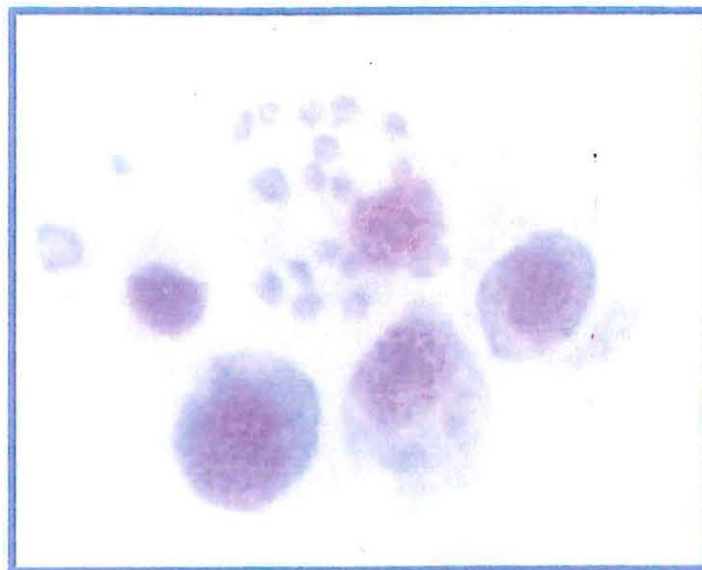


Sandrine GARCIA

1999/2000

Formation complémentaire POST-BTS/DUT
Lycée Technique Saint Louis, Bordeaux

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



Stage encadré par Nathalie COCHENNEC
Au laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie
IFREMER
BP 133, 17390 La Tremblade

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION p.1

RAPPELS p.2

MATERIELS ET METHODES p.5

1.MATERIEL : p.5

1.1.Les huîtres plates, *Ostrea edulis* p.5

1.2.Les huîtres creuses, *Crassostrea gigas* p.5

2.METHODES : p.5

2.1.Préparations hématocytaires : p.5

2.1.1.Prélèvements d'hémolymphe p.5

2.1.2.Apposition cardiaque p.5

2.1.3.Cytocentrifugation p.6

2.1.4.Coloration p.6

2.1.5.Numérations cellulaires p.6

2.2.Cytomètre en flux COULTER EPICS XL : p.6

2.2.1.Présentation du cytomètre p.6

2.2.2.Acquisition et analyse des données p.7

2.3.Technique de marquage par des lectines : p.8

2.3.1.Généralités p.8

2.3.2.Réalisation pratique p.8

2.4.Dosages des activités enzymatiques :	p.9
2.4.1. <u>Kit « CellProbe FDA-Estérase »</u>	p.9
2.4.2. <u>Kit « CellProbe DCFH,PMA-Oxidative Burst »</u>	p.10
2.4.3. <u>Réalisation pratique</u>	p.10
2.5.Kit de phagocytose « Molecular Probes »	p.11
2.6.Kit de mesure de cytotoxicité :kit « LIVE/DEAD Molecular Probes »	p.12

RESULTATS-DISCUSSION	p.14
-----------------------------	------

1.UTILISATION DU CYTOMETRE EN FLUX, POUR CARACTERISER LES POPULATIONS HEMOCYTAIRES DES HUITRES PLATES :	p.14
1.1.Comparaison des numérations faites sur cyto centrifugation et sur cytomètre en flux :	p.14
1.2.Caractérisations enzymatiques :	p.15
1.2.1. <u>Dosage des enzymes de type estérase :</u>	p.15
1.2.1.1.OPTIMISATION DU DOSAGE DE L'ACTIVITE	p.15
1.2.1.2.CARACTERISATION DES POPULATIONS HEMOCYTAIRES D'HUITRES SAINES	p.16
1.2.2. <u>Dosage des enzymes de la flambée oxydative :</u>	p.16
1.2.2.1.OPTIMISATION DU DOSAGE DE L'ACTIVITE	p.16
1.2.2.2.CARACTERISATION DES POPULATIONS HEMOCYTAIRES D'HUITRES SAINES	p.16
1.3.Caractérisation des hémocytes par marquage des lectines	p.17
1.4.Activité phagocytaire des populations hémocytaires :	p.17
1.4.1. <u>Optimisation du kit utilisé :</u>	p.17
1.4.1.1.CHOIX DU TEMPS D'INCUBATION	p.17

1.4.1.2.PASSAGE SUR COUSSIN DE BSA	p.18
1.4.2. <u>Caractérisation des populations hémocytaires d'huîtres saines</u>	p.18
2.ETUDE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES <i>IN VIVO</i> :	p.19
2.1. Comparaison des huîtres plates, <i>Ostrea edulis</i> , et des huîtres creuses, <i>Crassostrea gigas</i>	p.19
2.2. Comparaison d'huîtres plates saines et d'huîtres plates parasitées par <i>Bonamia ostreae</i>	p.20
2.3.Comparaison entre des huîtres plates sauvages (naturelles), des huîtres « témoinsécloserie » et des huîtres résistantes au parasite <i>Bonamia ostreae</i>	p.21
3.ETUDE DE L'ACTIVITE PHAGOCYTAIRE <i>IN VITRO</i> :	p.22
3.1.Comparaison de la phagocytose chez les huîtres plates, <i>Ostrea edulis</i> , et chez les huîtres creuses, <i>Crassostrea gigas</i>	p.22
3.2.Phagocytose du parasite <i>Bonamia ostreae</i>	p.22
3.2.1. <u>Vérification de la phagocytose du parasite <i>Bonamia ostreae</i> :</u>	p.22
3.2.2. <u>Comparaison des activités du mécanisme oxydatif entre hémocytes parasités in vitro et in vivo :</u>	p.23

CONCLUSION	p.25
------------	------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p.26
-----------------------------	------

ANNEXES	p.27
---------	------

REMERCIEMENTS :

Je voudrais, tout d'abord, remercier André Gérard pour m'avoir accueilli au sein de la station IFREMER de La Tremblade et m'avoir, ainsi, permis de découvrir la conchyliculture.

Je tiens à remercier, tout particulièrement, Nathalie pour avoir partagé sa passion de la recherche, ses connaissances et sa joie de vivre tout au long de ce stage enrichissant. Merci aussi pour sa grande disponibilité, ses idées et son aide précieuse.

Un grand merci aussi à tout le personnel titulaire de la station pour leur accueil, leur serviabilité, leur gentillesse et leur bonne humeur.

Sans oublier, M. Vernay, Mme Saleur et Mme Brut, sans qui je n'aurais pas pu faire cette formation ni ce stage.

Mille merci à tous les stagiaires, thésards et CDD : Aline, Sophie, Caro, Marie, Yohann, Laure, Loïc, Aletta, Sébastien, Isabelle, Stéphane, Magalie, Arnaud, Sarah et Maeva.

Enfin, merci pour tout à Maeva, Vaitiare, Doris et Stéphane.

LISTE DES ABREVIATIONS :

BSA	Albumine de Sérum Bovin
DCF	dichlorofluorescéine
DiOC ₁₈	3,3'-dioctadecyloxacarboyanine
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	diacétate de fluorescéine
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FS	« Forward Scatter »
IP	Iodure de Propidium
mOSm	milli Osmoles
mM	milli Molaires
PE	phycoérythrine
SS	« Side Scatter »
tr/min	nombre de tours par minutes

INTRODUCTION

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 disponibles, 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*, l'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 du parasite et les cellules impliquées dans les mécanismes de défense chez les bivalves sont étudiés.

De nombreux travaux ont été réalisés pour établir une classification des différents types cellulaires composant l'hémolymphe des mollusques. Bien qu'il n'y ait pas d'accords sur le nombre et la description des hémocytes, étant donné les multiples caractères possibles utilisés pour les classer (taille, forme, rapport nucléocytoplasmique, affinités tinctoriales et présence d'organites observés en microscopie électronique à transmission), une classification générale, proposée par Cheng (1981) fait l'unanimité. Elle distingue deux grandes catégories, les cellules granuleuses et les cellules agranuleuses.

Une étude précédente chez *Ostrea edulis*, a permis de classer les hémocytes en trois types, les granulocytes, les agranulocytes et les petits hyalinocytes (Cochennec, 1997). Dans un premier temps, nous avons essayé de confirmer cette classification en cytométrie de flux. L'adaptation de ce nouvel outil, nous a permis de tester et de caractériser les activités enzymatiques de chacune des populations hémocytaires, d'une part, puis leur activité phagocytaire, d'autre part.

Cette mise au point étant faite, une comparaison a alors été effectuée par deux approches complémentaires *in vivo* et *in vitro* entre des huîtres creuses et plates, entre des huîtres plates saines et parasitées par *Bonamia ostreae* et enfin entre des huîtres présentant différents statuts de résistance (résistantes et sensibles).

RAPPELS

RAPPELS :

1.L'OSTREICULTURE FRANCAISE :

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 marteiliose (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'encapsidation (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).

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES :

1.MATERIEL :

1.1.Les huîtres plates, *Ostrea edulis* :

Dans cette étude, les huîtres plates utilisées pour valider les différents protocoles sont âgées de deux ans, et sont originaires du bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime). Les animaux utilisés dans le paragraphe 2.2., pour des comparaisons d'activités enzymatiques, ont des origines différentes. Les « sauvages », récoltés quelques mois avant l'expérience dans la baie de Quiberon, sont maintenus en salle de quarantaine au laboratoire IFREMER de La Tremblade. Les « résistants » sont issus de la troisième génération d'une lignée de sélection à la bonamiose et ont été inoculés, en 1995, par une suspension de parasites purifiés. Ils ont ensuite été élevés sur le site de la Trinité Sur Mer (Bretagne), tout comme les « témoins éclosion », qui, eux, sont issus de reproducteurs sauvages. Ces derniers, élevés dans les mêmes conditions que les « résistants », servent de contrôle en indiquant l'état de survie de la population et l'évolution naturelle de la mortalité due au parasite *Bonamia ostreae*.

1.2.Les huîtres creuses, *Crassostrea gigas* :

Utilisées en comparaison avec les huîtres plates, *Ostrea edulis*, dans la validation de nouveaux protocoles, les huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, sont aussi originaires du bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime).

2.METHODES :

2.1.Préparations hématocytaires :

2.1.1.Prélèvement d'hémolymphe :

Après ouverture de la coquille sans trop abîmer la membrane péricardique, l'hémolymphe est prélevée directement dans la cavité péricardique (**Figure 1**) à l'aide d'une seringue stérile de 1 ml munie d'une aiguille et contenant 500 µl de solution de PBS 1100 mOsm ($NaCl$: 29.454g ; $Na_2 HPO_4$ anhydre : 1.48g ; $KH_2 PO_4$: 0.43g ; H_2O distillée : 1000 ml).

