentent une moyenne d'intensité de fluorescence importante (donc une activité cellulaire importante).

5.1.2 Activité du mécanisme oxydatif :

	croate		MED		QW		QE	
	%	écart-type	%	écart-type	%	écart-type	%	écart-type
cellules granuleuses	29	8,5	40	12,5	32,8	9,8	27,2	14,4
X-mean	3,83	2,5	14,3	6	15,3	5,3	18,7	8,3

Tableau 4 : valeurs statistiques pour l'activité du mécanisme oxydatif des populations d'origine diverses.

Le graphique 3 ci-dessous représente l'activité du mécanisme oxydatif des différentes populations étudiées.



Graphique 3 : activité oxydative burst des granuleux de différentes populations.

Le pourcentage de cellules granuleuses actives varie entre 27 % pour les huîtres QE et 40 % pour les huîtres MED. L'intensité de fluorescence varie de 3,83 pour les huîtres croates et 18,7 pour les huîtres QE.

Sur cette analyse nous remarquons deux choses :

- Une population peut avoir un nombre de cellules actives réduit mais une activité cellulaire du mécanisme oxydatif importante. C'est le cas, ici, pour les huîtres QE.
- Deux populations peuvent avoir le même pourcentage de cellules actives mais une intensité de fluorescence totalement différente. En effet, les huîtres CR et les huîtres QE ont le même pourcentage de cellules actives mais ont une intensité de fluorescence opposée ! En

effet, les huîtres croates ont une moyenne d'intensité de fluorescence (X-mean) autour de 3,83 alors que les huîtres QE ont une intensité de fluorescence autour de 19.

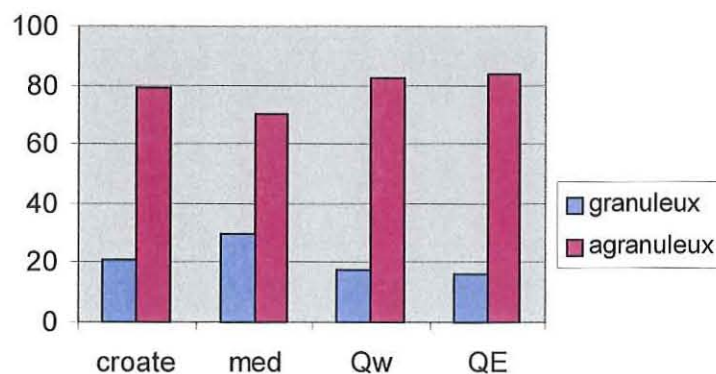
Donc, au niveau de l'activité du mécanisme oxydatif, les différences sont importantes.

Nous avons pu montrer que des différences existent tant au niveau des pourcentages de cellules actives qu'au niveau des activités enzymatiques chez des huîtres d'origine géographiques différentes, bien qu'il y ait une variation individuelle intrapopulation relativement importante comme le montrent les écart-types.

5.2 Analyse des populations d'origines géographiques différentes maintenues à 10°C à l'aide des indicateurs enzymatiques :

Les huîtres ont un système circulatoire qui est semi-ouvert et donc en contact avec le milieu extérieur. La composition de l'hémolymphe (activités enzymatiques, densité, % des types cellulaires présents) peut-être influencée par des phénomènes environnementaux (la température, la salinité de l'eau...).

Pour vérifier cette hypothèse, des huîtres croates, quiberons écloséries, méditerranéennes, et quiberons sauvages ont été mises un mois à 10°C et à 20°C, puis ont été sacrifiées et leurs hémolymphe analysées par pool de 10 huîtres.



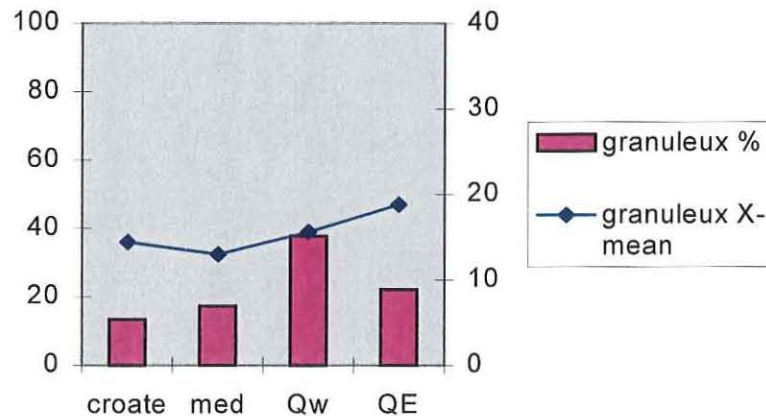
Graphique 4 : répartition cellulaire des populations maintenues à 10°C

Le pourcentage des cellules granuleuses actives varie entre 16% pour les huîtres QE et 30 % pour les huîtres MED, celui des cellules agranuleuses varie de 70 % pour les huîtres MED et de 84 % pour les huîtres QE.

Si ces résultats sont comparés avec ceux de la répartition cellulaire de ces mêmes populations (**graphique 1**), nous pouvons dire que la répartition cellulaire dans sa globalité soit n'a pas été modifiée, soit a été modifiée mais s'est rétablie au bout d'un mois. Donc soit la température n'a pas influencé ce paramètre, soit les huîtres se sont adaptées aux conditions du milieu. Pour approfondir cette étude, les marqueurs fonctionnels ont été de nouveau utilisés.

5.2.1 Activité estérase :

Le graphique 5 ci-dessous représente l'activité estérase des cellules granuleuses des populations maintenues à 10°C

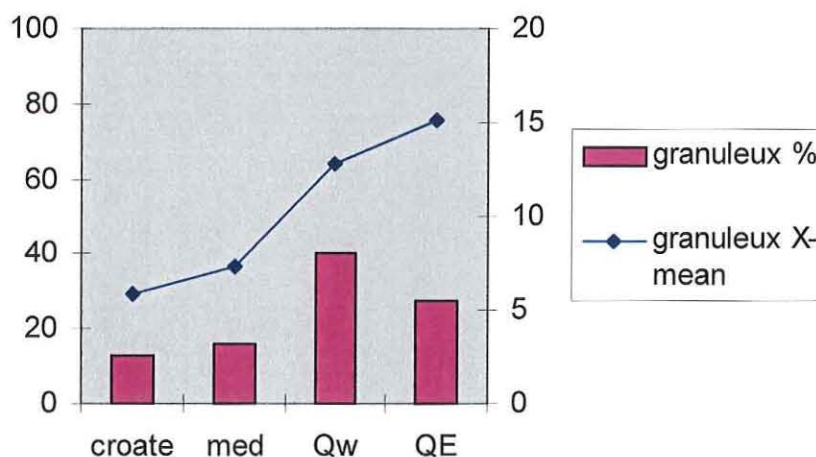


Graphique 5 : activité estérase des granuleux des populations maintenues à 10°C.

Le pourcentage de cellules granuleuses actives varie entre 13 % pour les huîtres CR et 38 % pour les huîtres QW. L'intensité de fluorescence varie de 13 pour les huîtres MED à 18,8 pour les huîtres QE.

Dans le cas de l'activité estérase, nous remarquons une différence dans les comportements des cellules granuleuses par rapport au **graphique 2**. En effet, la moyenne d'intensité de fluorescence pour la population MED est diminuée alors que celle de la population CR est augmentée. En ce qui concerne le pourcentage de cellules granuleuses actives, nous constatons une diminution importante de celui-ci pour les huîtres croates et méditerranéennes. Ceci suppose peut-être que les huîtres ont un optimum physiologique de température pour lequel leurs défenses immunitaires sont plus importantes.

5.2.2 Activité oxydative burst :



Graphique 6 : activité oxydative burst des hémocytes granuleux des populations maintenues à 10°C.

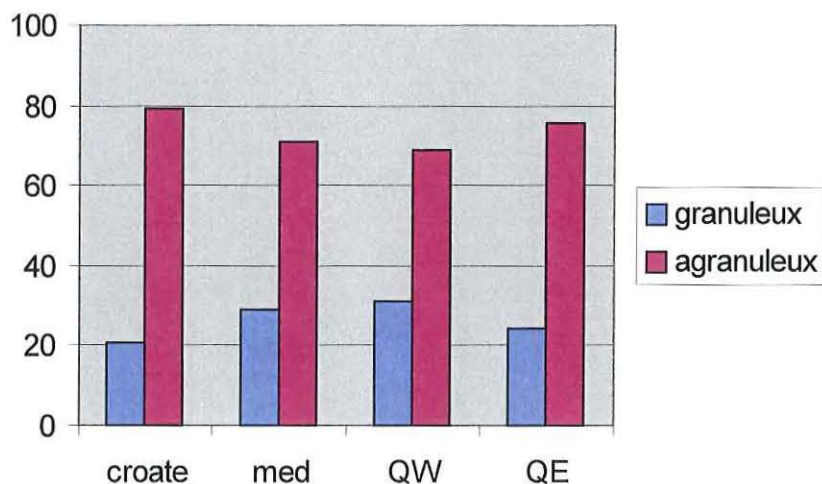
Le pourcentage de cellules granuleuses actives varie entre 13 % pour les huîtres CR et 40 % pour les huîtres QW. Par rapport **au graphique 3**, le pourcentage de cellules granuleuses actives pour les huîtres MED et pour les huîtres CR a fortement diminué à 10°C.

L'intensité de fluorescence varie de 5,9 pour les huîtres CR à 15,1 pour les huîtres QE. Par rapport **au graphique 3** et comme pour l'activité estérase, nous n'observons pas de variation importante de la moyenne d'intensité de fluorescence sauf pour les huîtres MED.

En résumé pour la condition 10°C, nous observons une variation identique que ce soit pour l'activité estérase et pour l'activité du mécanisme oxydatif. En effet pour l'activité estérase, la moyenne d'intensité de fluorescence est diminuée pour les huîtres MED et est augmentée pour les huîtres CR alors que pour l'activité du mécanisme oxydatif, seules les huîtres MED ont une intensité de fluorescence diminuée. Le pourcentage de cellules granuleuses actives baisse pour les huîtres MED et pour les huîtres CR. L'hypothèse la plus logique à ce phénomène serait que les huîtres croates et méditerranéennes sont des huîtres «d'eau chaude» contrairement aux huîtres provenant de la baie de Quiberon qui sont plus habituées à des eaux froides.

5.3 Analyse de populations d'origines géographiques différentes maintenues à 20° C à l'aide des indicateurs enzymatiques :

Le graphique 7 ci-dessous montre la répartition cellulaire des populations étudiées maintenues à 20°C.



Graphique 7 : répartition cellulaire des populations maintenues à 20°C

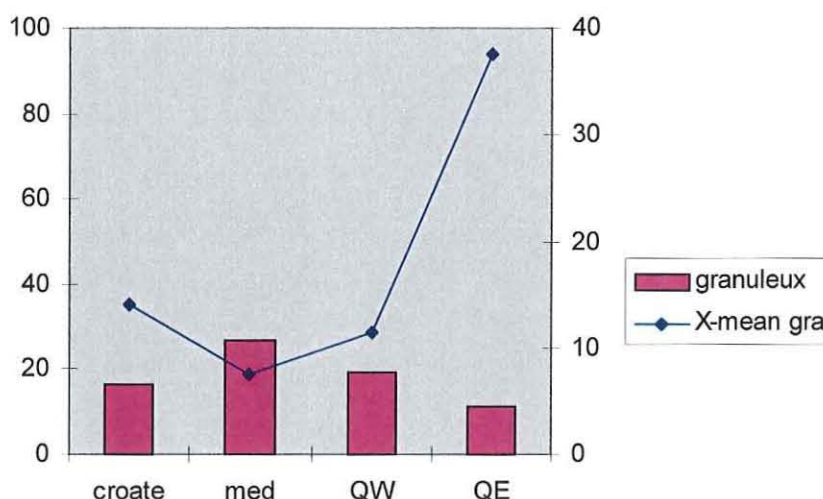
Le pourcentage de cellules granuleuses varie entre 20 % et 31 % et celui des cellules agranuleuses varie entre 69 % et 80 %.

Si nous comparons ces résultats au **graphique 1** et au **graphique 4**, nous pouvons dire que la répartition cellulaire dans sa globalité n'a pas changé. Deux hypothèses sont possibles :

- Soit la température n'influence pas le pourcentage des types cellulaires présents.
- Soit les huîtres s'adaptent aux conditions du milieu en un mois, ce qui fait qu'aucun changement n'est perceptible.

5.3.1 Activité estérase :

Le graphique 8 ci-dessous représente l'activité estérase des cellules granuleuses des populations maintenues à 20°C.



Graphique 8 : activité estérase des cellules granuleuses des populations maintenues à 20°C.

Le pourcentage des cellules granuleuses actives varie entre 11 % pour les huîtres QE et 27 % pour les huîtres MED. L'intensité de la fluorescence est comprise entre 7,5 pour les huîtres MED et 37,5 pour les huîtres QE.

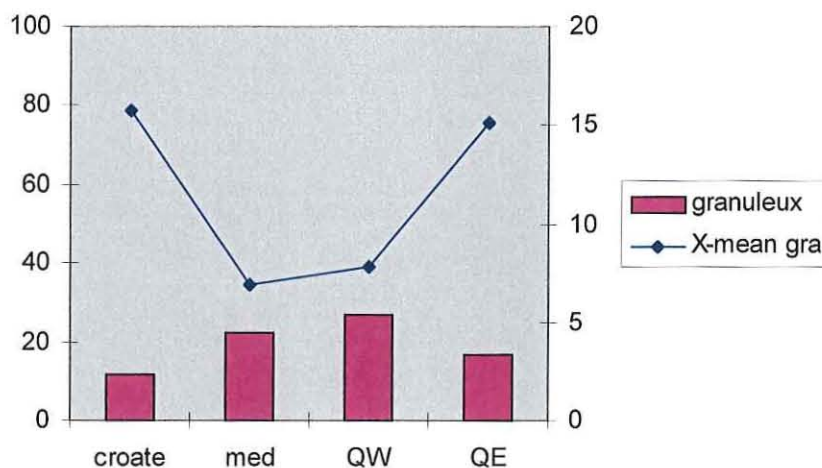
Si ces résultats sont comparés au **graphique 2**, nous remarquons que le pourcentage des cellules granuleuses actives est semblable. Par contre, nous observons une différence importante de la moyenne de fluorescence de ces cellules pour certaines populations. En effet, la moyenne d'intensité de fluorescence a fortement augmenté pour les huîtres QE.

Si ces résultats sont comparés avec le **graphique 5**, les différences majeures observées se situent au niveau des huîtres QW et des huîtres QE. Effectivement, nous constatons qu'à 20°C le pourcentage de cellules granuleuses actives est diminué de moitié puisqu'il est passé de 38 % (à 10°C) à 19 % (à 20°C). Nous remarquons également que la moyenne d'intensité de fluorescence pour les huîtres QE a doublé, en effet elle est passée de 19 pour les huîtres à 10°C à 38 pour les huîtres à 20°C.

De ceci nous pouvons en déduire que les huîtres QE semblent avoir une activité estérase beaucoup plus importante à 20°C que pour les autres conditions de milieu étudiées.

5.3.2 Activité du mécanisme oxydatif :

Le graphique 9 ci-dessous représente l'activité du mécanisme oxydatif des cellules granuleuses des populations maintenues à 20°C.



Graphique 9 : activité oxydative burst des cellules granuleuses des populations maintenues à 20°C.

Le pourcentage de cellules granuleuses actives varie entre 12 % pour les huîtres CR et 27 % pour les huîtres QW. L'intensité de fluorescence est comprise entre 6,9 pour les huîtres MED et 15,7 pour les huîtres CR.

Si ces résultats sont comparés avec le **graphique 3**, nous constatons une baisse générale du pourcentage de cellules granuleuses actives. De plus, une tendance à la baisse est également observée pour l'intensité de fluorescence sauf pour les huîtres croates pour lesquelles la moyenne de fluorescence à tripler.

Si ces résultats sont comparés au **graphique 6**, nous observons une baisse générale du pourcentage de cellules granuleuses actives, sauf pour les huîtres méditerranéennes. Nous constatons également deux autres phénomènes :

- Une augmentation significative de la moyenne d'intensité de fluorescence pour les huîtres CR. En effet, elle est passée de 5,9 (à 10°C) à 15,7 (à 20°C). Les huîtres CR ont une activité du mécanisme oxydatif beaucoup plus importante à 20°C qu'à 10°C.