2.1.2.Apposition cardiaque :

Cette étape est réalisée uniquement pour les huîtres plates pour vérifier l'état d'infection au parasite *Bonamia ostreae* ; les huîtres creuses étant réfractaires à la bonamiose.

Après ouverture précautionneuse de l'huître, le ventricule est prélevé et essoré sur papier filtre. Une série d'apposition est alors effectuée sur une lame histologique. La préparation est directement colorée avec le kit hémacolor (voir paragraphe 2.1.4.), et examinée au microscope photonique (x1000).

2.1.3. Cytocentrifugation :

Cette technique permet de déposer les hémocytes sur lame histologique à la suite d'une centrifugation à 500 tr/min pendant une minute à l'aide d'une centrifugeuse 16 R (Hettich). La préparation est colorée par le kit hémacolor comme pour les appositions.

2.1.4. Coloration :

Après réalisation, les appositions cardiaques et les préparations cytocentrifugées sont colorées aussitôt à l'aide du kit Hémacolor (Merck). Cette coloration est une variante de la coloration au May-Grünwald Giemsa. Elle consiste en trois bains successifs de quelques secondes dans une solution de méthanol, dans une solution A, puis dans une solution B. Après rinçage à l'eau courante, et séchage à l'air, les lames sont montées entre lame et lamelle dans une goutte d'Eukitt.

2.1.5. Numérations cellulaires :

Pour connaître la concentration cellulaire des prélèvements, un comptage des hémocytes totaux sur cellule de Malassez, est effectué à partir d'un aliquot. Cette étape est nécessaire pour les différents kits de phagocytose utilisés dans cette étude.

Une détermination (par pourcentage) de chaque type hémocytaire est aussi réalisée à partir de chaque cytocentrifugation d'huître saine (**Photo 1**). Par contre, lorsque les huîtres sont parasitées, il est difficile de discriminer les différents types cellulaires du fait de la présence plus ou moins importante du parasite à l'intérieur du cytoplasme (**Photo 2**).

2.2. **Cytomètre en flux COULTER EPICS XL :**

Etant donné que la discrimination, en microscopie photonique, des différentes populations hémocytaires n'est pas satisfaisante, le cytomètre en flux est utilisé.

2.2.1. Présentation du cytomètre :

Le cytomètre de chez BECKMAN-COULTER, utilisé tout au long de cette étude, est un mono-laser capable de mesurer quatre émissions de fluorescence différentes. Il dispose d'un logiciel d'acquisition et de traitement des données qui permet d'automatiser à la fois les

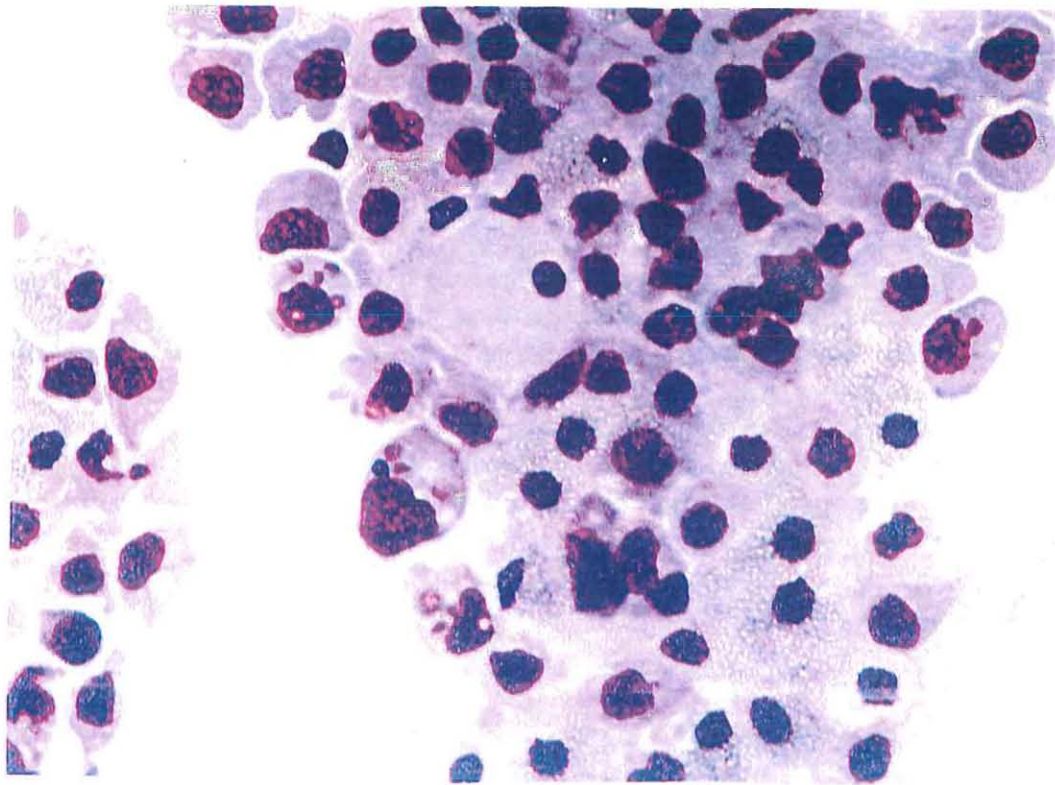


Photo 1 : Hémocytes d'une huître saine, cytocentrifugés et colorés avec le kit Hémacolor (x 1000).

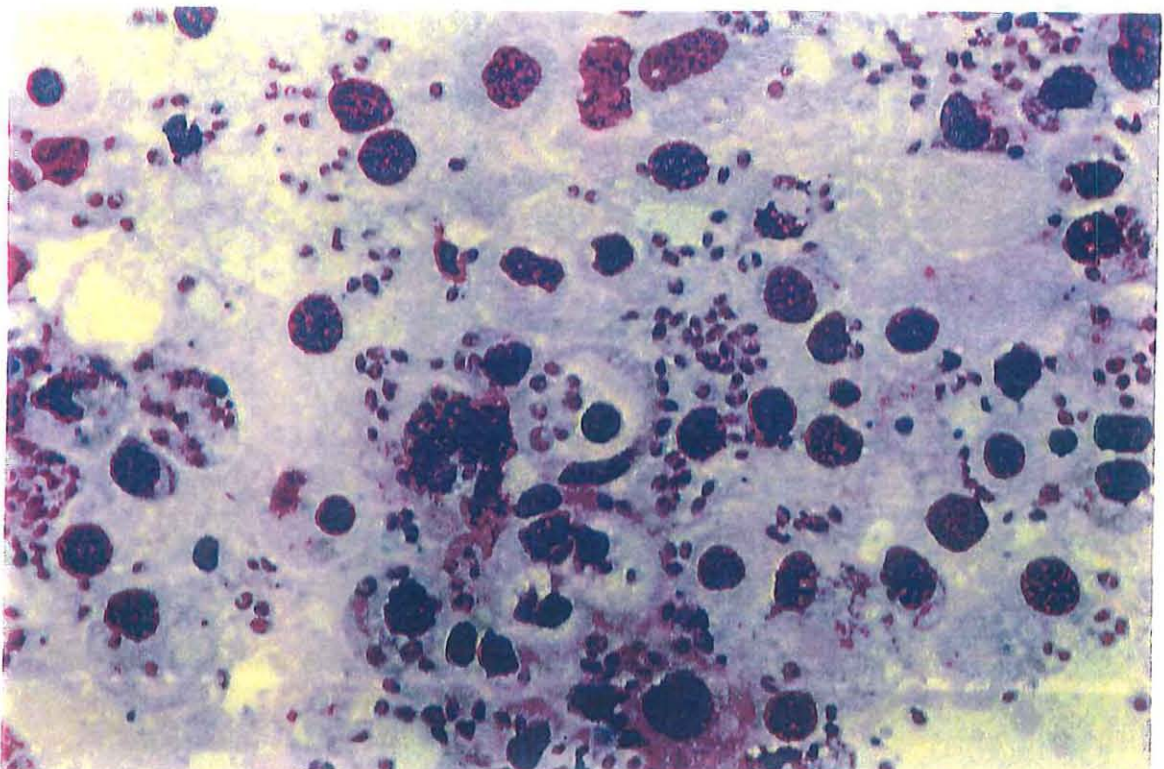


Photo 2 : Hémocytes d'une huître parasitée par *Bonamia ostreae*, cytocentrifugés et colorés avec le kit Hémacolor (x 1000).

réglages du cytomètre et ceux des compensations de fluorescence. En effet, le système à un laser permet une très bonne séparation des émissions des quatre fluorochromes.

La description des différentes parties du cytomètre est détaillée dans la **figure 2**.

2.2.2. Acquisition et analyse des données :

Chaque utilisation du cytomètre nécessite un préchauffage du laser d'au moins une demi-heure, dans un premier temps, et une acquisition de réactif fluorescent spécifique dans un deuxième temps. Ce réactif facilite les réglages automatiques et vérifie le bon fonctionnement du système. Dans notre cas, il est composé de billes fluorescentes Flow-Check (COULTER), qui permettent de vérifier, essentiellement, l'alignement du laser.

Lors d'une acquisition, 10 000 cellules sont focalisées une à une, grâce à un jet liquide, dans un faisceau lumineux excitateur (laser Argon 488 nm). Ainsi, chaque cellule traversant le laser, émet plusieurs signaux lumineux :

- une **diffusion dans l'axe**, recueillie en FS (**figure 3**), essentiellement due à la diffraction de la lumière par la surface membranaire, qui renseigne sur la taille ;
- une **diffusion aux grands angles**, recueillie en SS, provenant de la diffraction de la lumière par les organites intracellulaires, qui est donc liée à la complexité des cellules ;
- et une ou plusieurs **fluorescences**, sélectionnées par différents circuits optiques (**Annexe 1**), composés d'une alternance de miroirs et de filtres interférentiels FL1, FL2 et FL3 (voir **tableau 1** ci-dessous).

Dénomination des signaux	Fluorochromes détectés	Longueurs d'onde en nanomètre sélectionnées par les filtres
FL1	FITC (isothiocyanate de fluorescéine) DiOC ₁₈ (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.