- Une diminution relativement importante de l'intensité de fluorescence pour les huîtres QW. Effectivement, cette moyenne est passé de 12,8 (à 10°C) à 7,8 (à 20°C).

	Huîtres. croates		Huîtres méditerranéennes		Huîtres quiberons sauvages		Huîtres quiberons éclosion	
	Estérase	Oxydative burst	Estérase	Oxydative burst	Estérase	Oxydative burst	Estérase	Oxydative burst
T° sur site	7,4	3,83	19,8	14,3	20,5	15,3	18,5	18,7
T° = 10°C	14,4 ↗	5,9 =	13 ↘	7,3 ↘	15,6 =	12,8 =	18,8 =	15,1 =
T° = 20°C	14,1 =	15,7 ↗	7,5 ↘	6,9 ↘	11,4 ↘	7,8 ↘	37,5 ↗	15,1 =

Tableau 5 : tableau récapitulatif des résultats obtenus.

En conclusion, nous pouvons dire que les huîtres d'origine différentes ne réagissent pas de la même façon aux conditions de température que nous leur avons imposé. Ceci conforte l'hypothèse émise au début : les conditions de température peuvent influencer la composition de l'hémolymphe. Les hémocytes, sur lesquels sont faites nos expériences, sont les cellules «immunitaires» de l'huître. Au vu de nos résultats, nous avons décidé d'inoculer des huîtres de chaque population (Croate, Méditerranée, Quiberon sauvage et Quiberon éclosion) avec du parasite *Bonamia ostreae* purifié. Ceci nous permettra peut-être de savoir si les différences observées tant au niveau de % de cellules actives qu'au niveau de l'intensité de fluorescence, lors de nos expériences, permettent une défense plus active contre ce parasite voire même une résistance à celui-ci.

5.4 Analyse des géniteurs sensibles et résistants à la bonamiose à l'aide des indicateurs enzymatiques :

Au laboratoire, un programme de sélection d'huîtres résistantes à la bonamiose a été développé. Aujourd'hui, IFREMER dispose d'un stock d'huîtres résistantes. Une ponte a été réalisée avec ces individus résistants à la bonamiose. Pour pouvoir comparer les résultats de résistance au parasite à l'issue de la mise sur site, un stock d'huîtres sauvages a servi pour réaliser une ponte témoin. Ces huîtres prélevées directement dans le milieu sont normalement des huîtres sensibles à la bonamiose.

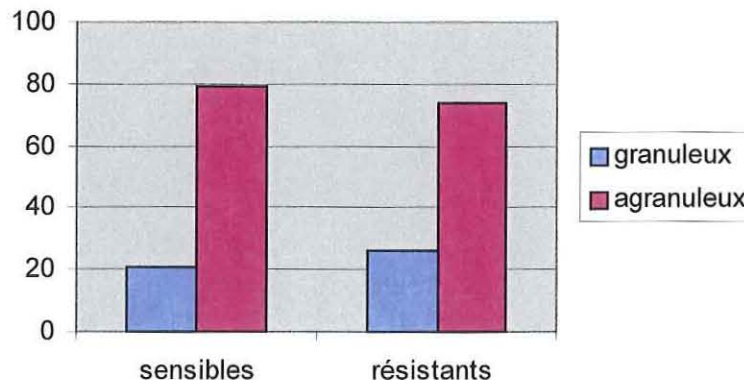
Nous avons testé la pertinence de nos marqueurs cellulaires sur ces deux catégories d'individus. Pour ces expériences nous avons pris 13 huîtres sensibles et 35 huîtres résistantes.

5.4.1 Répartition cellulaire :

	sensibles		résistants	
	%	écart-type	%	écart-type
Cellules granuleuses	20,8	10,6	26	9,2
Cellules agranuleuses	79,1	10,6	74	9,2

Tableau 6 : valeurs statistiques pour la répartition cellulaire des géniteurs.

Le graphique 10 ci-dessous représente la répartition cellulaire des géniteurs testés.



Graphique 10 : répartition cellulaire des populations hématocytaires des géniteurs.

Le pourcentage de cellules granuleuses pour les huîtres sensibles à la bonamiose est de 21 % et pour les huîtres résistantes au parasite, *Bonamia ostreae*, est de 26 %. Nous constatons que la répartition cellulaire de ces deux populations ne présente pas de différence.

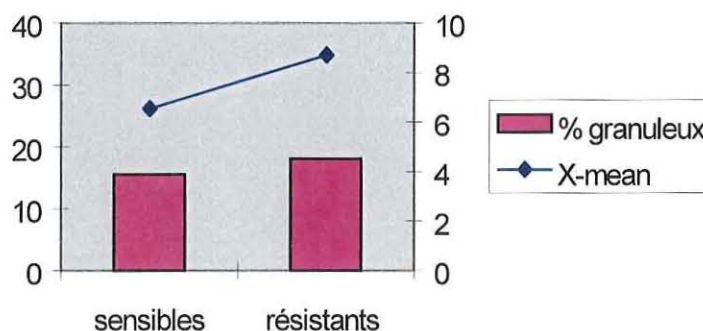
Pour compléter cette répartition cellulaire, nous avons utilisé les indicateurs enzymatiques (estérase et oxydative burst).

5.4.2 Activité estérase :

Le graphique 11 ci-dessous montre l'activité estérase des cellules granuleuses des géniteurs sensibles et des géniteurs résistants à la bonamiose.

	sensibles		résistants	
	%	écart-type	%	écart-type
cellules granuleuses	15,5	9,8	18,1	11,6
X-mean	6,6	3,5	8,7	6,1

Tableau 7 : valeurs statistiques pour l'activité estérase des géniteurs.



Graphique 11 : activité estérase des cellules granuleuses des géniteurs sensibles et des géniteurs résistants à la bonamiose.

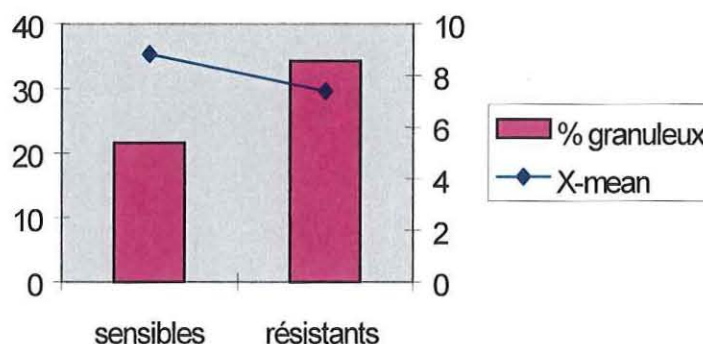
Le pourcentage de cellules granuleuses actives, pour l'activité estérase, est de 16 % pour les géniteurs sensibles et de 18 % pour les géniteurs résistants à la bonamiose. L'intensité de fluorescence est de 6,5 pour les géniteurs sensibles à la bonamiose et de 8,7 pour les géniteurs résistants à cette maladie.

5.4.3 Activité du mécanisme oxydatif :

	sensibles		résistants	
	%	écart-type	%	écart-type
cellules granuleuses	21,6	8,8	34,3	7,4
X-mean	12,4	5,8	13,3	2,8

Tableau 8 : valeurs statistiques pour l'activité du mécanisme oxydatif des géniteurs.

Le graphique 12 ci-dessous représente l'activité enzymatique de la flambée oxydative des cellules granuleuses des géniteurs sensibles et des géniteurs résistants à la bonamiose.



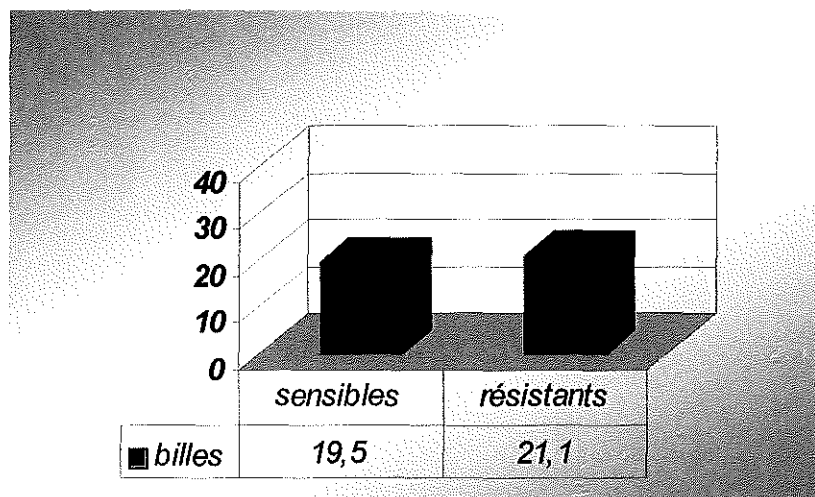
Graphique 12 : activité du mécanisme oxydatif des cellules granuleuses des géniteurs sensibles et des géniteurs résistants.

Le pourcentage de cellules granuleuses actives pour les géniteurs sensibles à la bonamiose est de 22 %, et pour les géniteurs résistants à cette maladie il est de 34 %. L'intensité de fluorescence est de 8,8 pour les géniteurs sensibles à la bonamiose et de 7,4 pour les géniteurs résistants au parasite.

Pour l'activité enzymatique de la flambée oxydative, nous constatons une différence importante pour le pourcentage de cellules granuleuses actives, mais pas pour la moyenne d'intensité de fluorescence.

5.4.4 Phagocytose de billes calibrées :

Le graphique 13 ci-dessous montre l'activité de phagocytose de billes calibrées des géniteurs sensibles et des géniteurs résistants à la bonamiose.



Graphique 13 : activité de phagocytose de billes calibrées des géniteurs sensibles et résistants à la bonamiose.

Le pourcentage de phagocytose des billes est d'environ 20 % pour les deux catégories de géniteurs. Pour l'activité de phagocytose des billes calibrées, la différence entre les géniteurs sensibles et les géniteurs résistants à la bonamiose est inexistante.

En conclusion, nous pouvons dire que les différences observées, lors de l'étude des géniteurs sensibles et des géniteurs résistants à la bonamiose, ne sont pas très importantes. Ceci vient peut-être du fait que les huîtres témoins (sensibles) prise sur le terrain ont acquis une résistance naturelle à cette maladie. En effet, ce sont des huîtres d'une taille importante (elles ont au moins 3 ans) qui ont été prises dans une zone où la bonamiose existe depuis longtemps. Ces huîtres ont probablement du renforcer leurs défenses naturelles pour avoir survécu aussi longtemps dans une zone endémique.

5.5 Etude de la phagocytose du parasite *Bonamia ostreae* in vitro :

5.5.1 Expérience réalisée sur les populations d'origines géographiques diverses :

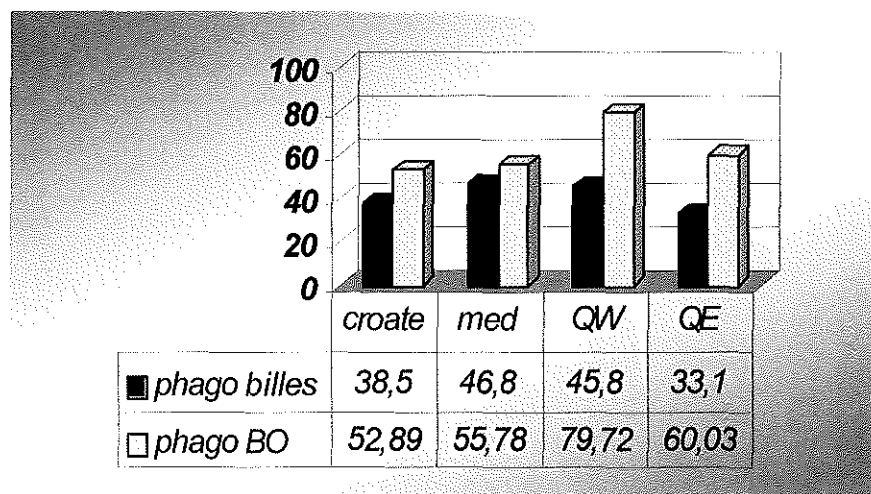
Cette expérience a été menée en trois étapes :

- Etude de l'activité estérase et de l'activité enzymatique de la flambée oxydative chez ces huîtres.

- Etude, en parallèle, de la phagocytose de bille calibrée, de la phagocytose du parasite marqué au DIOC 6, et test à l'iodure de propidium pour vérifier la viabilité des hémocytes après phagocytose.

- Etude des indicateurs enzymatiques après la phagocytose de *Bonamia ostreae* non marqué.

5.5.2 Comparaison de la phagocytose de billes et du parasite *Bonamia ostreae* :



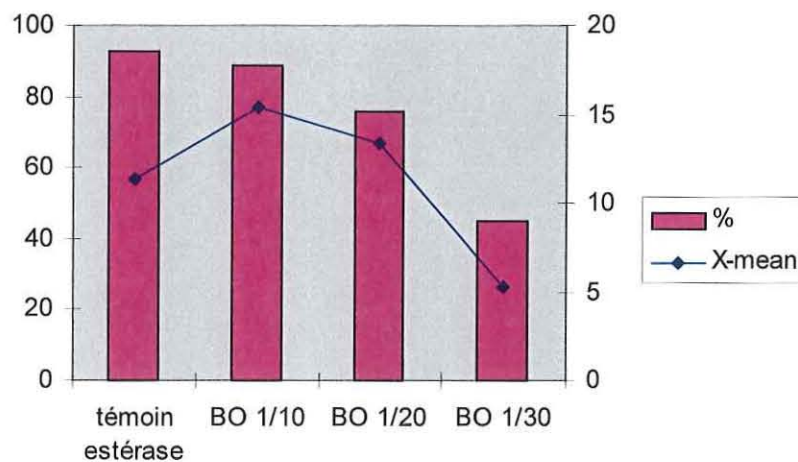
Graphique 14 : activité de phagocytose des populations maintenues à 20°C.

La phagocytose des billes est comprise entre 33 % et 47 % alors que la phagocytose du parasite varie de 53 % à 80 %. Le taux de phagocytose des billes calibrées est à peu près identique pour toutes les populations. Par contre, nous remarquons que le parasite est plus phagocyté que les billes calibrées et que cette phagocytose n'est pas constante d'une population à l'autre. En effet, les huîtres QW présente une phagocytose des billes égale à 46 % alors que celle de *Bonamia ostreae* est égale à 80 %.

5.5.3 Etude des indicateurs enzymatiques des hémocytes après phagocytose du parasite :

5.5.3.1 Activité estérase :

Le graphique 19 ci-dessous montre l'évolution de l'activité estérase lorsque les hémocytes sont infectés par des quantités croissantes de parasite pour un nombre donné de cellules.



Graphique 19 : activité estérase après phagocytose de *Bonamia ostreae* à des quantités croissantes de parasite pour un nombre de cellules donné.

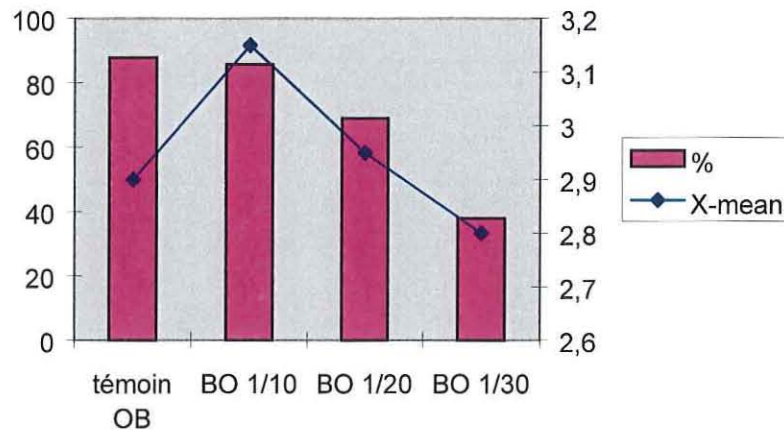
Le pourcentage de cellules actives varie de 93 % pour le témoin à 45 % pour le ratio 1/30 de *Bonamia ostreae* (c'est à dire quand un hémocyte est mis en présence de 30 parasites). L'intensité de la fluorescence est comprise entre 15,4 pour le rapport 1/10 de BO et 5,3 pour le ratio 1/30 de BO.

Plus les huîtres sont infectées par une quantité croissante de parasites plus le nombre de cellules actives diminue. En effet, jusqu'à un rapport de 1/20 la diminution est progressive (de 93 % à 76 %) puis au ratio 1/30 nous observons une diminution brutale du nombre de cellules actives (elles passent de 76 % à 45 %).

Nous remarquons également que l'intensité de fluorescence baisse progressivement. Par contre au rapport 1/10, l'intensité de fluorescence est de 11,4 alors que pour le témoin elle était de 15,4. Ceci pourrait signifier qu'une stimulation des hémocytes apparaît dans une infection à faible concentration en parasite. Par contre, nous observons une diminution brutale de la moyenne d'intensité de fluorescence quand le ratio passe du 1/20 au 1/30.

5.5.3.2 Activité du mécanisme oxydatif :

Le graphique 20 ci-dessous représente l'évolution de la flambée oxydative lorsque les hémocytes sont infectés par des ratios croissants de parasite.



Graphique 20 : évolution de l'activité enzymatique de la flambée oxydative après infection des hémocytes par des quantités croissantes de parasites pour un nombre de cellules donné.

Le pourcentage de cellules actives varie entre 88 % pour le témoin et 38 % pour une quantité de *Bonamia ostreae* égale à 30 pour un hémocyte. L'intensité de fluorescence est comprise entre 3,2 pour le rapport 1/10 de BO et 2,8 pour le ratio 1/30 de BO.

Sur ce graphique, nous remarquons deux différences importantes :

- Plus la quantité en *Bonamia ostreae* augmente, plus le pourcentage en cellules actives diminue. De plus, nous constatons que la diminution du nombre des cellules actives diminue progressivement jusqu'au rapport 1/20 (de 88 % à 69 %) puis au ratio 1/30 nous observons une diminution brutale du nombre de cellules actives (elles passent de 69 % à 38 %).

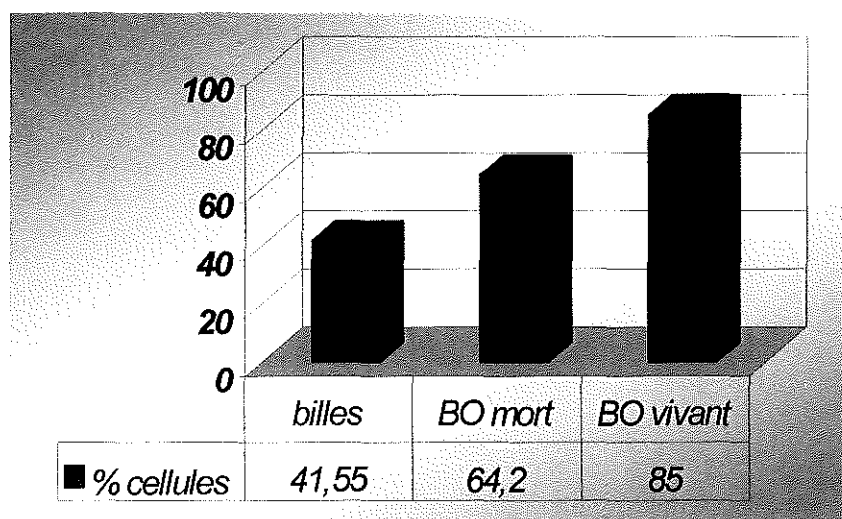
- Nous pouvons aussi observer une moyenne d'intensité de fluorescence quasiment constante, que les hémocytes soit sains ou qu'ils soient en présence d'une grande quantité de parasites. Nous remarquons quand même, pour le rapport 1/10, qu'il existe une stimulation des hémocytes pour une quantité égale à 30 parasites pour un hémocyte.

En conclusion, nous pouvons dire que quelque soit l'activité enzymatique étudiée, le nombre de cellules actives diminue progressivement jusqu'au ratio 1/20 de parasites pour ensuite diminuer brutalement quand le rapport passe au 1/30. De plus, nous remarquons, pour l'activité estérase une stimulation des hémocytes lorsqu'ils sont en présence de *Bonamia ostreae* au ratio 1/10. Par contre, en ce qui concerne la flambée oxydative, la moyenne d'intensité de fluorescence est la même quelque soit la quantité de parasites présents dans le milieu.

5.6 Etude des indicateurs enzymatiques des hémocytes après phagocytose de parasites morts, de parasites vivants :

5.6.1 Etude comparative de la phagocytose de billes calibrées, de parasites morts et de parasites vivants.

Le graphique 21 ci-dessous représente la phagocytose de billes calibrées, de parasites morts et de parasites vivants des hémocytes.



Graphique 21 : phagocytose de billes calibrées, de parasites morts et de parasites vivants des hémocytes.

L'activité de phagocytose des hémocytes varie de 42 % pour les billes calibrées à 85 % pour les parasites vivants.

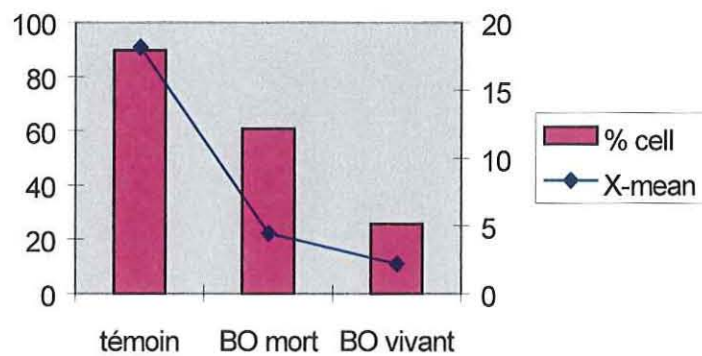
Le pourcentage de cellules phagocytant les parasites vivants est deux fois plus important que celui des cellules phagocytant les billes calibrées. Nous remarquons également :

- Une différence de pourcentage entre la phagocytose des billes calibrées et celle des parasites morts. Elle peut-être du à la différence de taille existant entre les billes et le parasite. En effet, les billes font un micromètre de diamètre alors que la taille du parasite est comprise entre 3 et 5 μm

- Une différence de pourcentage entre la phagocytose des parasites vivants et celle des parasites morts. L'hypothèse la plus logique à ce phénomène serait que le parasite vivant activerait la phagocytose par un moyen encore inconnu, mais ceci reste encore à démontrer.

5.6.1.1 Activité estérase :

Le graphique 22 ci-dessous représente l'activité estérase des hémocytes avant phagocytose de parasites, et après phagocytose de parasites morts et de parasites vivants.



Graphique 22 : activité estérase des hémocytes avant phagocytose de parasites, et après phagocytose de parasites morts et de parasites vivants.

Le pourcentage de cellules actives varie entre 26 % pour les hémocytes – *Bonamia ostreae* vivants et 90 % pour le lot témoin. L'intensité de fluorescence est comprise entre 2,2 pour les hémocytes - *Bonamia ostreae* vivants et 18,2 pour le lot témoin.

Lorsque les hémocytes phagocytent des parasites vivants ou morts, la moyenne d'intensité de fluorescence est beaucoup plus faible que pour le lot témoin. De plus, le nombre de cellules actives de ces lots diminue par rapport à celui de lot témoin.

Si l'activité estérase des hémocytes – *Bonamia ostreae* morts et celle des hémocytes – *Bonamia ostreae* vivants, nous constatons deux choses :

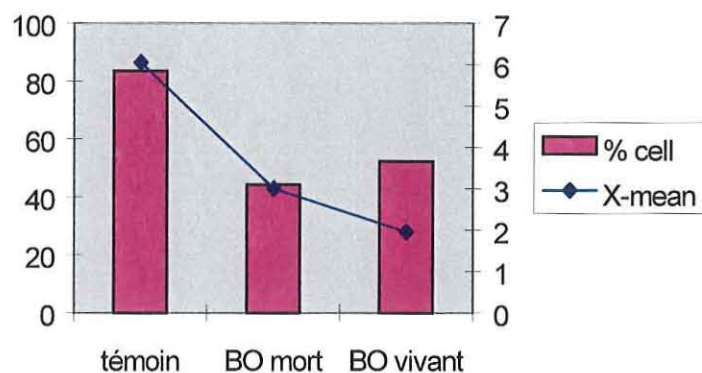
- Le pourcentage des cellules actives est fortement diminué puisqu'il est de 61 % pour les hémocytes – *Bonamia ostreae* morts et de 26 % pour les hémocytes – *Bonamia ostreae* vivants.

- La moyenne d'intensité de fluorescence est plus faible pour les hémocytes – *Bonamia ostreae* vivants que pour les hémocytes – *Bonamia ostreae* morts.

Nous pouvons donc en conclure que le parasite vivant inhibe plus la réaction enzymatique de type estérase que le parasite mort.

5.6.1.2 Activité du mécanisme oxydatif :

Le graphique 23 ci –dessous représente l'activité du mécanisme oxydatif des hémocytes avant phagocytose des parasites, et après phagocytose des parasites morts et des parasites vivants.



Graphique 23 : activité du mécanisme oxydatif des hémocytes avant phagocytose de parasites, et après phagocytose de parasites morts et de parasites vivants.

Le pourcentage de cellules actives varie entre 44 % pour les hémocytes – *Bonamia ostreae* morts et 84 % pour le lot témoin. L'intensité de fluorescence est comprise entre 2,0 pour les hémocytes - *Bonamia ostreae* vivants et 6,1 pour le lot témoin.

Lorsque les hémocytes phagocytent des parasites vivants ou morts, la moyenne d'intensité de fluorescence est beaucoup plus faible que pour le lot témoin. De plus, le nombre de cellules actives de ces lots diminue par rapport à celui de lot témoin.

Si l'activité estérase des hémocytes – *Bonamia ostreae* morts et celle des hémocytes – *Bonamia ostreae* vivants, nous constatons deux choses :

•Le nombre de cellules actives est moindre pour le lot hémocytes – *Bonamia ostreae* morts que pour le lot hémocytes – *Bonamia ostreae* vivants, puisqu'il est de 44 % pour les hémocytes – *Bonamia ostreae* morts et de 52 % pour les hémocytes – *Bonamia ostreae* vivants.

•La moyenne d'intensité de fluorescence est plus faible pour les hémocytes – *Bonamia ostreae* vivants que pour les hémocytes – *Bonamia ostreae* morts.

Nous pouvons donc en conclure que les hémocytes ayant phagocyté les parasites vivants ont une activité cellulaire du mécanisme oxydatif diminuée.

En conclusion, nous pouvons émettre l'hypothèse que le parasite, *Bonamia ostreae*, induit sa phagocytose au sein des hémocytes. De plus, les hémocytes ayant phagocyté du parasite vivant ont une activité cellulaire estérase et une activité cellulaire du mécanisme oxydatif diminué. Nous supposons que le parasite est mort car il est très difficile de le tuer et nous avons eu beaucoup de mal à trouver une technique pour y arriver.

5.7 Etude de nouveaux marqueurs fonctionnels pour caractériser les populations hémocytaires :

Etant donné que la discrimination des trois populations hémocytaires n'est pas clairement définie par les seuls critères de taille et de complexité, une recherche d'autres marqueurs enzymatiques est effectuée pour essayer de compléter la caractérisation déjà entreprise des types hémocytaires.

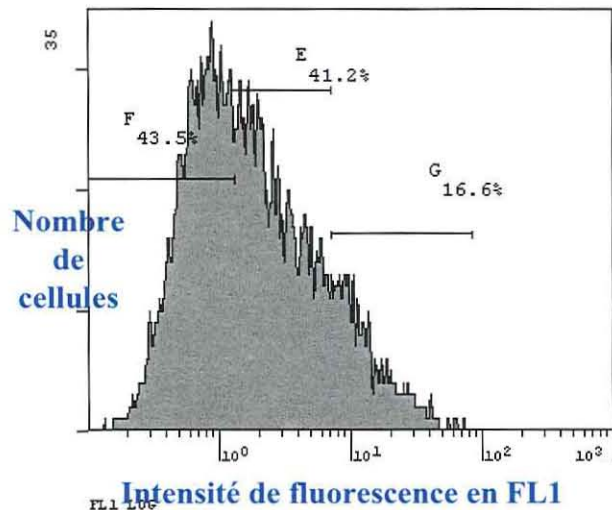
5.7.1 Dosage des enzymes de type cathepsine :

Le protocole du kit, adapté aux cellules humaines, précise un temps d'incubation de 10 min exactement à 37°C suivi de 3 min d'incubation dans la glace. Pour optimiser cette étude, plusieurs temps d'incubation à 37°C ont été testés.

Pour cette activité le maximum de fluorescence est obtenu au bout de 20 min pour l'un des pools et au bout de 10 min pour l'autre. Mais pour les deux pools, le plus haut % de cellules actives est obtenu pour un temps d'incubation de 20 min (**cf. document 1**).

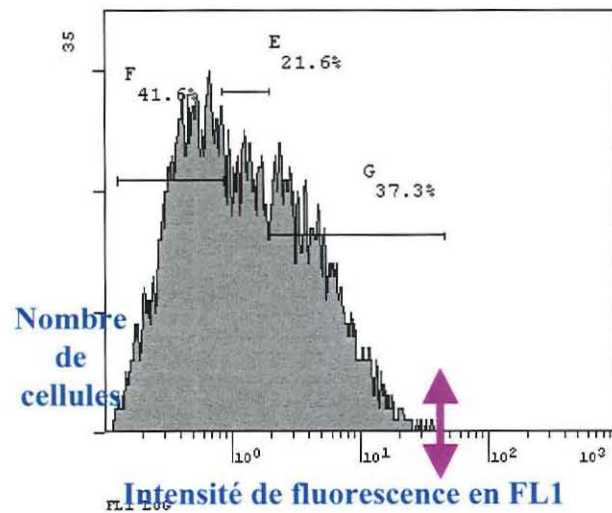
Le temps d'incubation retenu pour l'activité cathepsine sera donc de 20 min.