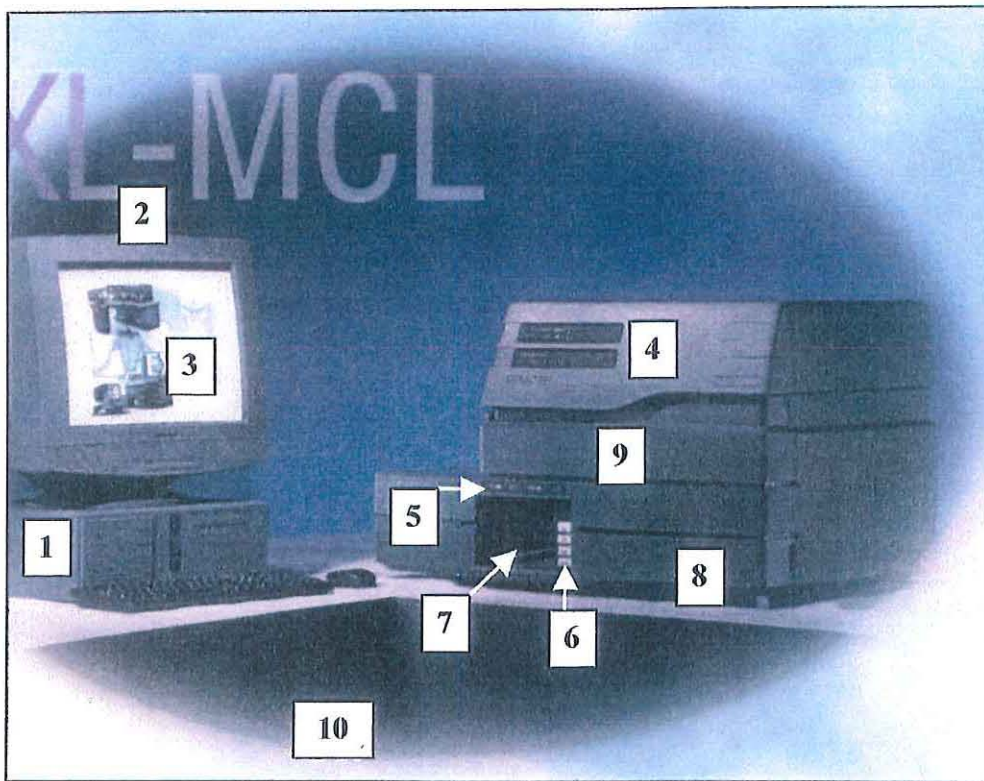


Figure 2 : Photo du cytomètre en flux COULTER EPICS XL

- 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 : Filtrés optiques interchangeables.
- 10 : Réservoir des déchets.

à un niveau d'interférence magnétique.

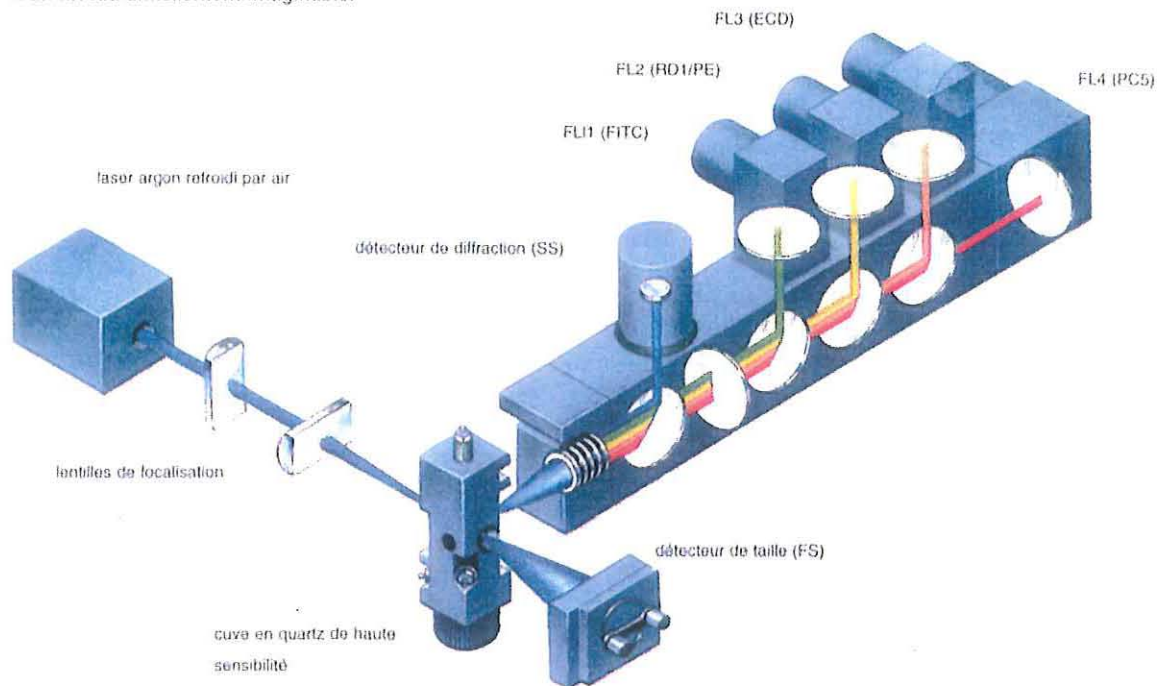


Figure 3 : Schéma du banc optique quatre couleurs, mono-laser, avec six détecteurs et filtres interchangeables.

L'intensité de la fluorescence émise sera fonction du nombre de molécules de fluorochromes fixées sur la cellule. Ces signaux optiques sont convertis en signaux électriques proportionnels, puis numérisés par l'unité informatique. Les données sont alors représentées sous forme d'histogrammes de distribution de fréquence dont l'abscisse représente l'intensité de fluorescence et l'ordonnée le nombre de cellules (**Figure 4 A**).

Un autre graphique représentant la complexité des cellules en fonction de leur taille est étudié. Ce dernier permet de visualiser un nuage de points où chaque point correspond à une cellule (**Figure 4 B**). Pour que toutes les cellules soient présentes sur le graphique, il est possible de faire varier la position de ce nuage en ajustant deux paramètres : le voltage et le gain. Pour la majorité des essais et afin de pouvoir comparer les résultats, les mêmes valeurs de paramètres ont été conservées.

Ces réglages étant définis, une fois l'acquisition terminée, le logiciel permet simultanément de sélectionner et de colorer les événements analysés pour identifier facilement les sous-populations. Dans notre cas, la distinction entre les trois types hémocytaires est effectuée ainsi de façon manuelle et varie d'un individu à l'autre.

2.3. Technique de marquage par des lectines :

2.3.1. Généralités :

Les lectines sont des glycoprotéines présentes aussi bien chez les plantes que chez les mammifères. Elles ont un rôle dans les réponses immunitaires non spécifiques.

Elles sont utilisées pour essayer de discriminer les populations hémocytaires par l'intermédiaire du cytomètre en flux.

2.3.2. Réalisation pratique :

A partir d'hémocytes préalablement fixés avec du glutaraldéhyde ou de l'eau de mer additionnée de 10 % de formol, une centrifugation de 10 minutes à 1000 tr/min est réalisée. Le culot est « lavé » avec 500 µl de « tampon lectine » (*HEPES 10 mM-pH 7.5 :100 ml ; NaCl 0.15M : 0.87 g ; Mg²⁺ 1mM (MgCl₂,6H₂O) : 170 mg ; Ca²⁺ 2.5 mM (CaCl₂,2H₂O) :135 mg*).

Après une deuxième centrifugation, les cellules sont resuspendues dans un volume final de tampon lectine froid de 200 µl pour chaque lectine.

Les lectines utilisées dans cette étude sont toutes couplées à la FITC et sont décrites dans le **tableau 2** ci-après.

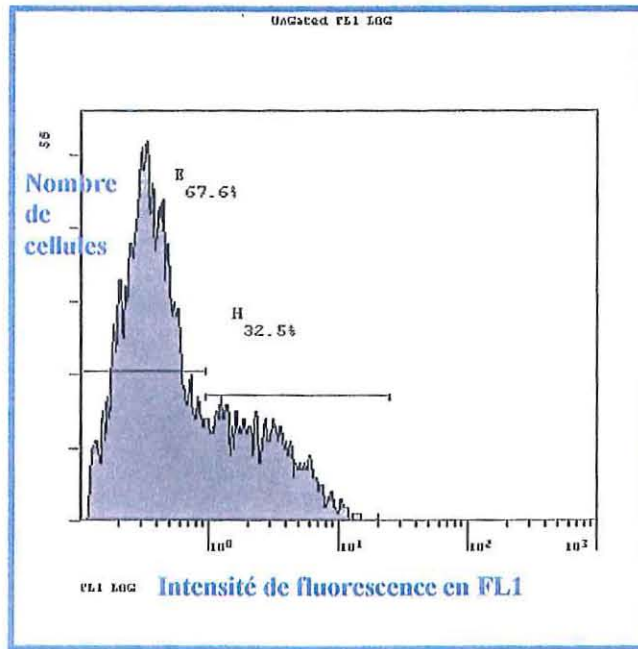


Figure 4 A : Graphe donné par le cytomètre et représentant le nombre de cellules (hémocytes) en fonction de leur intensité de fluorescence émise en FL1.

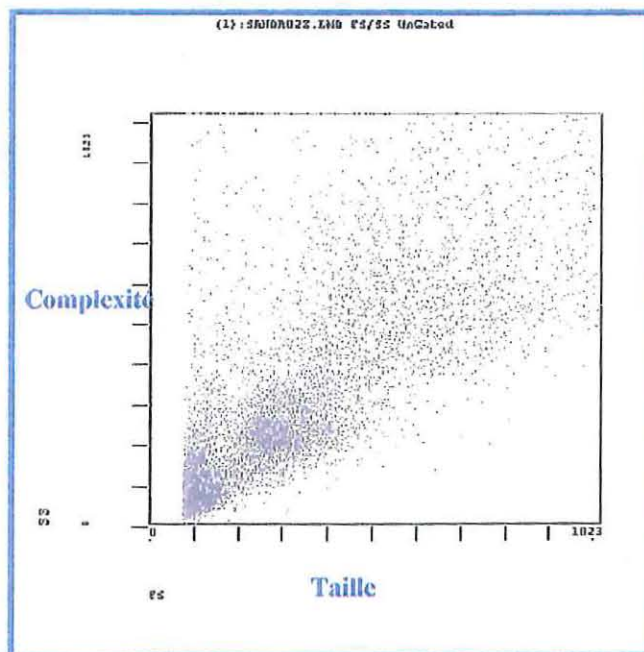


Figure 4 B : Graphe donné par le cytomètre et représentant la complexité des cellules (hémocytes) en fonction de leur taille (chaque point représente une cellule analysée en FS/SS).