(2):S&BRI293.LMD FL1 LOG UnGated



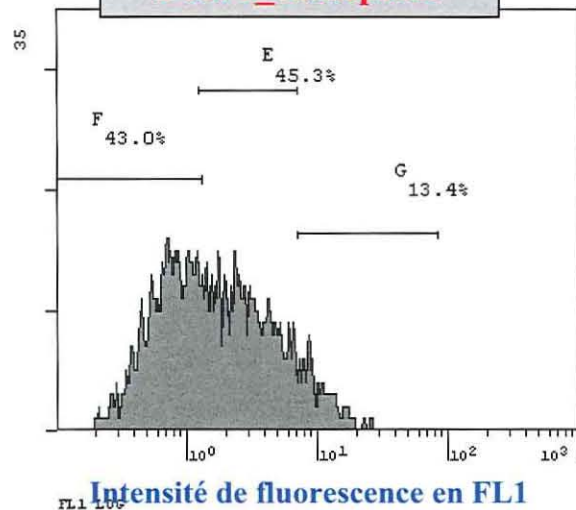
10 minutes

(2):S&BRI292.LMD FL1 LOG UnGated



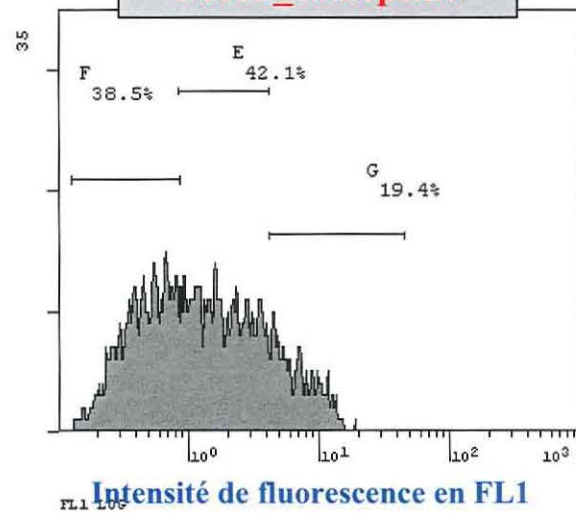
(2):S&BRI301.LMD FL1 LOG UnGated

Pool 1_cathepsine



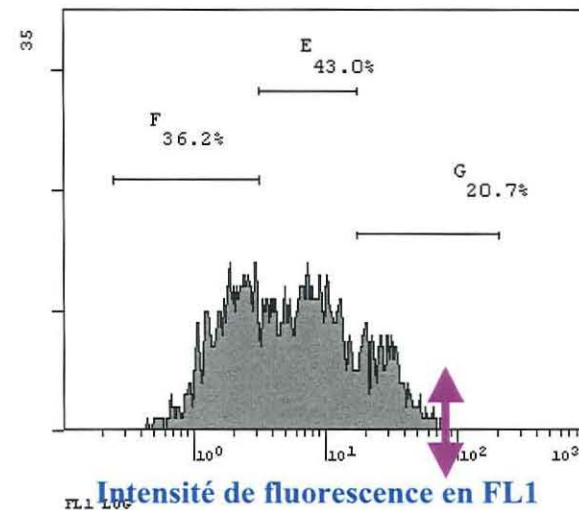
15 minutes

(2):S&BRI300.LMD FL1 LOG UnGated



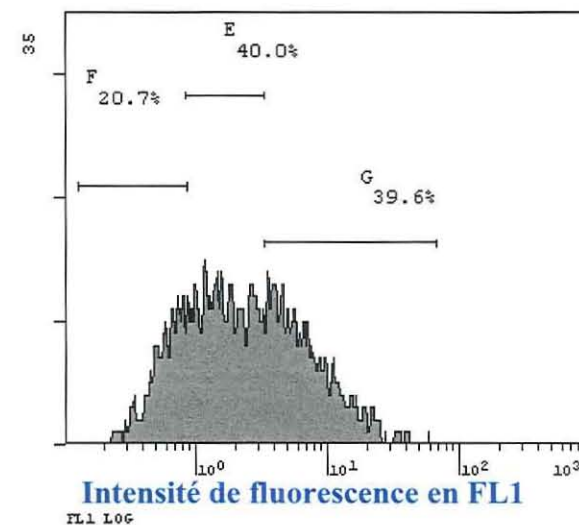
Pool 2_cathepsine

(2):S&BRI309.LMD FL1 LOG UnGated



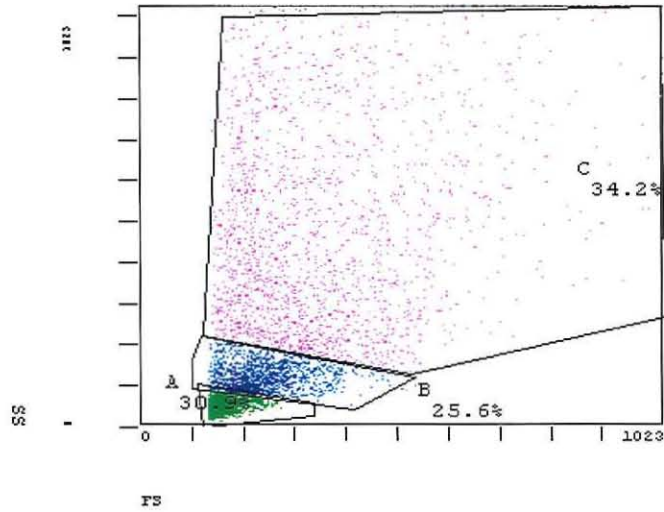
20 minutes

(2):S&BRI308.LMD FL1 LOG UnGated

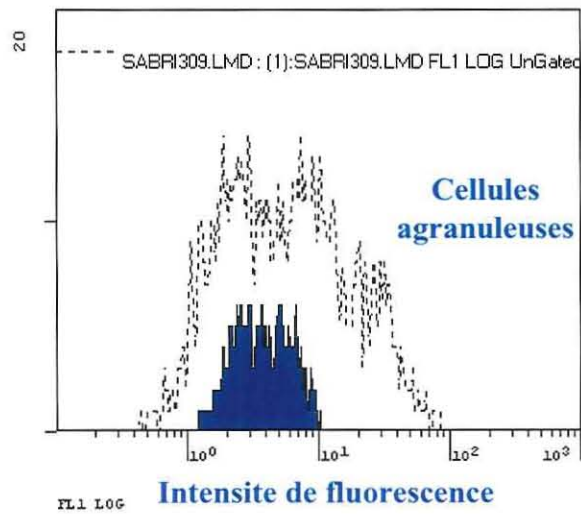


Document 1 : ensemble des pourcentages d'hémocytes ayant une activité cathepsine chez deux pools d'huitres plates à différents temps d'incubation.

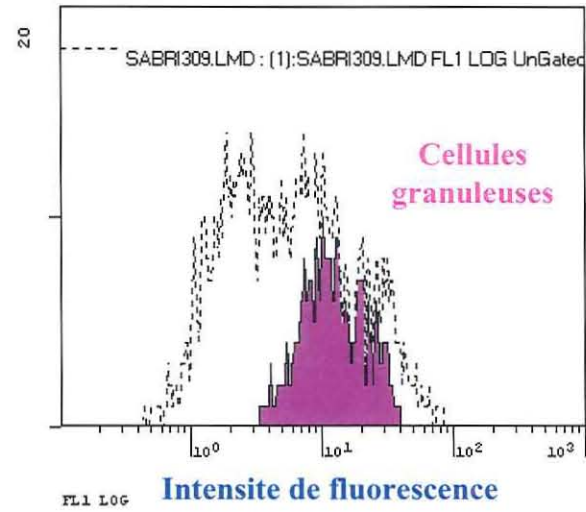
(1):SABRI309.LMD FS/SS UnGated



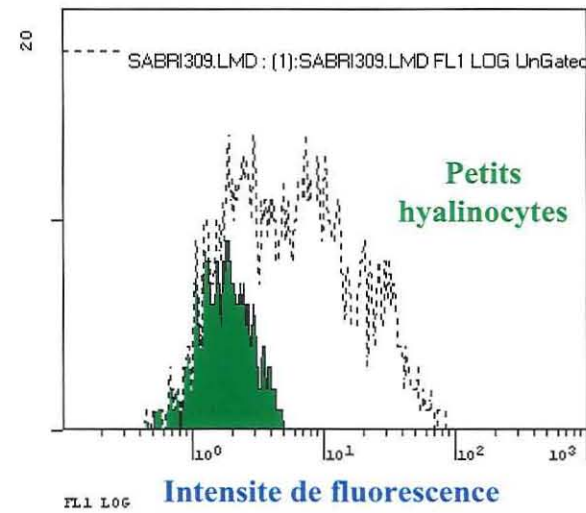
(1):SABRI309.LMD FL1 LOG B



(1):SABRI309.LMD FL1 LOG C



(1):SABRI309.LMD FL1 LOG A



Document 2 : caractérisation de l'activité cathepsine de chaque population hémoctaire.

Sur le **document 2**, les différentes populations hématocytaires sont représentées sur le graphique de l'intensité de fluorescence. Nous constatons que les cellules granuleuses répondent plus intensément que les autres types hématocytaires.

5.7.2 Dosage des enzymes de type aminopeptidase :

Le protocole du kit, adapté aux cellules humaines, précise un temps d'incubation de 5 min exactement à 37°C suivi de 3 min d'incubation dans la glace. Pour optimiser cette étude, plusieurs temps d'incubation à 37°C ont été testés.

Pour cette activité le maximum de fluorescence est obtenu au bout de 10 min pour le pool étudié. De plus, nous remarquons la présence de deux pics à 10 min d'incubation. Ces deux pics n'en forment plus qu'un lorsque le temps d'incubation est prolongé (**cf. document 3**).

Le temps d'incubation retenu pour l'activité aminopeptidase M sera donc de 10 min. Ce graphique ne permet pas directement de visualiser trois pics de fluorescence. Pour être sûr d'étudier la réponse des différentes populations hématocytaires, nous avons regardé séparément l'intensité de fluorescence des types hématocytaires (granulocytes, cellules agranuleuses, petits hyalinocytes).

Comme pour toutes les activités enzymatiques étudiées dans ce laboratoire (estérase, oxydative burst, cathepsine), la population des cellules granuleuses répond plus intensément que celle des cellules agranuleuses en ce qui concerne l'activité des enzymes de type aminopeptidase (**cf. document 4**).

5.7.3 Dosage des enzymes de type galactosidase :

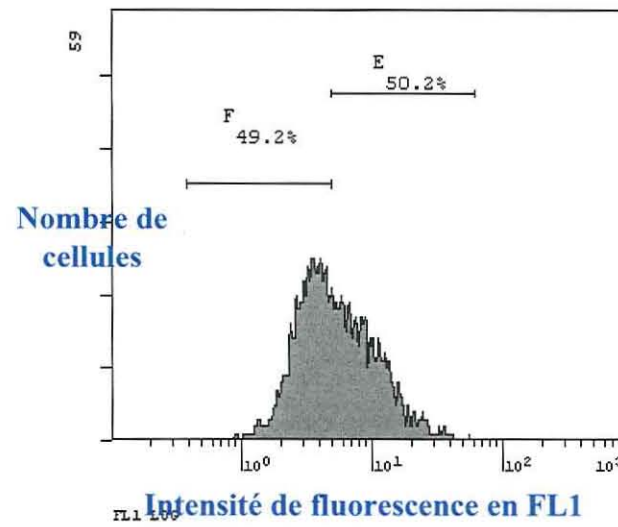
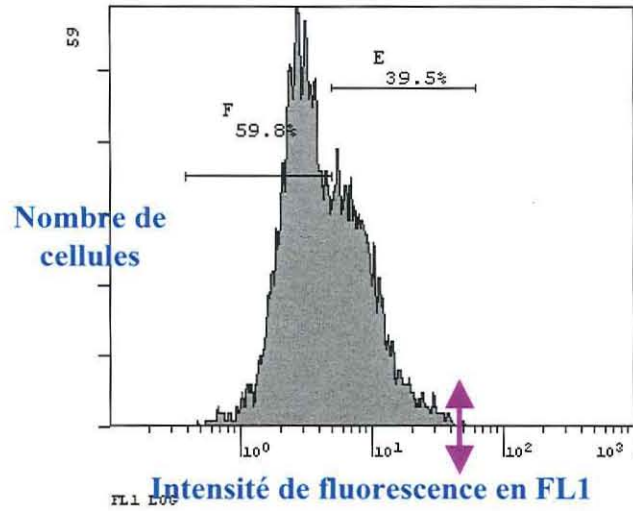
Le protocole du kit, adapté aux cellules humaines, précise un temps d'incubation de 5 min exactement à 37°C suivi de 3 min d'incubation dans la glace. Plusieurs temps d'incubation à 37°C ont été testés de façon à optimiser cette étude.

Le maximum de fluorescence est obtenu au bout de 10 min pour le pool étudié. De plus, nous remarquons la présence de deux pics à 10 min d'incubation, c'est deux pics n'en forme plus qu'un quand le temps d'incubation est prolongé (**cf. document 5**).

Le temps d'incubation retenu pour l'activité galactosidase sera donc de 10 min.

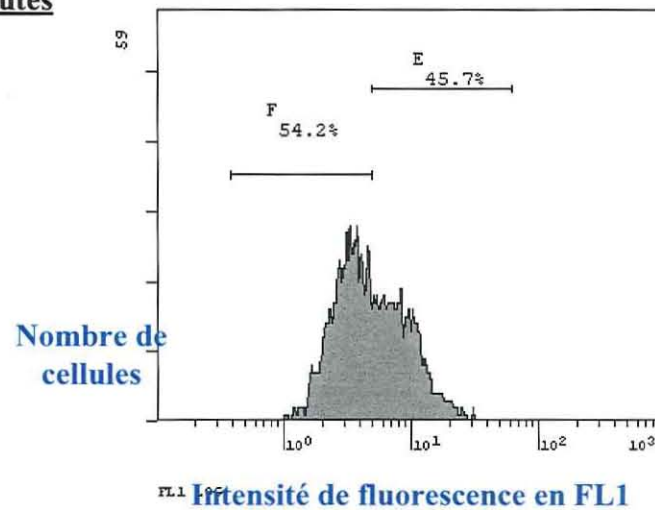
(2):SABRI294.LMD FL1 LOG UnGated

(2):SABRI302.LMD FL1 LOG UnGated



(2):SABRI304.LMD FL1 LOG UnGated

10 minutes

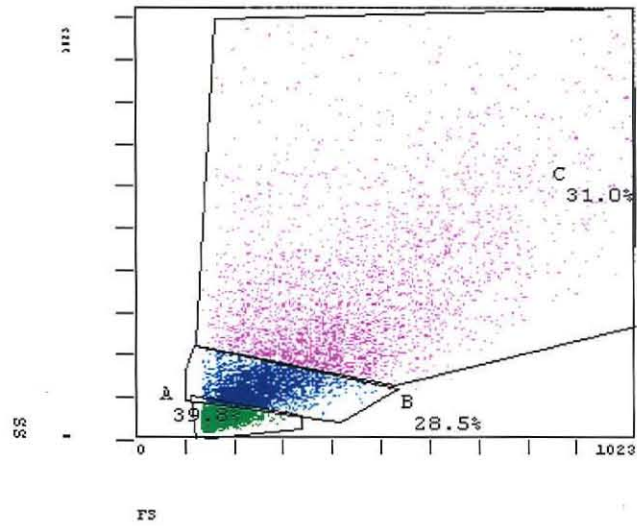


15 minutes

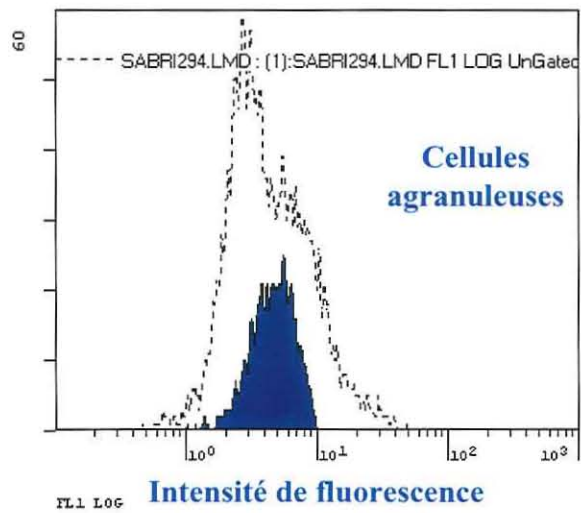
20 minutes

Document 3 : ensemble des pourcentages d'hémocytes ayant une activité aminopeptidase chez un pool d'huîtres plates à différents temps d'incubation.

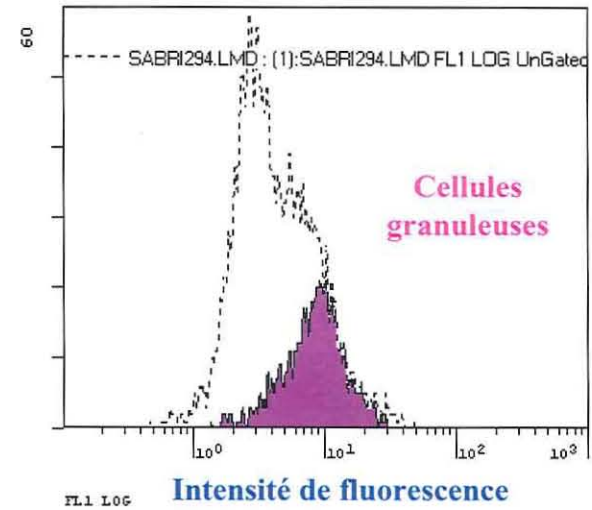
(1):SABRI294.LMD FS/SS UnGated



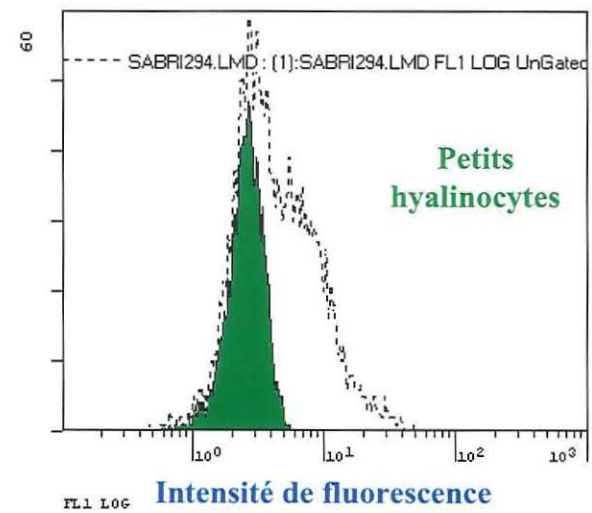
(1):SABRI294.LMD FL1 LOG B



(1):SABRI294.LMD FL1 LOG C

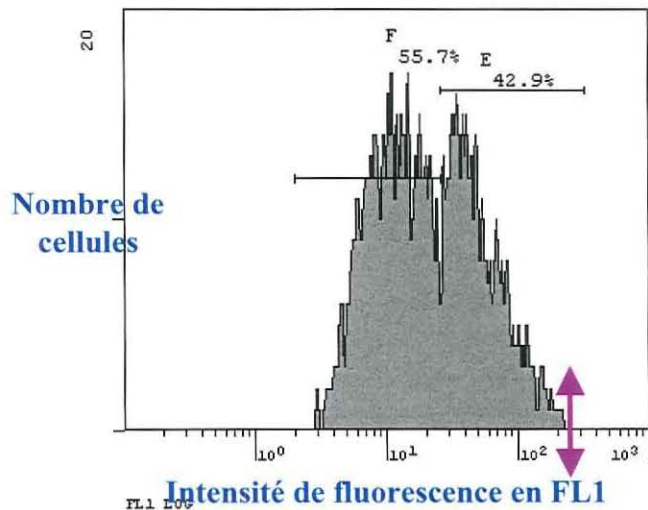


(1):SABRI294.LMD FL1 LOG A



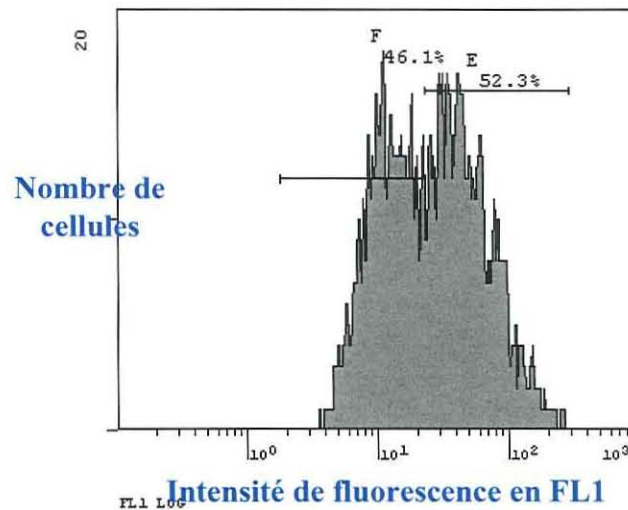
Document 4 : caractérisation de l'activité aminopeptidase de chaque population hémoctaire.

(2):S&BRI297.LMD FL1 LOG UnGated



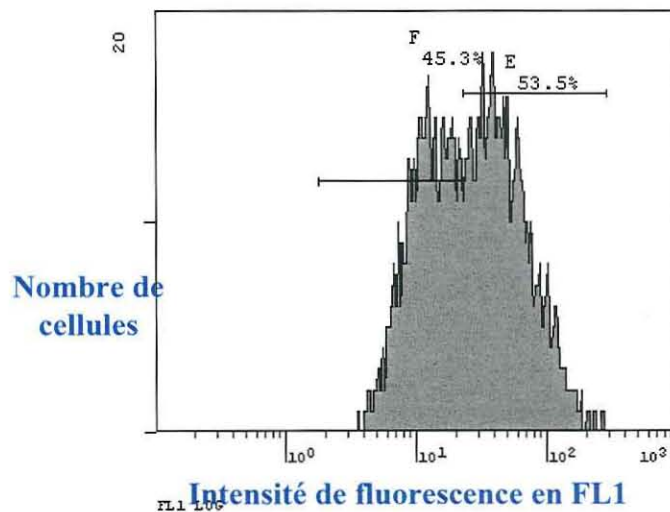
10 minutes

(2):S&BRI298.LMD FL1 LOG UnGated



15 minutes

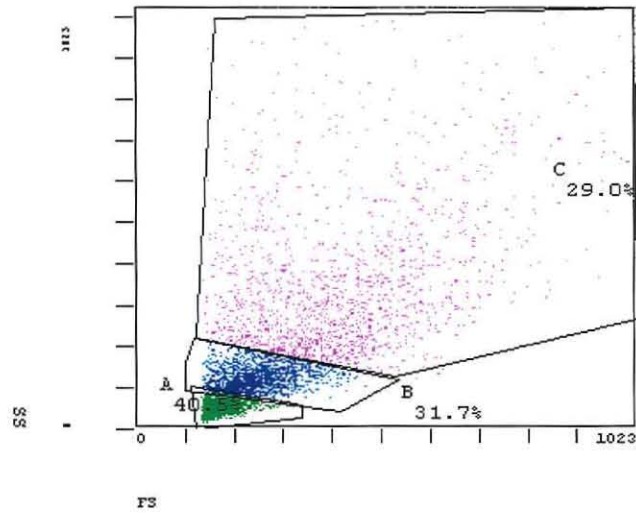
(2):S&BRI306.LMD FL1 LOG UnGated



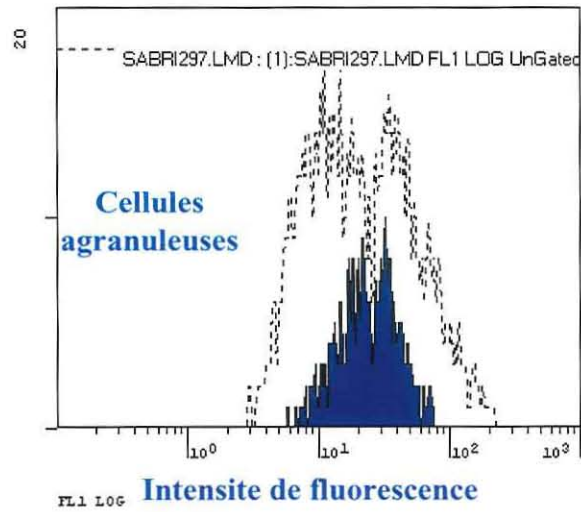
20 minutes

Document 5 : ensemble des pourcentage d'hémocytes ayant une activité galactosidase chez un pool d'huîtres plates à différents temps d'incubation.

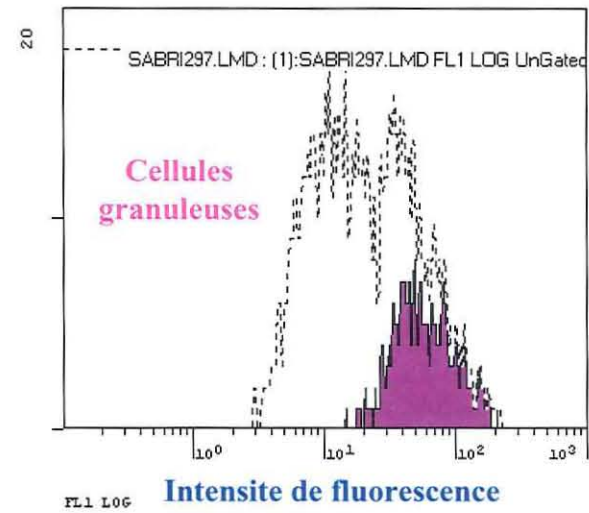
(1):SABRI297.LMD FS/SS UnGated



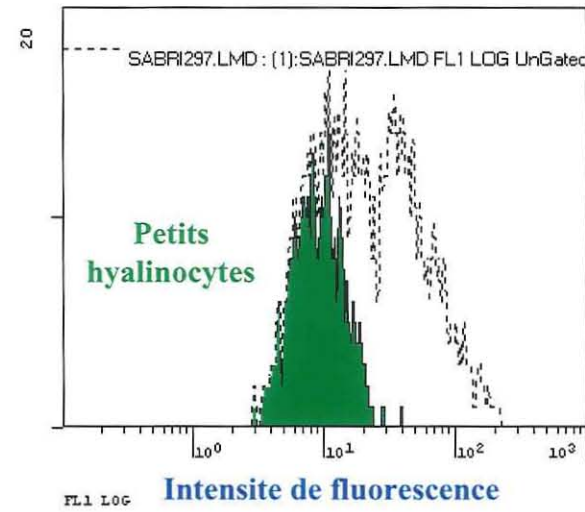
(1):SABRI297.LMD FL1 LOG B



(1):SABRI297.LMD FL1 LOG C



(1):SABRI297.LMD FL1 LOG A



Document 6 : caractérisation de l'activité galactosidase de chaque population hémoctaire.

La population des cellules granuleuses répond plus intensément que celle des cellules agranuleuses en ce qui concerne l'activité des enzymes de type galactosidase (**cf. document 6**).

5.7.4 Dosage des enzymes de type myéloperoxidase :

Le protocole du kit est normalement adapté aux cellules humaines. Pour optimiser cette étude, plusieurs temps d'incubation dans le noir et à température ambiante ont été testés.

Le maximum de fluorescence est obtenu pour un temps d'incubation de deux heures pour les deux pools étudiés. De plus, au bout de deux heures, deux pics apparaissent et permettent une meilleure discrimination des populations hémosteines (**cf. document 7**).

L'analyse de cette activité enzymatique est un peu plus délicate que les autres. En effet, les deux pools n'ont pas du tout la même allure. Pour l'un ce sont les cellules granuleuses qui répondent intensément (**cf. document 8**) et pour l'autre ce sont les petites cellules, aussi appelées les petits hyalinocytes (**cf. document 9**).

Il faut également remarquer que le pool 2 contient une quantité importante de petits hyalinocytes (environ 50 %) alors qu'en temps normal le pourcentage de ces cellules est d'environ 20 %.

Les petits hyalinocytes peuvent éventuellement contenir des cellules souches qui se différencieront plus tard en cellules granuleuses, mais ceci n'est qu'une hypothèse.

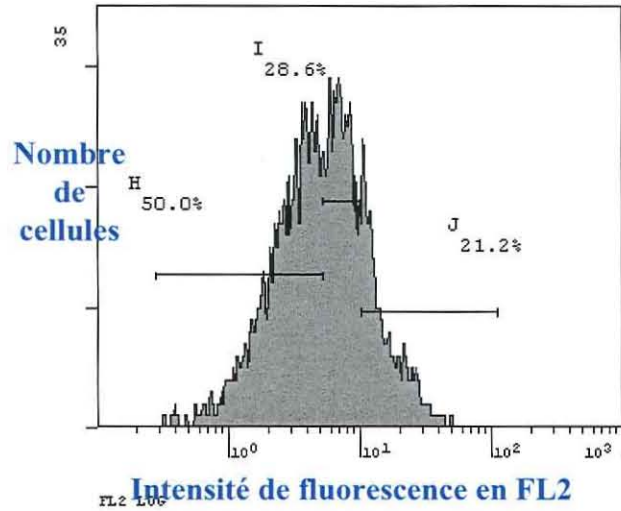
5.7.5 Dosage des récepteurs de type mannose :

Le protocole du kit est normalement adapté aux cellules humaines. Pour optimiser cette étude, plusieurs temps d'incubation dans le noir et à température ambiante ont été testés.

Le maximum de fluorescence est obtenu pour un temps d'incubation de une heure trente ou deux heures pour les deux pools étudiés. De plus, deux pics sont présents à 1H30 puis disparaissent progressivement à 2H (**cf. document 10**).

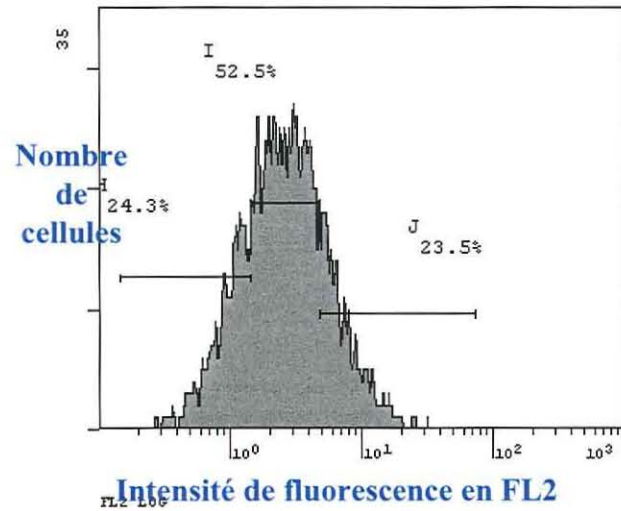
Donc le temps d'incubation qui sera retenu est 1H30.

(2):S&BRI321.LMD FL2 LOG UnGated



1 H 30

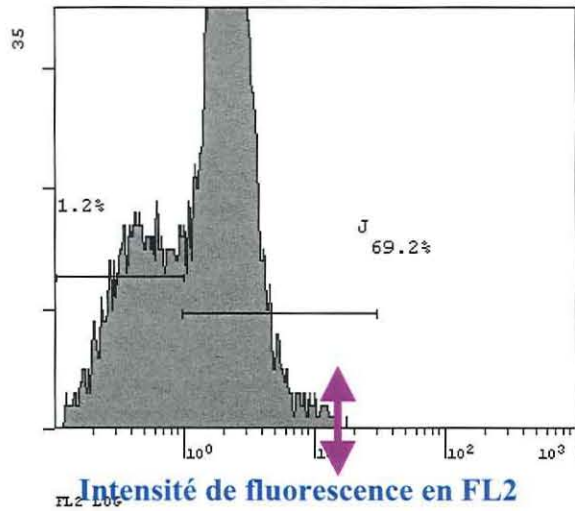
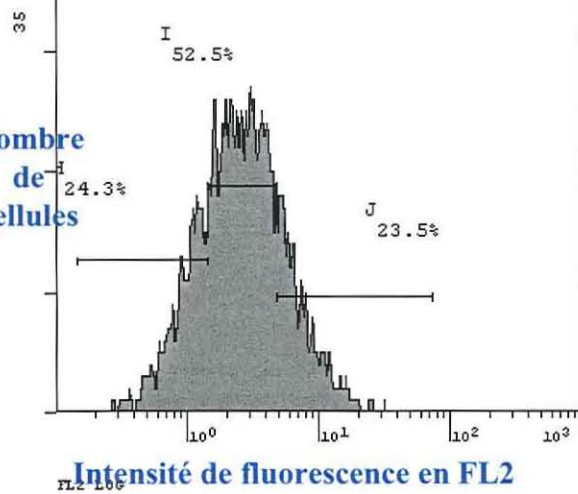
(2):S&BRI322.LMD FL2 LOG UnGated



2 H 00

(2):S&BRI324.LMD FL2 LOG UnGated

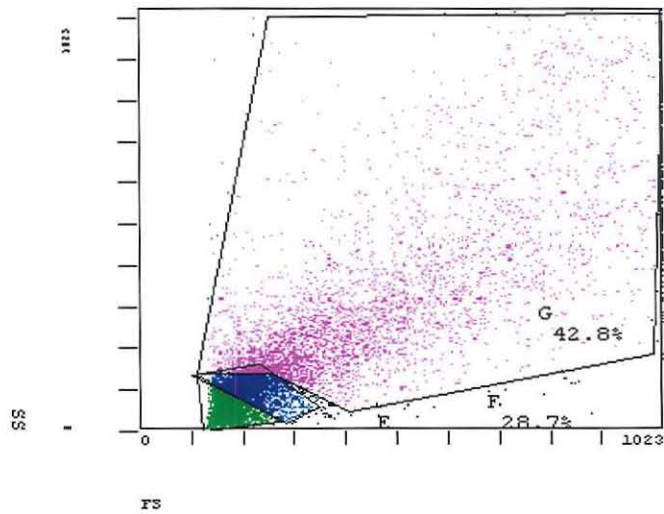
Pool 1_MPO



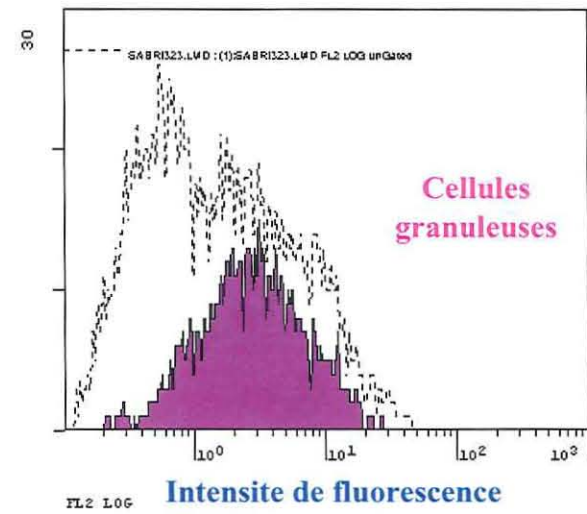
Pool 2_MPO

Document 7 : ensemble des pourcentages d'hémocytes ayant une activité myéloperoxydase chez deux pools d'huîtres plates à différents temps d'incubation.