Lectines	Oses ou polysides reconnus	Concentration finale en $\mu\text{g/ml}$
Concanavalline A Con A	mannose glucose	1.25
Peanut Agglutinin PNA	galactosyl N- acetylgalactosamine galactose	5
Soybean Agglutinin SBA	N-acetyl galactosamine	5
Ulex Europaeus Agglutinin UEA	fucose	2.5

Tableau 2 : Description des lectines utilisées.

200 μl de la concentration optimale de chaque lectine (Valbiotech) sont additionnés de 200 μl d'hémocytes puis mis à incuber 30 minutes à 4 °C.

Un lavage en tampon lectine est nécessaire avant de resuspendre les cellules dans 300 μl de ce même tampon. Transvasée ensuite dans des tubes « coulter », la solution d'hémocytes est alors prête à être lue par le cytomètre en flux en FL1.

2.4. Dosages des activités enzymatiques :

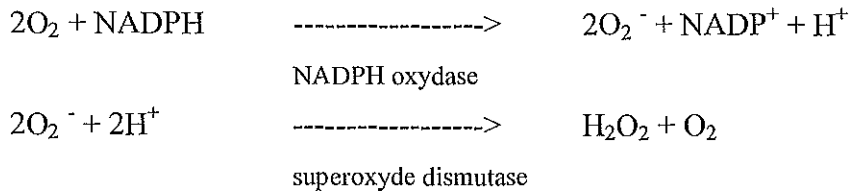
Les enzymes étudiées sont des enzymes intracellulaires impliquées dans les mécanismes de défense (activités post-phagocytaires). Elles sont alors utilisées pour essayer d'améliorer la discrimination des populations hémocytaires et pour en savoir plus sur les mécanismes de défense des hémocytes vis à vis du parasite *Bonamia ostreae*.

2.4.1. Kit « CellProbe FDA-Estérase » :

Le diacétate de fluorescéine (FDA), utilisé dans ce kit, est un substrat de nombreuses estérases non spécifiques. Il est hydrolysé par les estérases présentes, en deux composés dont seulement un est fluorescent. La fluorescence résultante, mesurée en cytométrie en flux, en FL1, permet d'évaluer l'activité enzymatique de l'échantillon.

2.4.2. Kit « CellProbe DCFH,PMA-Oxidative Burst » :

Ce kit contient une molécule de Phorbol Myristate Acetate (PMA), qui jouant le rôle d'une particule étrangère, active la réaction de flambée oxydative de la cellule. Ainsi, les enzymes NADPH oxydase et superoxyde dismutase produisent des anions superoxydes O_2^- et de l'eau oxygénée H_2O_2 suivant les réactions suivantes :



La conversion du diacétate de dichlorofluorescéine (DCFH-DA), composé non-fluorescent, en dichlorofluorescéine (DCF), qui lui est très fluorescent, est alors possible. La fluorescence émise, mesurée en cytométrie en flux, en FL1, correspond à la mesure de la production d' H_2O_2 .

2.4.3. Réalisation pratique :

Après ponction de l'hémolymphe dans la cavité péricardique, une première acquisition, en FS et SS, au cytomètre en flux est réalisée pour chaque huître. En parallèle, des appositions cardiaques sont effectuées pour séparer les huîtres parasitées des non parasitées. Le plus souvent, les non parasitées sont regroupées en pool afin d'avoir suffisamment d'hémocytes d'une part, et pour lisser les variations individuelles d'autre part. Le nuage de points obtenu lors de l'acquisition au cytomètre en flux de ce pool est alors représentatif de la population étudiée.

Ce type d'analyse nécessite 1 ml d'hémolymphe réparti de la façon suivante :

-200 μ l d'hémolymphe pour le dosage de chaque activité enzymatique étudiée auxquels 25 μ l d'enzyme (estérase ou enzyme de la flambée oxydative) sont rajoutés, dans des tubes eppendorfs préalablement chauffés dans un bain-marie à 37 °C ;

-200 μ l d'hémolymphe pour le témoin négatif auxquels 3 μ l d'iodure de propidium (IP) seront rajoutés juste avant l'acquisition pour marquer les hémocytes morts ;

-200 μ l d'hémolymphe pour la cyto-centrifugation.

Le reste d'hémolymphe est fixé dans 600 μ l de glutaraldéhyde (kit COULTER) après centrifugation et sera utilisé ultérieurement pour un marquage des lectines.

Le mélange d'hémocytes et d'enzyme ainsi que le témoin sont mis à incuber pendant 10 minutes à 37 °C pour activer la réaction enzymatique, puis 10 minutes à 4 °C. Les différents mélanges réactionnels sont alors déposés dans des tubes COULTER adaptés au

cytomètre contenant 100 µl de PBS. Ceci pour avoir une quantité suffisante de solution lors de l'acquisition.

Sur les graphes représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence (**Figure 4 A**), les hémocytes ayant une réponse fluorescente au delà de 10^0 , c'est-à-dire possédant une activité enzymatique, sont sélectionnés manuellement. Directement donnés par le cytomètre, les pourcentages correspondants sont recueillis et comparés entre eux.

2.5.Kit de phagocytose « Molecular Probes » :

Le parasite *Bonamia ostreae* étant présent à l'intérieur des hémocytes, l'activité phagocytaire de ces derniers est étudiée. Elle pourrait constituer un marqueur fonctionnel supplémentaire permettant d'améliorer la caractérisation des hémocytes ainsi que les connaissances actuelles sur les mécanismes de défense.

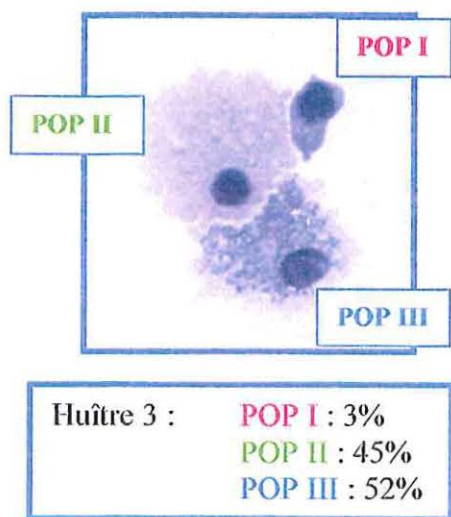
Ce kit permet d'étudier la phagocytose des cellules polynucléaires humaines et des macrophages de souris. Il a été adapté aux cellules des mollusques en ramenant l'osmolarité à 1100 milliOsmoles. La mise en évidence et la quantification de la phagocytose, se fait en suivant l'internalisation d'une particule étrangère, qui est ici, une particule d'*Escherichia coli*, marquée par une molécule fluorescente : isothiocyanate de fluorescéine. Cette technique permet de détecter sélectivement la fluorescence intracellulaire émise par les particules phagocytées, en effet, le marquage des particules extracellulaires est affadi par le rajout de bleu trypan.

Destiné à être réalisé en microplaque, ce test est fait en eppendorf.

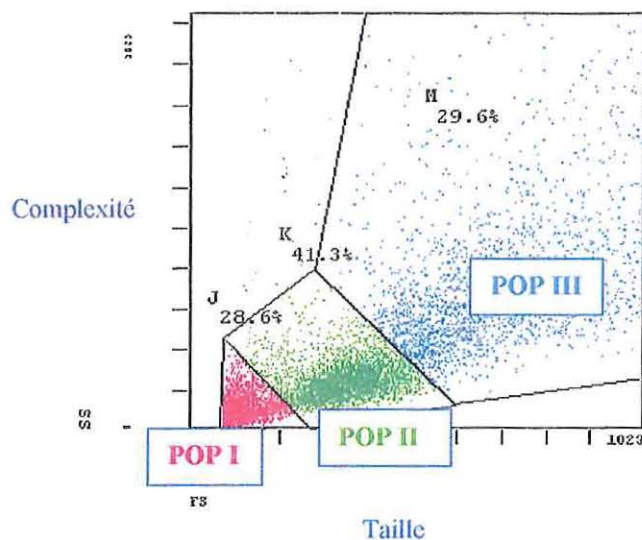
La première étape consiste à ajuster la concentration cellulaire, avec du PBS 1100 mOsm, à 10^6 cellules/ml. Pour la préparation des particules fluorescentes, le tube fourni dans le kit et contenant 5 mg d'*E. coli* en poudre est repris dans 0.5 ml de PBS 1100 mOsm et vortexé fortement dans un premier temps. Puis 4.5 ml de PBS y sont rajoutés avant de vortexer une nouvelle fois pour bien homogénéiser.

Afin de minimiser les erreurs, plusieurs réplicats des différentes analyses sont effectués. Suivant le volume d'hémolymphe dont on dispose, deux ou trois témoins négatifs avec 200 µl d'hémocytes, ainsi que deux ou trois témoins positifs, avec 200 µl d'hémocytes et 200 µl de particules fluorescentes, sont réalisés.

Après un temps d'incubation optimal de 18 heures, à 18 °C et à l'obscurité, les témoins positifs sont centrifugés 10 minutes à 1200 tr/min. Les cellules sont reprises dans 300 µl de bleu Trypan (le tube fourni dans le kit, contenant 1 ml de bleu à 1.25 mg/ml, est repris



6 A



6 B

Figure 6 : Numération en pourcentage des différents types d'hémocytes d'une huître saine sur cyto centrifugation (figure 6 A) et par l'intermédiaire du cytomètre en flux (graphe 6 B).

Avec **POP I** : petits hyalinocytes ;
POP II : agranuleux ;
POP III : granuleux.

	Cytomètre		Cytocentrifugation	
Pool 1	POP I	26.6	POP I	3
	POP II	27.6	POP II	27
	POP III	37.3	POP III	70
Pool 2	POP I	59.2	POP I	12
	POP II	23	POP II	47
	POP III	14.9	POP III	39
Pool 3	POP I	53.7	POP I	10
	POP II	28.6	POP II	38.5
	POP III	21.3	POP III	51.5
Pool 4	POP I	22.4	POP I	32
	POP II	26.6	POP II	40
	POP III	45.6	POP III	28
Huître 1	POP I	65	POP I	39
	POP II	19.3	POP II	60
	POP III	12.6	POP III	6
Huître 2	POP I	42.7	POP I	17
	POP II	24.1	POP II	18
	POP III	32.8	POP III	64
Huître 3	POP I	28.6	POP I	3
	POP II	41.3	POP II	45
	POP III	29.6	POP III	52

Tableau 3 : Numérations en pourcentage faites en parallèle en cytométrie de flux et sur cyto centrifugation sur des huîtres saines (avec **POP I** : petits hyalinocytes ; **POP II** : agranuleux ; **POP III**: granuleux).

dans 4 ml de PBS 1100 mOsm). Afin d'éliminer les particules d'*E. coli* non phagocytées, une centrifugation sur coussin de BSA 6 % (en PBS 1100mOsm) est réalisée.