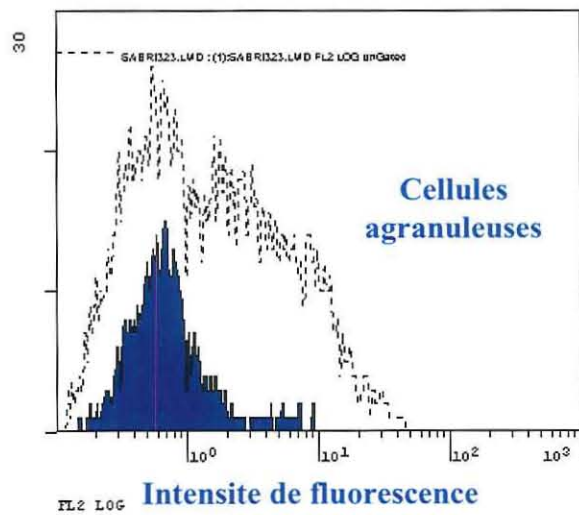
(1): SABRI323.LMD FS/SS UnGated



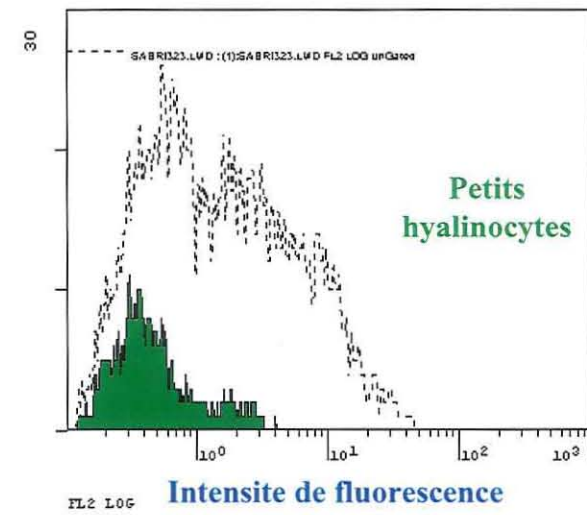
(1): SABRI323.LMD FL2 LOG G



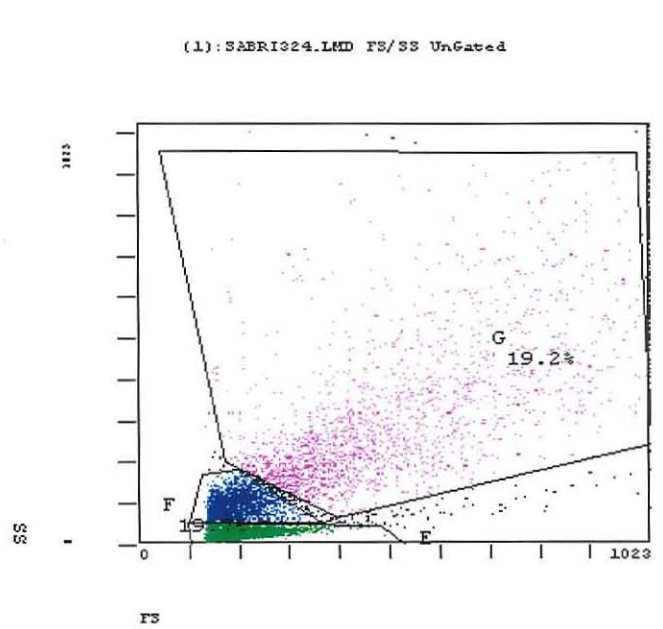
(1): SABRI323.LMD FL2 LOG F



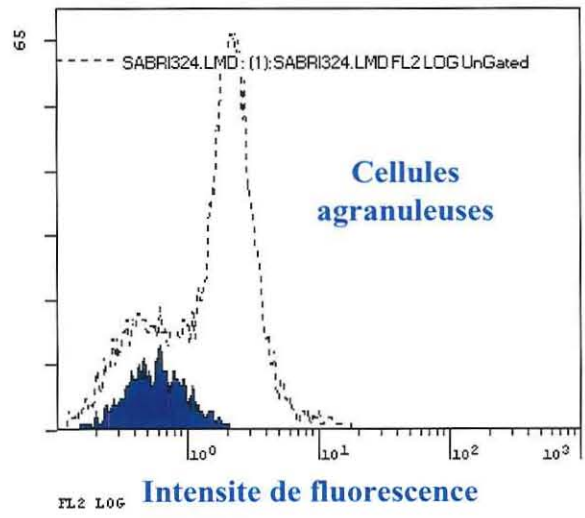
(1): SABRI323.LMD FL2 LOG # E



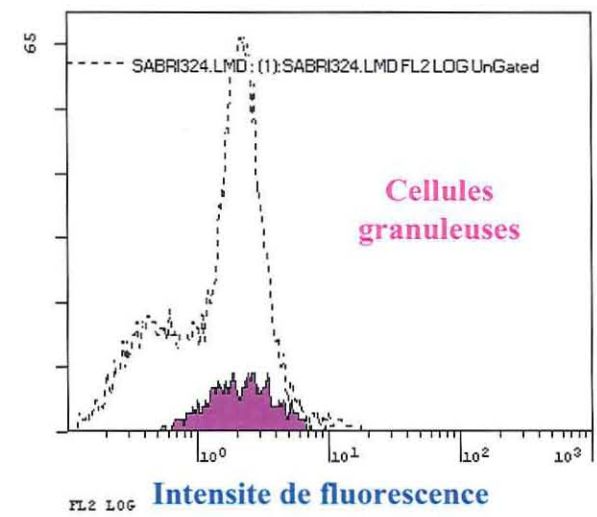
Document 8 : caractérisation de l'activité myéloperoxydase de chaque population hémocytaire.



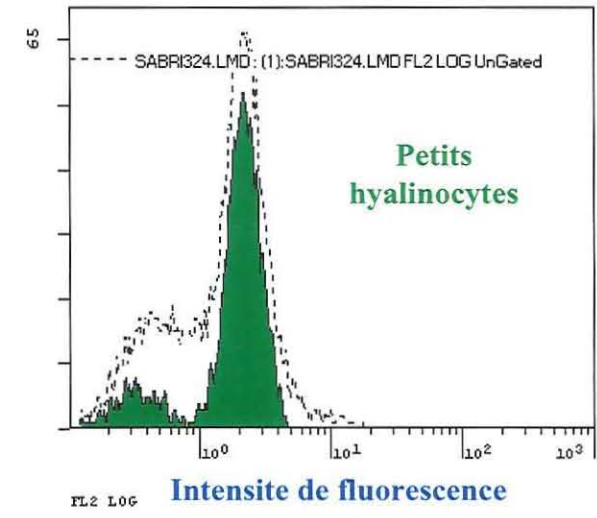
(1):SABRI324.LMD FL2 LOG F



(1):SABRI324.LMD FL2 LOG G



(1):SABRI324.LMD FL2 LOG # E



Document 9 : caractérisation de l'activité myéloperoxydase de chaque population hémocytaire.

La réponse de la population des cellules granuleuses est plus intense que celle des cellules agranuleuses (cf. document 11). Ceci voudrait dire que les hémocytes granuleux contiennent plus de récepteurs mannose que les autres types hémocytaires.

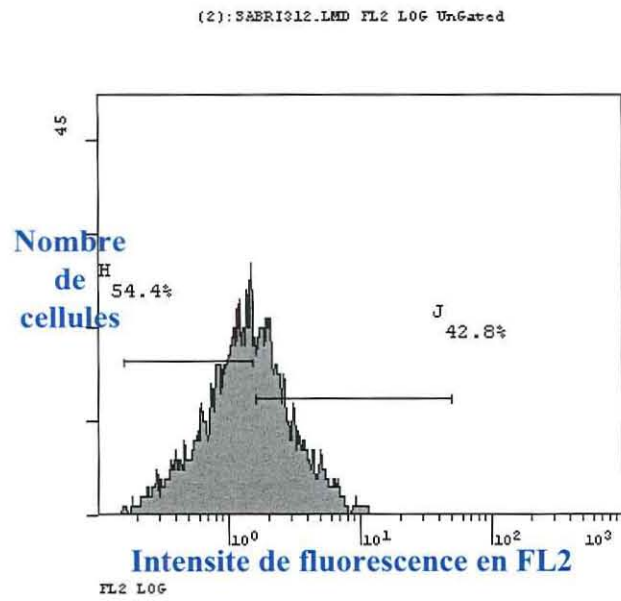
	Cellules granuleuses	Cellules agranuleuses	Petits hyalinocytes
Cathepsine	+++	+/-	-
Aminopeptidase M	+++	+	-
Galactosidase	+++	+/-	-
Myéloperoxydase	+++	-	+++
Mannose – receptor	+++	+	-

Tableau 9 : récapitulatif des réponses enzymatiques des trois types hémocytaires.

En résumé, nous pouvons dire que les granulocytes présentent les activités les plus importantes pour les enzymes recherchées (cathepsine, aminopeptidase, galactosidase, myéloperoxydase). De plus, nous remarquons que les cellules granuleuses présentent le plus grand nombre de récepteurs mannose. Pour l'activité myéloperoxydase, nous remarquons un marquage important des petits hyalinocytes.

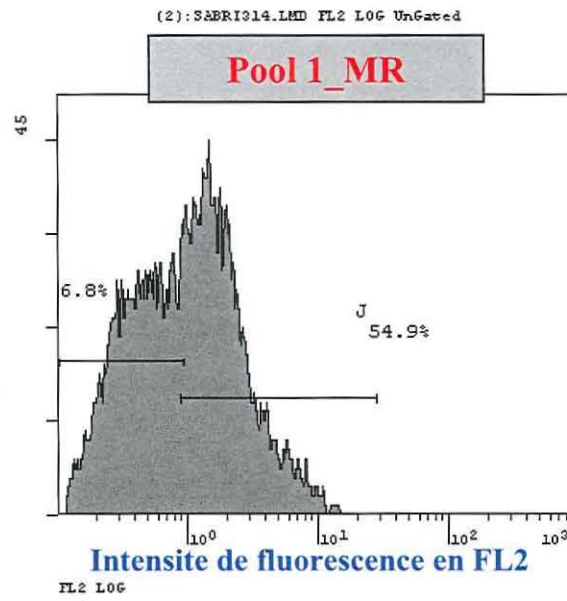
Ce résultat est intéressant car la caractérisation de cette population est difficile à définir. En effet, cette population s'apparente à des cellules «immatures», à cause de leur morphologie (rapport nucléo-cytoplasmique élevé).

Toutefois à l'heure actuelle, nous ne pouvons pas affirmer que ces cellules sont des cellules souches qui se différencieront plus tard en cellules granuleuses ou en cellules agranuleuses. Mais ceci nous permet de penser qu'une partie de ces cellules, présentant les mêmes marqueurs que les granulocytes, peuvent évoluer vers cette population de granulocytes.



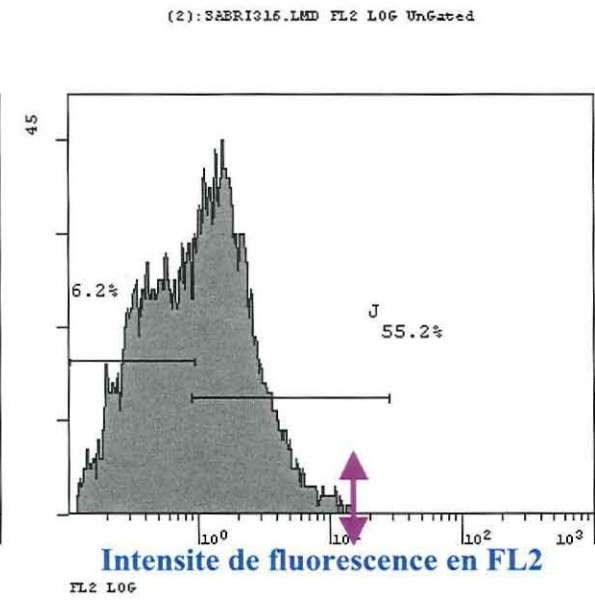
1 H 00

(2):S&BRI313.LMD FL2 LOG UnGated



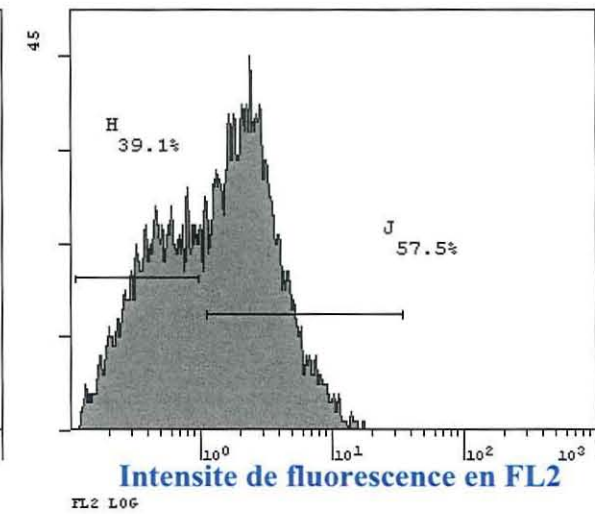
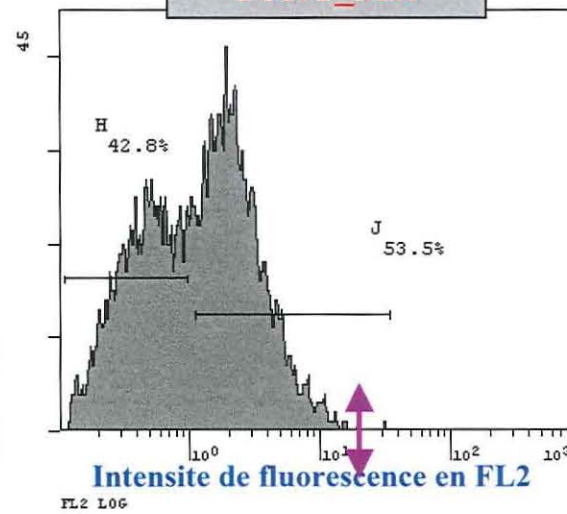
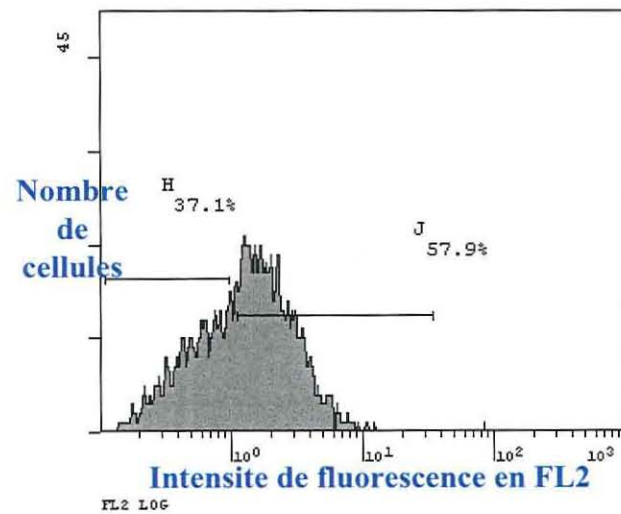
1 H 30

(2):S&BRI315.LMD FL2 LOG UnGated



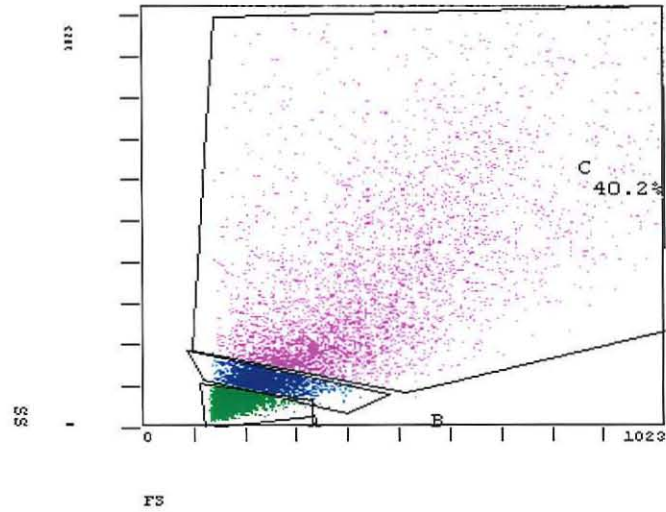
2 H 00

(2):S&BRI317.LMD FL2 LOG UnGated

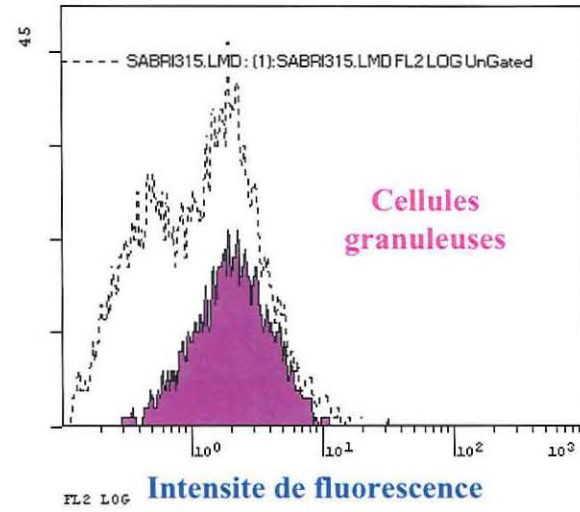


Document 10 : ensemble des pourcentages d'hémocytes ayant des récepteurs mannose chez deux pools d'huîtres plates à différents d'incubation.

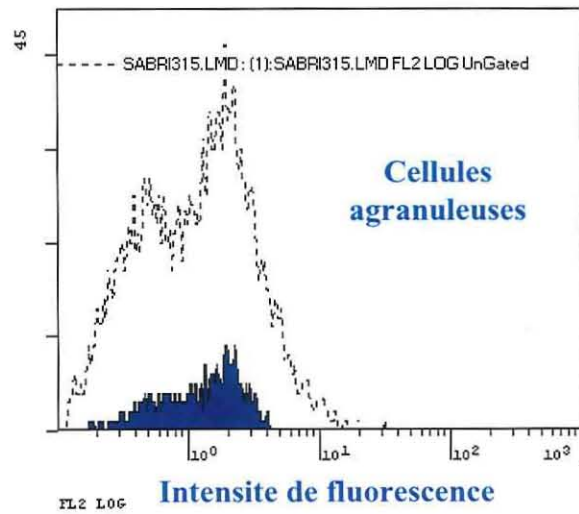
(1):SABRI315.LMD FS/SS UnGated



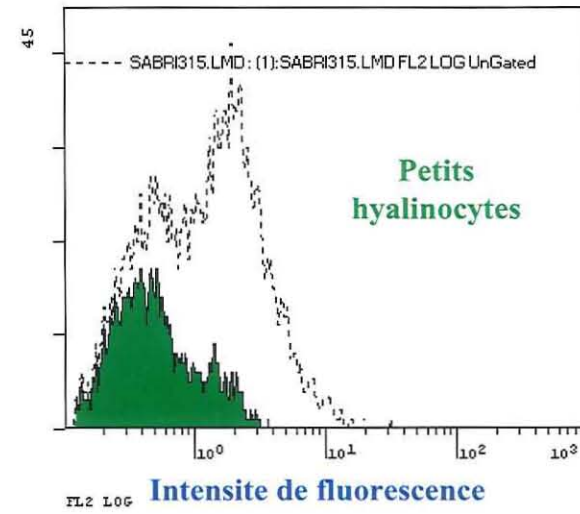
(1):SABRI315.LMD FL2 LOG C



(1):SABRI315.LMD FL2 LOG B



(1):SABRI315.LMD FL2 LOG A



Document 11 : caractérisation des récepteurs mannose de chaque population hémoctaire.

6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En ce qui concerne les populations d'origine diverses, nous constatons que de nombreuses différences existent entre les populations mais aussi pour des températures différentes pour une même population. Ceci peut laisser penser qu'il existe un optimum physiologique pour les huîtres. Les différences observées nous ont semblé intéressantes pour vérifier par infection expérimentale, le statut de sensibilité de ces différentes huîtres au parasite *Bonamia ostreae*. L'expérience est en cours et les résultats ne seront connus que dans quatre mois.

Pour l'expérience effectuée sur les géniteurs sensibles et les géniteurs résistants à la bonamiose, nous n'observons pas de différences importantes entre ces deux populations nous permettant de conclure quand à la concordance entre une activité enzymatique donnée et la résistance accrue à la bonamiose. Il faut dire que les témoins que nous avons pris ont peut-être acquis une résistance naturelle due à leur condition de vie (huîtres âgées de quatre ans et pris sur une zones endémique de bonamiose).

Par ailleurs, nous remarquons que plus la concentration en parasites est importante dans le milieu plus les activités enzymatiques étudiées diminuent. Par contre, au rapport dix parasites pour un hémocyte, nous constatons une activation des hémocytes pour ces deux marqueurs enzymatiques. Au ratio 1/30, les deux activités enzymatiques diminuent brutalement et tendent même à disparaître.

De plus, la diminution de ces marqueurs est plus importante quand les hémocytes sont infectés par du parasite vivant que quand ils sont infectés par du parasite mort. Ces résultats sont intéressants puisqu'ils confirment les résultats obtenus sur des animaux du milieu naturel (Garcia 2000). En effet, il avait été démontré que les huîtres naturelles infectées présentaient des activités estérase et oxydative burst diminuées.

Les indicateurs estérase et oxydative burst semblent donc pertinents pour étudier les interactions entre les hémocytes et le parasite.

Pour finir, sur les cinq marqueurs mis au point (cathepsine, aminopeptidase, galactosidase, myéloperoxydase et les récepteurs mannose) seuls deux sont vraiment très intéressants :

• La myéloperoxydase qui permet une bonne différenciation des trois types hématocytaires. Cette expérience permet d'envisager l'hypothèse que les petits hyalinocytes pourraient contenir des cellules souches qui se différencieront plus tard en cellules granuleuses.

• Les récepteurs mannose pour lesquels les cellules granuleuses répondent plus intensément. Nous obtenons, grâce à ces récepteurs une bonne discrimination des trois types hématocytaires.

7 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

GARCIA.S., 2000.

Caractérisation des mécanismes cellulaires de défense des huîtres plates, *Ostrea edulis*, saines et parasitées par *Bonamia ostreae*, en cytométrie en flux. Formation complémentaire POST-BTS.

COCHENNEC.N., 1997.

La Bonamiose : Caractérisation du parasite *Bonamia ostreae* et étude de ses interactions avec l'hôte, l'huîtres plates *Ostrea edulis*. Thèse de l'école Pratique des Hautes Etudes.

DENOIX.M., 1997.

Approche in vitro et in vivo des interactions hémocytes/parasite *Bonamia ostreae*, chez l'huîtres plates *Ostrea edulis*. Formation complémentaire POST-BTS.

ESPIAU.M. 1999.

Caractérisation des populations hémocytaires de l'huîtres plates *Ostrea edulis* à l'aide de lectines. Formation complémentaire POST-BTS.

8 ANNEXES

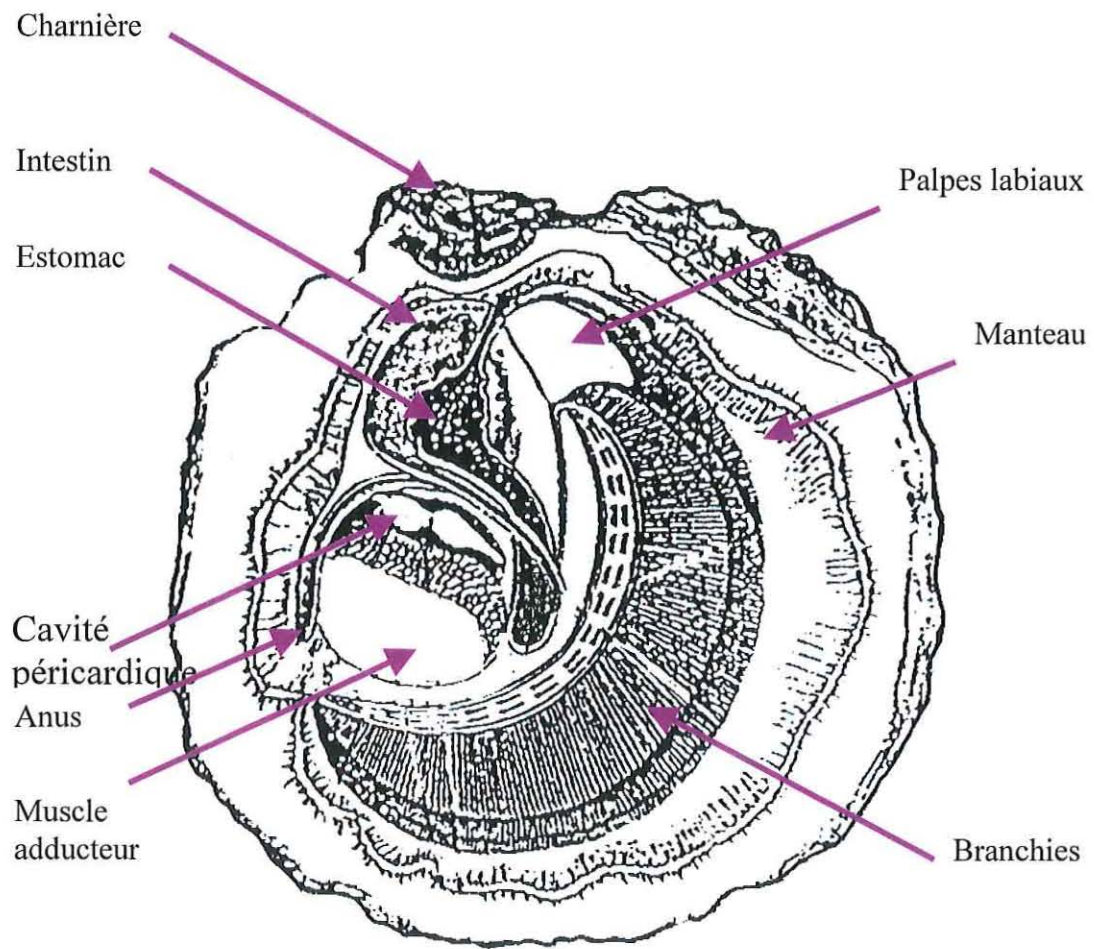
- Annexe 1 : localisation des sites de captage des huîtres d'origine géographiques différentes. P 50**
- Annexe 2 : schéma d'une huîtres plates, *Ostrea edulis*. P 51**
- Annexe 3 : cytométrie en flux. P 52**
- Annexe 4 : expérience réalisée à Brest (LEMAR UMR 6539/ Stress et environnement). P 54**
- Annexe 5 : Comparaison entre les indicateurs enzymatiques avant et après phagocytose du parasite *Bonamia ostreae* (au ratio 1/30). P 57**

Annexe 1 : localisation des sites de captage des huîtres d'origine géographique différentes.

Les trois cercles violets représentent les origines des huîtres plates utilisées : Croatie, Méditerranée, Quiberon.



Annexe 2 : Schéma d'une huître plate, *Ostrea edulis*.



Annexe 3 : la cytométrie en flux.

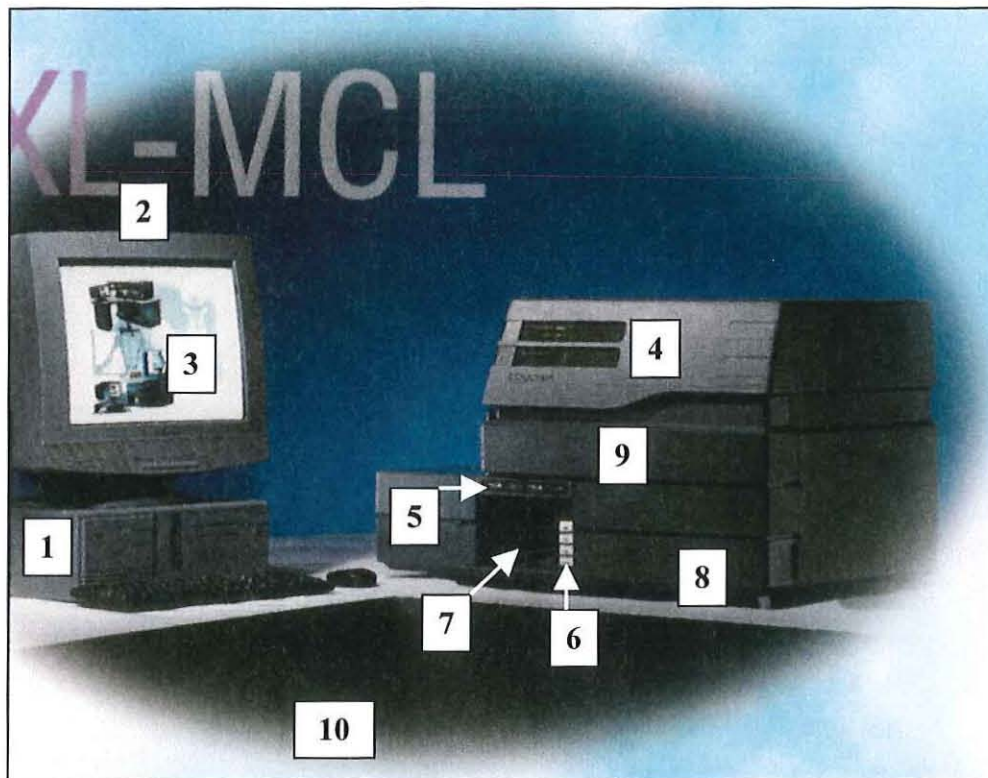


Figure 2 : Photo du cytomètre en flux COULTER EPICS XL

- 1 : Ordinateur PC Pentium : contrôle entièrement le cytomètre.
- 2 : Moniteur haute résolution.
- 3 : Logiciel SYSTEM II : permet l'acquisition, puis l'analyse des données.
- 4 : Indicateurs à LED d'amplitude des signaux (FS, SS, FL1, FL2, FL3 et FL4).
- 5 : Panneau indicateur des alarmes de niveau du liquide de gaine, du liquide de nettoyage et des déchets.
- 6 : Panneau de contrôle manuel (RUN : marche ; PRIME : amorçage du liquide de gaine ; CLEANSE : lancement du cycle de nettoyage et mise au repos du cytomètre).
- 7 : Poste de prélèvement manuel où une aiguille de prélèvement est automatiquement lavée et rincée entre chaque tube pour minimiser les contaminations.
- 8 : Tiroir des réactifs.
- 9 : Filtres optiques interchangeableables.
- 10 : Réservoir des déchets.

Annexe 3 (suite)

a un niveau dimensionnellement magnifié.