En parallèle, des mesures d'activités enzymatiques sont réalisées sur les témoins négatifs pour voir l'effet de la phagocytose.

2.6.Kit de mesure de cytotoxicité : kit « LIVE/DEAD Molecular Probes » :

Dans cette étude, ce kit est utilisé essentiellement pour vérifier et comparer les activités phagocytaires des différents types hémocytaires.

Comme pour le kit précédent, il a été adapté à l'osmolarité des cellules de mollusques. Il permet, d'une part, de distinguer les cellules effectrices (dans notre cas les hémocytes), des cellules cibles (les parasites), en marquant dans notre cas, les parasites, avec du 3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine (DiOC₁₈) émettant, après excitation par le laser, une fluorescence en FL1. Après incubation des cellules effectrices avec les cellules cibles, l'ajout d'iodure de propidium qui se fixe sur les acides nucléiques en passant au travers des membranes abîmées permet de marquer les cellules mortes, qui, après excitation par le laser, émettent une fluorescence en FL3.

Le graphe obtenu en cytométrie en flux (**Figure 5**), donnant l'intensité de fluorescence émise en FL3 en fonction de l'intensité de fluorescence émise en FL1 permet de distinguer à la fois les hémocytes **morts** (IP+) n'ayant ingéré aucun parasite marqués (DiOC⁻) en A₁ ; des hémocytes **morts** (IP+) ayant ingéré des parasites marqués (DiOC⁺) en A₂ ; des hémocytes **vivants** (IP-) n'ayant ingéré aucun parasite marqués (DiOC⁻) en A₃ ; des hémocytes **vivants** (IP-) ayant ingéré des parasites marqués (DiOC⁺) en A₄.

En pratique, à partir de parasites purifiés dans la journée (**annexe 2**) et ramenés à une concentration de 1.10^9 parasites/ml, 100 µl de cette suspension de parasites additionnés de 900 µl d'eau de mer filtrée sont marqués par 10 µl de DiOC₁₈ et mis à incuber 20 minutes à 37°C.

En parallèle, les hémocytes prélevés extemporanément sont lavés deux fois dans du PBS 1100 mOsm et ramenés à une concentration de 1.10^6 cellules/ml. Différentes proportions d'hémocytes/parasites sont alors réalisées en triplicats dans des tubes eppendorfs :

- 100µl d'hémocytes + 10µl de parasites (ratio 1 :10 ; 1 hémocyte pour 10 parasites) ;
- 100µl d'hémocytes + 20µl de parasites (ratio 1 :20 ; 1 hémocyte pour 20 parasites) ;
- 100µl d'hémocytes + 30µl de parasites (ratio 1 :30 ; 1 hémocyte pour 30 parasites) ;

ainsi que deux témoins négatifs contenant chacun 100 µl d'hémocytes et deux témoins positifs contenant chacun 100 µl de parasites marqués.

(1):SANDR231.LHD FL1 LOG/FL3 LOG UnGated

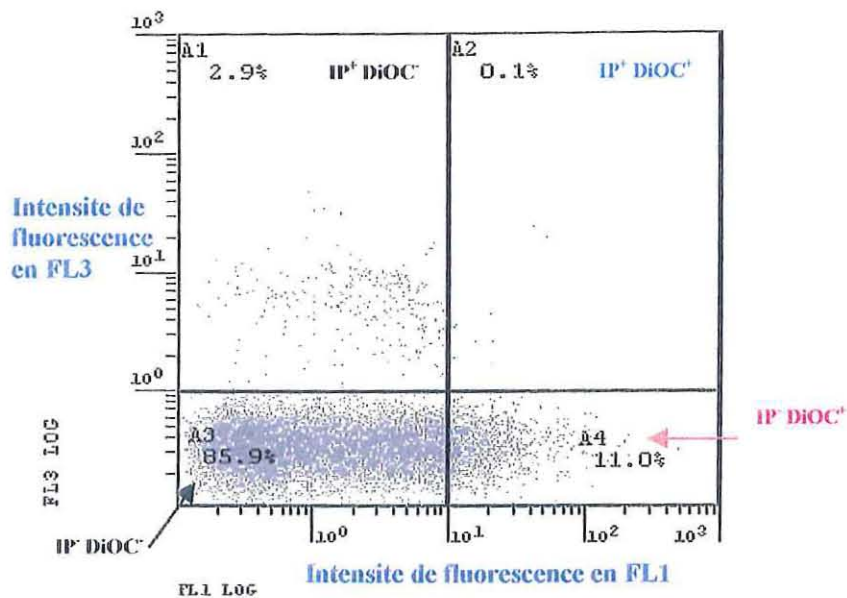


Figure 5: Nuage de points du logarithme de la fluorescence émise en FL3 par l'IP en fonction du logarithme de celle émise en FL1 par le DiOC₁₈. Délimitation des pourcentages :

- d'hémocytes morts (IP⁺) n'ayant ingéré aucun parasite marqué (DiOC⁻) en A₁ ;
- d'hémocytes morts (IP⁺) ayant ingéré au moins 2 parasites marqués (DiOC⁺) en A₂ ;
- d'hémocytes vivants (IP⁻) n'ayant ingéré aucun parasite marqué (DiOC⁻) en A₃ ;
- d'hémocytes vivants (IP⁻) ayant ingéré au moins 2 parasites marqués (DiOC⁺) en A₄ ;

130 μ l d'iodure de propidium (IP) sont ajoutés à chacun de tous ces échantillons. Ce dernier étant préparé par mélange de 40 μ l de la solution d'IP (3.75 mM), fournie dans le kit, à 1 ml de PBS 1100 mOsm.

Après un temps d'incubation de 2 heures, puis de 18 heures, à 18 °C et à l'obscurité, les acquisitions en FL1 et FL3 de chaque tube sont effectuées au cytomètre en flux.

RESULTATS-DISCUSSION

RESULTATS-DISCUSSION :

1.UTILISATION DU CYTOMETRE EN FLUX POUR CARACTERISER LES POPULATIONS HEMOCYTAIRES :

1.1.Comparaison des numérations faites sur cyto centrifugation et sur cytomètre en flux :

La technique d'apposition cardiaque ne permettant pas de définir précisément les différents types cellulaires, la numération se fait après cyto centrifugation et coloration des lames, sur comptage de 100 cellules en microscopie photonique et se base sur des critères essentiellement morphologiques et tinctoriaux. Bien qu'il n'y ait pas d'accords sur le nombre et la description des hémocytes, une classification générale, proposée par Cheng (1981), fait l'unanimité. Elle distingue deux grandes catégories : les cellules granuleuses et les cellules agranuleuses.

Dans notre étude, deux types d'agranuleuses sont distinguées, ce qui ramène à trois types d'hémocytes différents (**Figure 6 A**):

- Les hémocytes granuleux (POP III) contiennent des granulations en nombre et de forme variables. De taille plutôt variable, ils ont un rapport nucléo-cytoplasmique faible.
- Les grandes cellules agranuleuses (POP II) possèdent un cytoplasme gris rosé homogène. De taille variable, elles ont aussi un rapport nucléo-cytoplasmique faible.
- Les petits hyalinocytes (POP I) se différencient des autres cellules par un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Ils possèdent un mince cytoplasme bleu foncé (basophile) qui, pour certains, présente de courts prolongements. Leur taille est variable.

En ce qui concerne la numération par l'intermédiaire du cytomètre en flux, elle est effectuée manuellement grâce au graphe représentant la complexité des 10 000 cellules en fonction de leur taille. Les trois populations visualisées par trois nuages de points distincts sont encadrées une à une, le cytomètre donnant alors les pourcentages correspondants (**Figure 6 B**). Mais la somme des trois pourcentages obtenus n'est pas de 100 %, en effet, de nombreuses cellules plus ou moins isolées se situent entre les nuages. Elles correspondent soit à des impuretés, lorsqu'elles sont de petites tailles et peu complexes, soit à des cellules peu caractéristiques de chacun des types cellulaires.

L'analyse des résultats obtenus (**Tableau 3**), montre une grande hétérogénéité des numérations. La répartition des trois populations est différente entre l'évaluation faite au cytomètre et celle faite sur cyto centrifugation. Il n'y a donc aucune corrélation nette entre ces deux types de numérations. Ceci peut s'expliquer par le fait que, sur cyto centrifugation, la

numération est assez aléatoire. En effet, elle dépend de l'opérateur qui a tendance à choisir les cellules les plus caractéristiques, comme les granulocytes par exemple, que l'on retrouve alors en grand nombre. Alors que les petits hyalinocytes, qui sont parfois de même taille et de même aspect (cytoplasme clair) que les agranuleux, sont soit évités, soit mal définis. La lecture en microscopie optique est donc trop subjective.

Le cytomètre qui se base à la fois sur des critères de taille et de complexité, permet un comptage sur un nombre de cellules beaucoup plus important (100 fois plus). Cette dernière numération semble donc être la plus représentative des populations hématocytaires. En effet, même s'il n'est pas possible de discriminer très clairement les trois populations définies en microscopie optique, un profil général semble ressortir de toutes les analyses effectuées. Cette hétérogénéité des résultats est confirmée par une autre technique : l'analyse d'images informatiques, en microscopie optique, basée sur des paramètres morphométriques, qui n'a pas permis, non plus, de caractériser précisément les trois types hématocytaires préalablement définis (Segretin.A, 1997).

1.2. Caractérisations enzymatiques :

Etant donné que la discrimination des trois types hématocytaires n'est pas clairement définie, une caractérisation enzymatique est effectuée pour essayer de déterminer de nouveaux marqueurs caractéristiques de chacune des populations hématocytaires.

Durant toute cette étude, pour chaque huître et pool analysé, des témoins sans marquage (négatifs) sont réalisés. Ils présentent tous un pic en deçà de 10^0 , qui permet de définir toute réponse au delà de 10^0 comme positive (**Figures 7 A et B**).

1.2.1. Dosage des enzymes de type estérase :

1.2.1.1. OPTIMISATION DU DOSAGE DE L'ACTIVITE :

Le protocole du kit, adapté aux cellules humaines, précise un temps d'incubation de 5 minutes exactement à 37°C suivi de 3 minutes minimum dans la glace. Pour optimiser nos études, plusieurs temps d'incubation à 37°C ont été testés. Les activités des estérases sur deux pools d'huîtres plates saines à différents temps d'incubation sont présentés dans la **figure 8**, où tous les graphes sont à la même échelle (56 cellules en ordonnée).

Pour l'activité des estérases, l'intensité de réponse fluorescente maximale est observée au bout de 5 minutes pour le pool 1 et au bout de 10 minutes pour le pool 2. Mais au delà de 15 minutes, le nombre d'hématocytes ne présentant pas d'activité estérase augmente. Le temps d'incubation retenu sera donc de 10 minutes pour l'activité estérase.

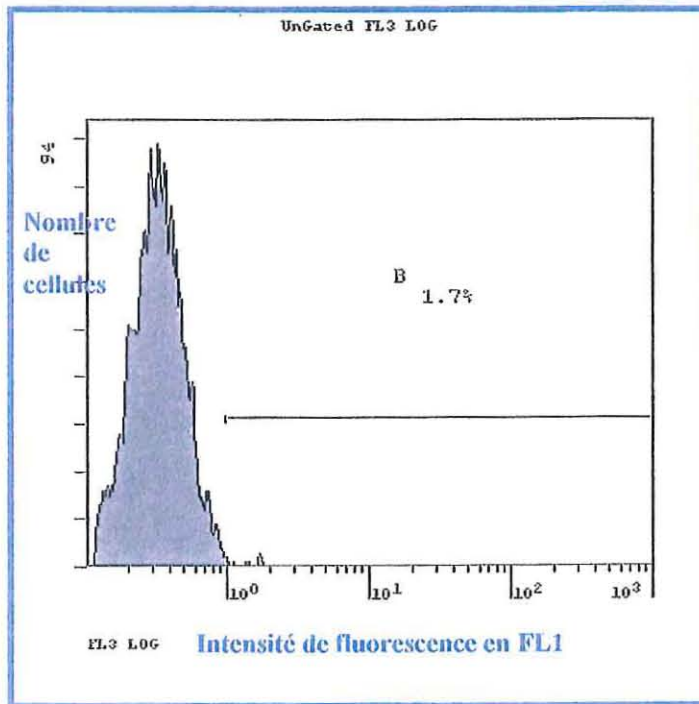


Figure 7 A : Graphe du nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence pour un témoin sans marquage.

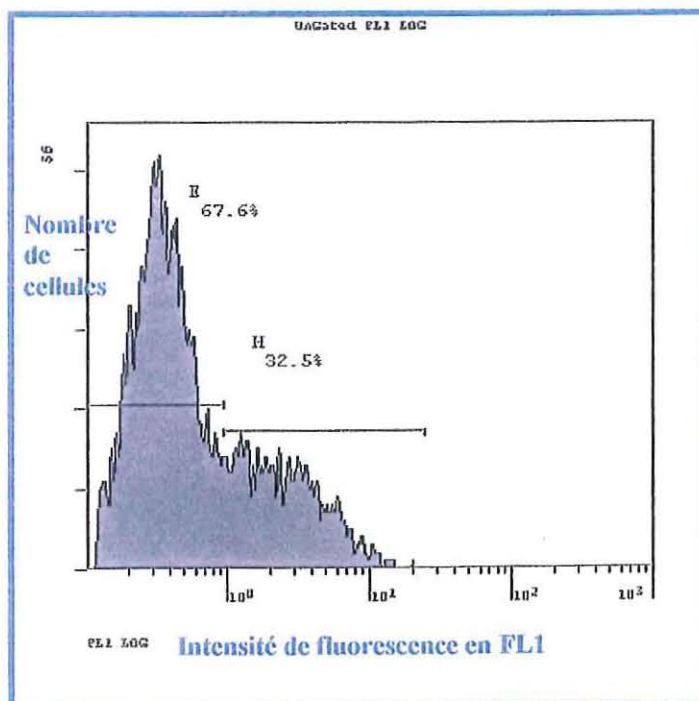


Figure 7 B : Graphe du nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence pour des hémocytes activés enzymatiquement.

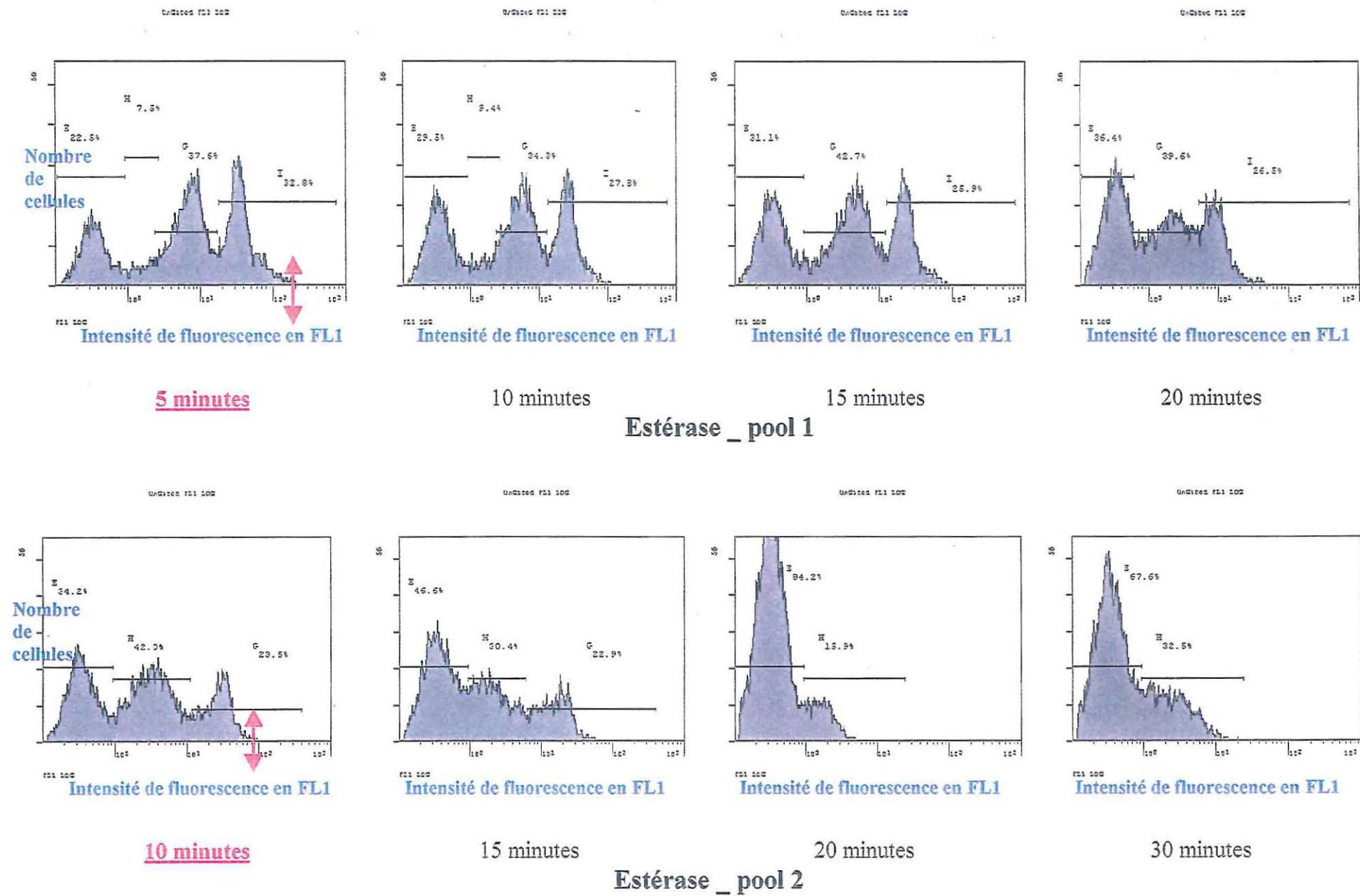


Figure 8 : Ensemble des pourcentages d'hémocytes présentant des activités estérases chez deux pools d'huîtres plates.

1.2.1.2. CARACTERISATION DES POPULATIONS HEMOCYTAIRES D'HUITRES SAINES :

Une fonction intéressante du cytomètre en flux est exploitée pour permettre de discriminer l'activité enzymatique des trois types hémocytaires chez des huîtres saines. La sélection d'un nuage de points correspondant à un type hémocytaire donné colore automatiquement ce dernier sur le graphe représentant la complexité des cellules en fonction de leur taille (**Figure 9 A**). Il est ensuite possible de faire apparaître cette population, en couleur, sur le graphe donnant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence. La comparaison avec l'activité enzymatique de la totalité des hémocytes, apparaissant sur ce même graphe en trame de fond grise, est alors possible (**Figure 9 B**).

Pour les graphes **B**, **C**, **D** de la **figure 9**, illustrant la démarche décrite ci-dessus, toute réponse au delà de 10^0 est considérée comme positive. Ainsi, pour l'activité des estérases, la population des granuleux (POP III) est celle qui possède le plus grand nombre d'individus (pic le plus élevé) et aussi celle qui émet une réponse fluorescente la plus importante (pic le plus à droite sur l'échelle de l'intensité de fluorescence). Cette population semble développer une activité estérase très intense. Viennent ensuite les agranuleux (POP II), et il semblerait que le nuage de points correspondant à ce que l'on suppose être les petits hyalinocytes (POP I) ne réponde quasiment pas (la majorité des cellules ont une réponse en deçà de 10^0).