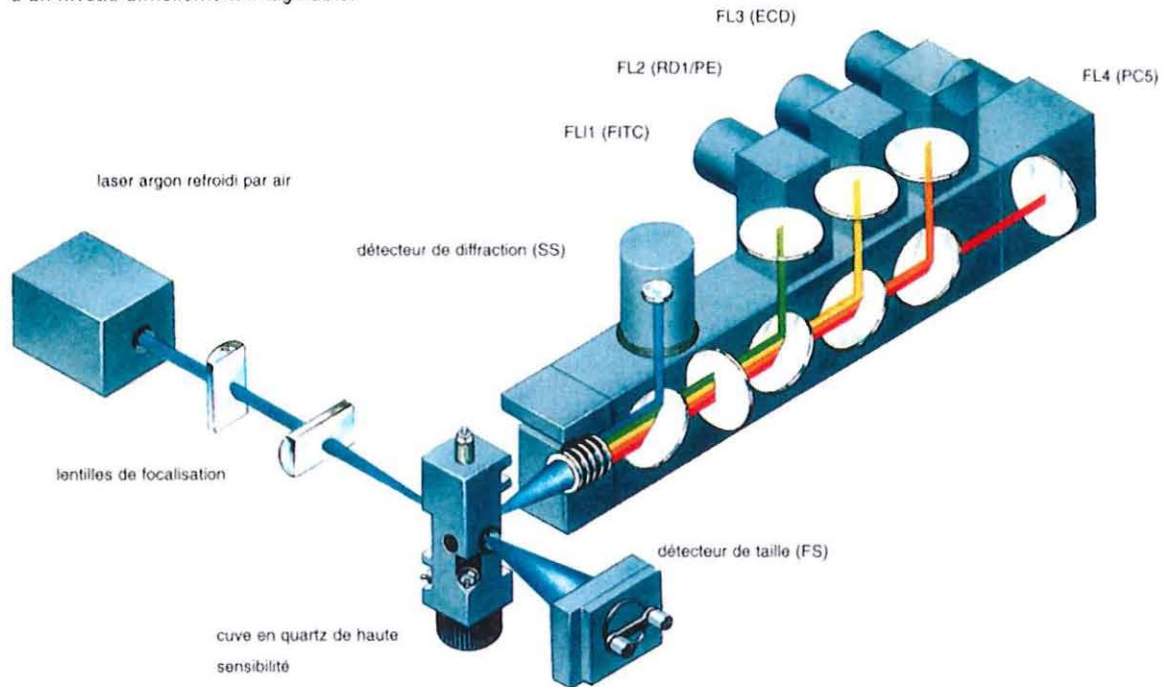


Schéma du banc optique 4 couleurs, mono laser, avec 6 détecteurs et filtres optiques interchangeables.

Figure 3 : Schéma du banc optique quatre couleurs, mono-laser, avec six détecteurs et filtres interchangeables.

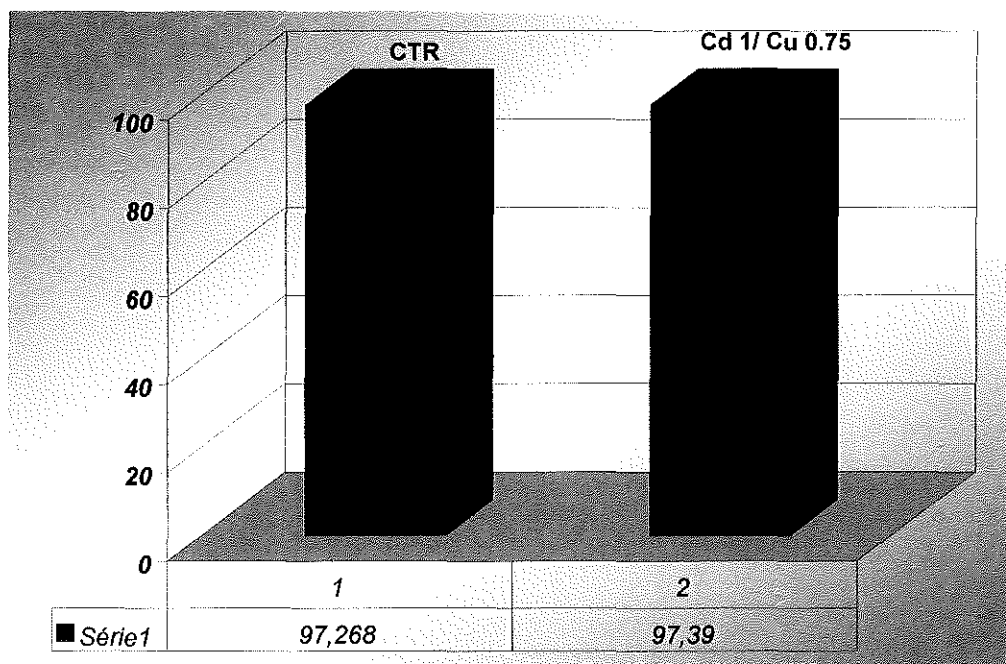
Annexe 4 : expérience réalisée à Brest (LEMAR UMR 6539/ Stress et environnement).

Des huîtres plates, *Ostrea edulis*, ont été mises en présence de polluants, un mélange de cadmium à $1\mu\text{M}$ et de cuivre à $0.75\mu\text{M}$ pendant 8 jours. Ces huîtres ont ensuite été sacrifiées et les hémolymphe regroupées en pool pour réaliser une étude de la phagocytose de billes calibrées, et de parasite purifié, *Bonamia ostreae*.

Cette expérience a pour but de montrer si les défenses immunitaires de l'huître plate sont affectées après une exposition de 8 jours à un mélange de polluants.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de graphiques.

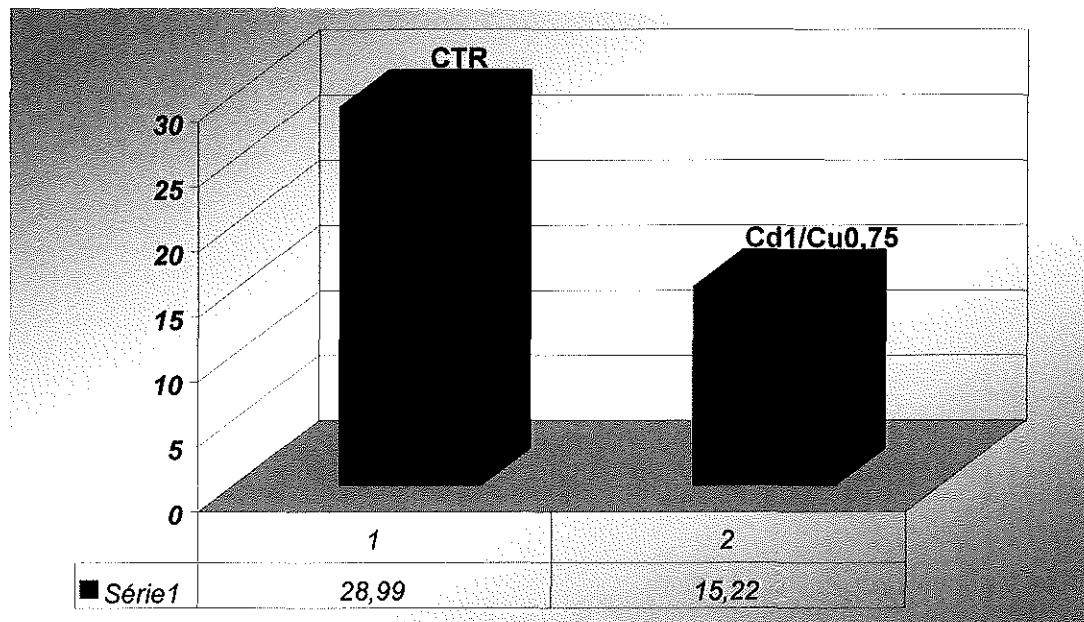
Le graphique ci-dessous représente la viabilité cellulaire des deux lots utilisés pour les expériences.



Graphique 1 : viabilité cellulaire au iodure de propidium des deux lots.

Le lot contrôle (CTR) et le lot test (Cd1/Cu0,75) ont près de 100 % de survie cellulaire après avoir passé 18 H à 15°C.

Le graphique 2 ci-dessous représente l'activité de phagocytose des billes calibrées.



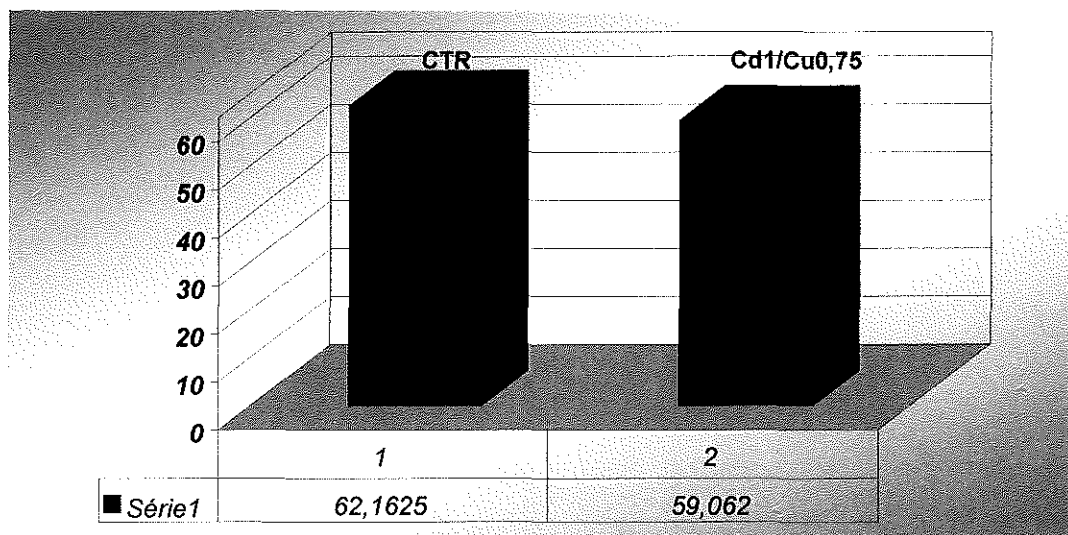
Graphique 2 : phagocytose des billes calibrées par les deux lots d'huîtres.

Le pourcentage de phagocytose du lot contrôle est d'environ 30 % alors que celui du lot test est d'environ 15 %.

L'activité de phagocytose par les hémocytes est un des moyens de défense des huîtres contre les agressions extérieures. Nous remarquons, lors de cette expérience, que les hémocytes des huîtres polluées ont une activité de phagocytose deux fois moins importante que celle du lot témoin. Il est alors logique de penser que les polluants diminuent les défenses immunitaires des huîtres plates.

Nous avons également réalisé une phagocytose du parasite *Bonamia ostreae* afin de connaître le comportement du lot testé par rapport à celui du lot témoin.

Le graphique 3 montre l'activité de phagocytose du parasite pour les deux lots.



Graphique 3 : phagocytose du parasite par les deux lots d’huîtres.

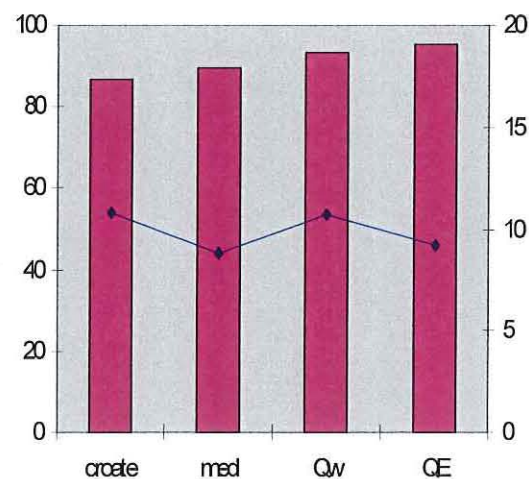
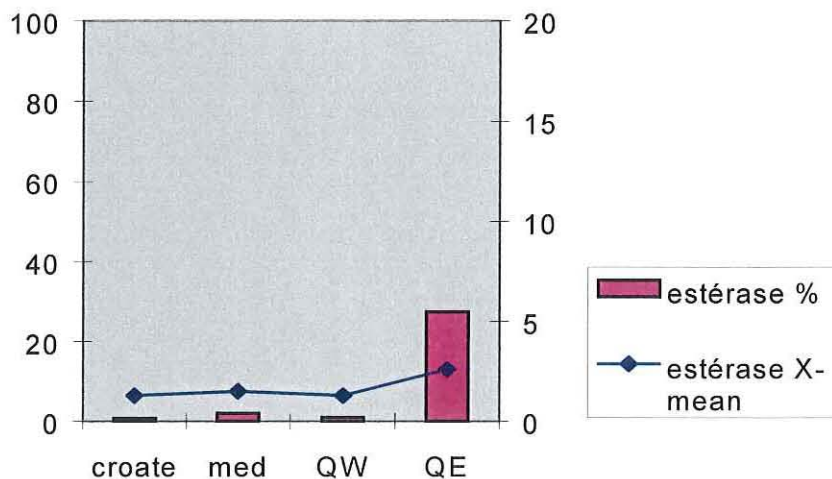
Le pourcentage de phagocytose des deux lots est d’environ 60 %.

Nous pouvons dire que la phagocytose du parasite des hémocytes pollués et celle des hémocytes sains sont identiques.

Ceci nous amène à penser que le parasite, *Bonamia ostreae*, est impliqué dans sa phagocytose par les hémocytes.

Annexe 5 : Comparaison entre les indicateurs enzymatiques avant et après phagocytose du parasite *Bonamia ostreae* (au ratio 1/30).

8.1.1.1 Activité estérase :



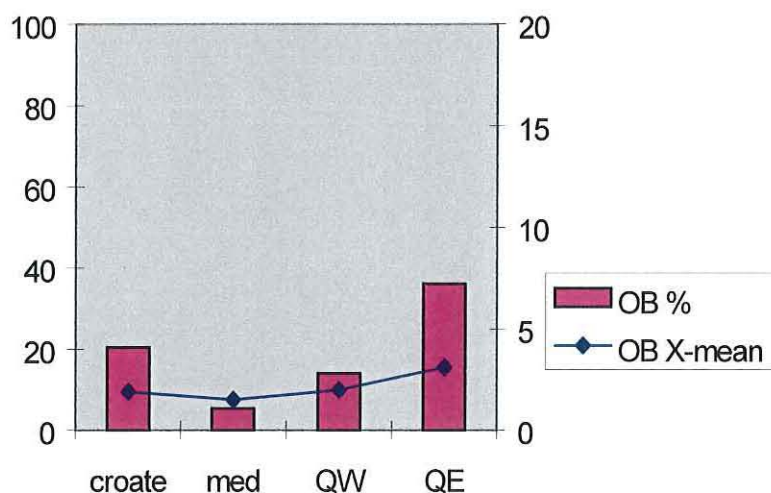
Graphique 1 : activité estérase des populations à 10°C après phagocytose de *Bonamia ostreae*.

Graphique 2 : activité estérase des populations maintenues à 10°C.

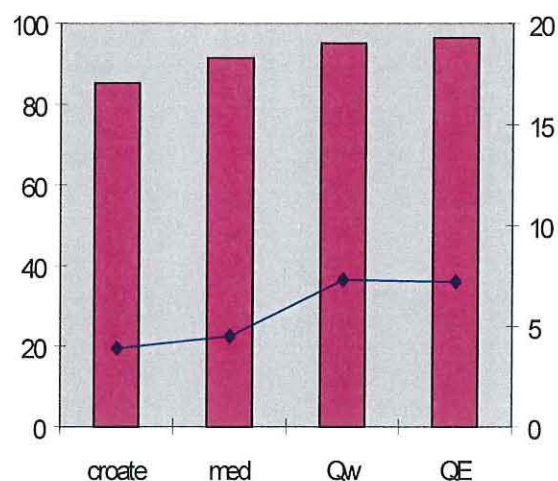
Ces deux graphiques montrent une importante différence au niveau de l'activité estérase. En effet, deux constatations sont clairement visibles :

- Une baisse importante des cellules granuleuses actives est observée pour toutes les populations exceptées pour les huîtres QE.
- Une moyenne de fluorescence nettement plus faible, voir nulle pour les cellules granuleuses. Par contre, nous remarquons que les huîtres QE n'avaient pas la plus forte moyenne de fluorescence avant phagocytose des parasites, et qu'après phagocytose, ce sont les seules huîtres chez lesquelles nous observons une intensité de fluorescence résiduelle.

8.1.1.2 Activité du mécanisme oxydatif :



Graphique 3 : activité oxydative burst des populations à 10°C après phagocytose de *Bonamia ostreae*.



Graphique 4 : activité oxydative burst des populations maintenues à 10°C

Ces deux graphiques montrent également deux grandes différences :

- Un pourcentage de cellules actives beaucoup plus faible mais pas totalement nul. Nous pouvons remarquer que ce sont les huîtres QE qui ont le plus fort pourcentage de cellules actives après la phagocytose du parasite comme avant la phagocytose.

- Nous remarquons également une intensité de fluorescence plus faible lors que les hémocytes ont phagocyté *Bonamia ostreae*. De plus, l'intensité de fluorescence la plus élevée après phagocytose du parasite est celle des huîtres QE.

En conclusion, nous pouvons dire que les hémocytes infectés par le parasite perdent leur atout de défense. Nous remarquons également que seules les huîtres QE gardent encore un peu des indicateurs enzymatiques après la phagocytose du parasite ce qui voudrait dire qu'elles sont encore capables de se défendre contre celui-ci.