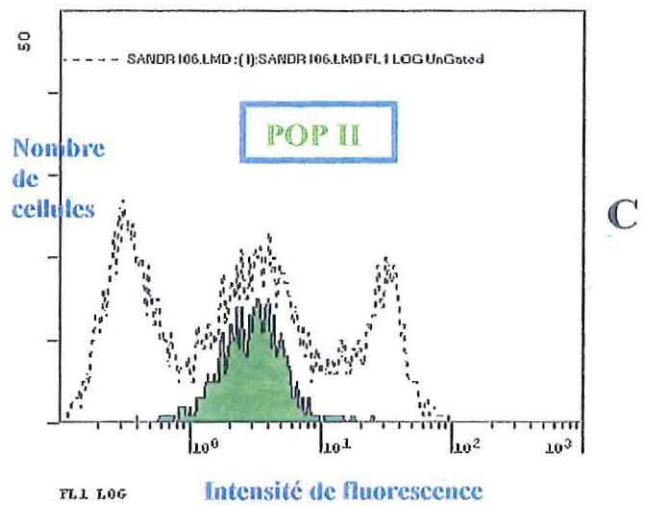
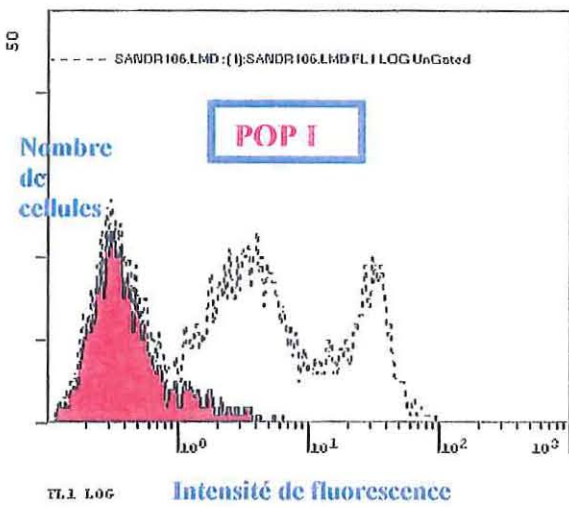
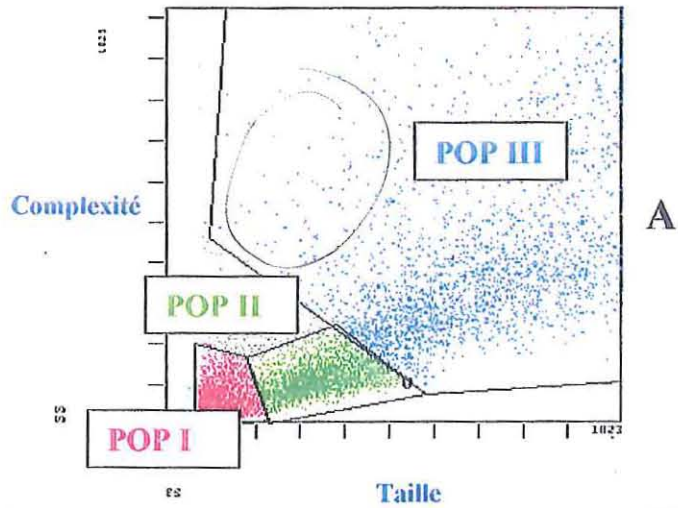
1.2.2. Dosage des enzymes de la flambée oxydative :

1.2.2.1. OPTIMISATION DU DOSAGE DE L'ACTIVITE :

En ce qui concerne l'activité des enzymes de la flambée oxydative, l'intensité de réponse fluorescente maximale est observée au bout de 10 minutes pour les deux pools (**Figure 10**). Et contrairement à l'activité des estérases, au delà de 15 minutes quasiment tous les hémocytes semblent avoir une activité, qui pourrait correspondre à un plateau d'activité maximale. Le temps d'incubation retenu est alors de 10 minutes. Finalement, les meilleurs résultats pour les deux activités sont obtenus pour un temps d'incubation de 10 minutes à 37°C suivi de 10 minutes dans la glace.

1.2.2.2. CARACTERISATION DES POPULATIONS HEMOCYTAIRES D'HUITRES SAINES :

De même que pour l'activité des estérases, la population d'hémocytes granuleux (POP III) répond plus intensément que celle des cellules agranuleuses (POP II) en ce qui concerne l'activité des enzymes de la flambée oxydative (**Figure 11**).



(1): SANDR106.LMD FL1 LOG H

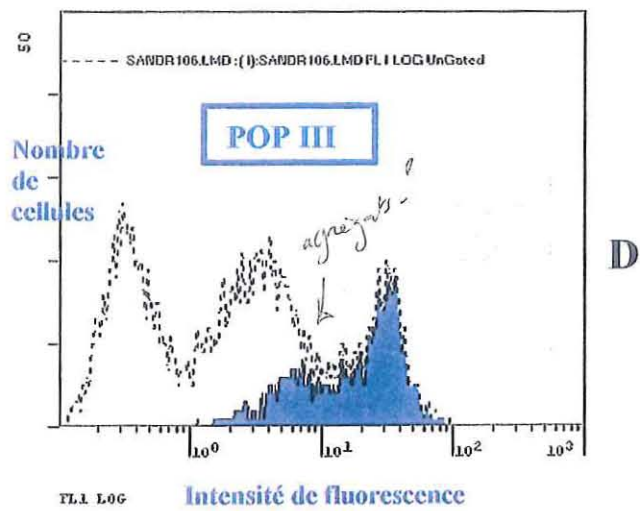


Figure 9 : Caractérisation de l'activité estérase de chaque population hémoctaire.

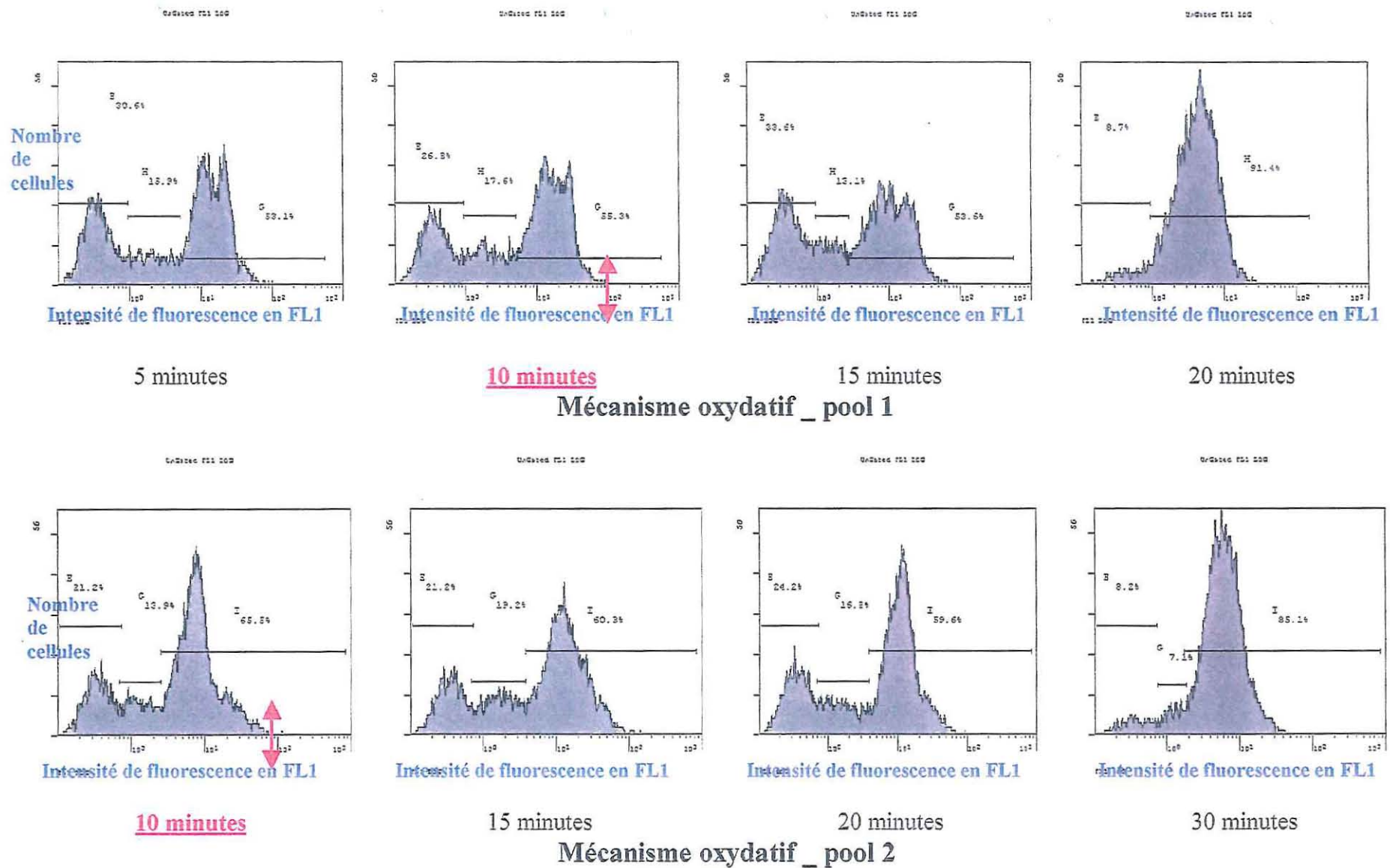
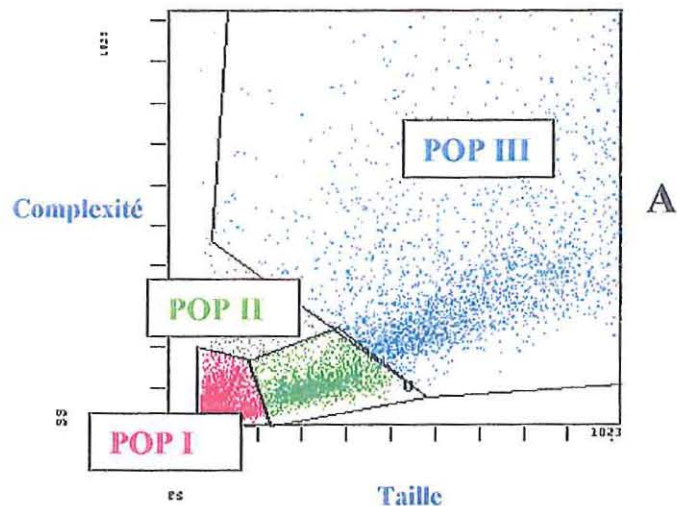
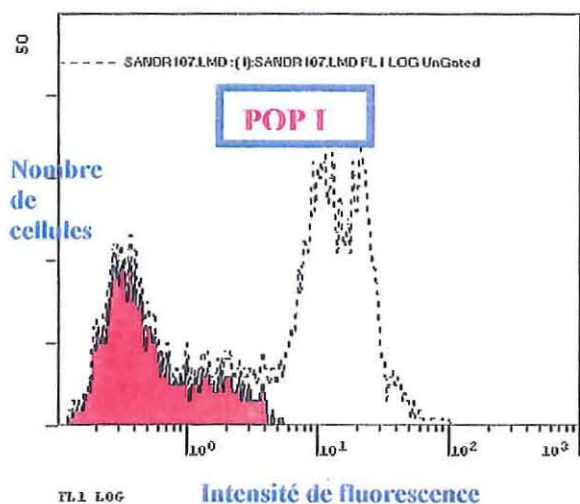


Figure 10 : Ensemble des pourcentages d'hémocytes ayant une activité oxydative chez deux pools d'huîtres plates à différents temps d'incubation.

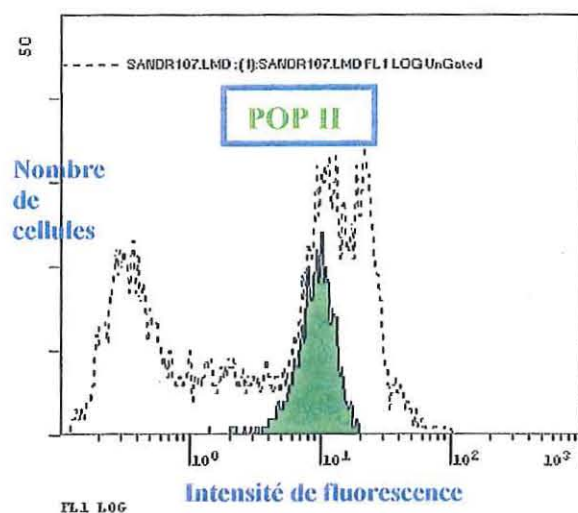


(1): SANDR107.LMD FL1 LOG A

(1): SANDR107.LMD FL1 LOG G

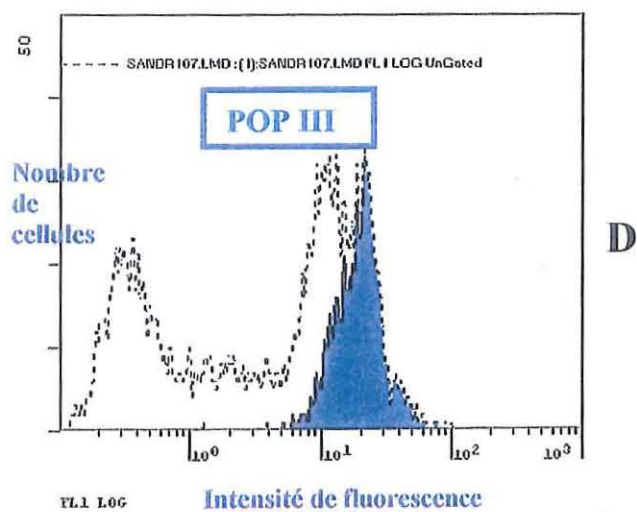


B



C

(1): SANDR107.LMD FL1 LOG H



D

Figure 11 : Caractérisation de l'activité oxydative de chaque population hémoctaire.

De plus, pour l'ensemble des huîtres étudiées, on a remarqué qu'une activité enzymatique estérase élevée est souvent accompagnée d'une activité oxydative importante. Il semblerait alors que certaines huîtres sont prédisposées à avoir des activités enzymatiques élevées. Il pourrait être intéressant d'approfondir ce phénomène par des études supplémentaires.

1.3. Caractérisation des hémocytes par marquage des lectines :

Mises en évidence chez la moule, *Mytilus edulis*, à la surface des hémocytes, les lectines pourraient constituer un autre type de marqueur permettant de discriminer les différents types hémocytaires.

A la suite des travaux effectués par Benoît Espiau l'année dernière, Monsieur Auffret, de l'Institut Universitaire Européen de la mer (Plouzane), a réalisé un protocole de marquage des hémocytes par diverses lectines, adapté au cytomètre en flux. Dans notre étude 4 lectines ont été utilisées : la Concanavaline A, reconnaissant deux types d'hémocytes, et PNA, SBA et UEA reconnaissant un seul type d'hémocyte.

Malgré l'utilisation du même protocole, les résultats obtenus sont très faibles et non comparables à ceux obtenus par Michel Auffret. Le problème vient peut être de la fixation des hémocytes, en effet, la comparaison des nuages de points des pools, avant et après fixation, montre une nette différence (**Figure 12**). Après fixation, les trois populations ne sont plus du tout distinctes, il semblerait qu'elles se dégradent. La technique de fixation est donc à revoir.

1.4. Activité phagocytaire des populations hémocytaires :

1.4.1. Optimisation du kit utilisé :

Initialement prévu pour des cellules de vertébrés, le tampon utilisé pour remettre les cellules en suspension, pour diluer les particules d'*E. coli* et le bleu Trypan, est remplacé par du PBS à 1100 mOsm. De plus, au lieu d'être réalisée en microplaque permettant l'adhésion des cellules, la réaction est faite en tube eppendorf.

1.4.1.1. CHOIX DU TEMPS D'INCUBATION :

Dans le kit, le temps d'incubation recommandé, des hémocytes avec les particules d'*E. coli* marquées, est de 2 heures. Lors de notre manipulation, nous avons effectué un temps d'incubation supplémentaire de 18 heures. Les résultats obtenus (**Figure 13**) montrent un pourcentage d'hémocytes phagocytant plus important après 18 heures d'incubation (87.8%) qu'après 2 heures (44.3%).

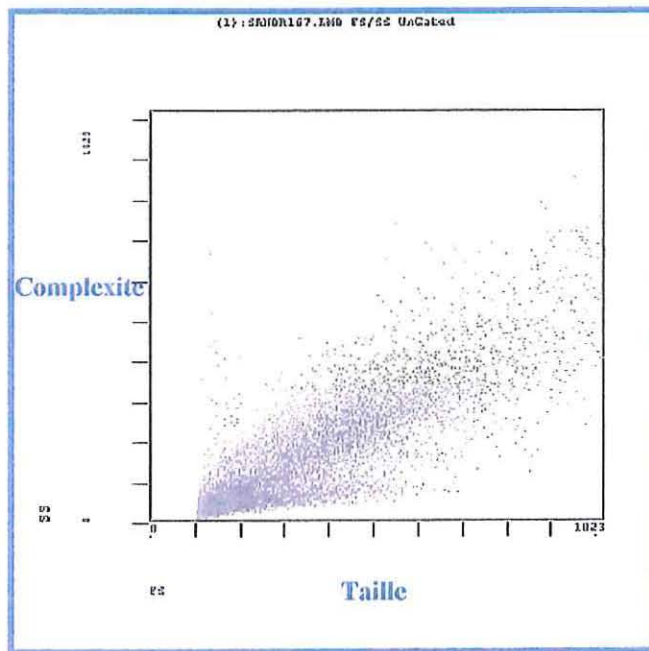
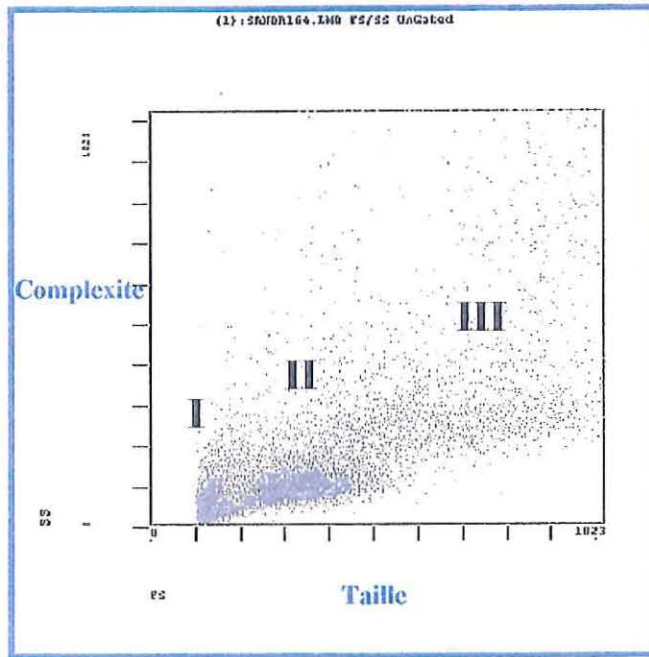


Figure 12: Nuage de points d'un pool d'huîtres plates, saines, avant (A) et après (B) fixation.

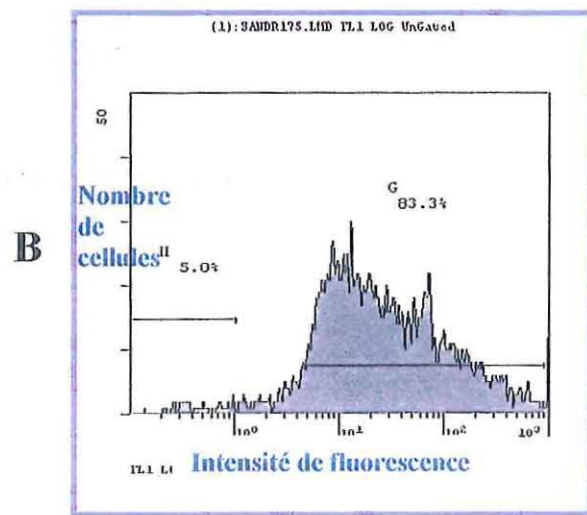
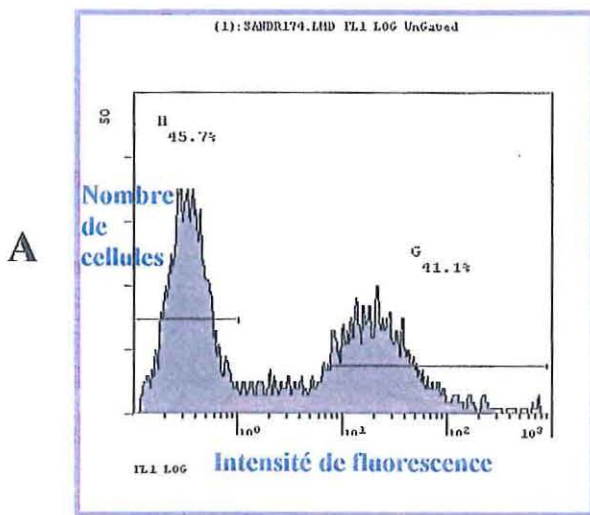


Figure 13: Pourcentage d'hémocytes ayant phagocyté (au delà de 10^0), après 2 heures (A) et 18 heures d'incubation (B).

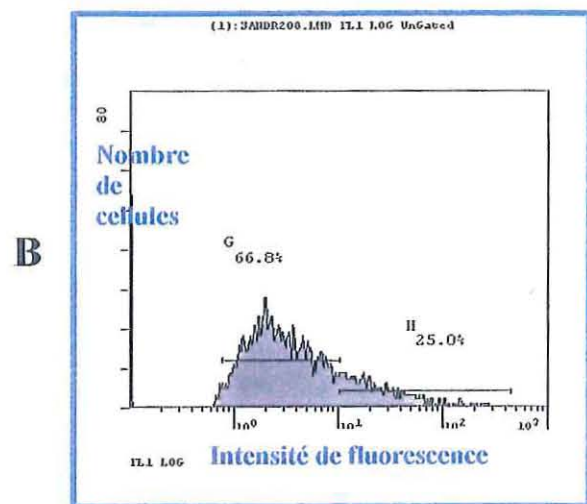
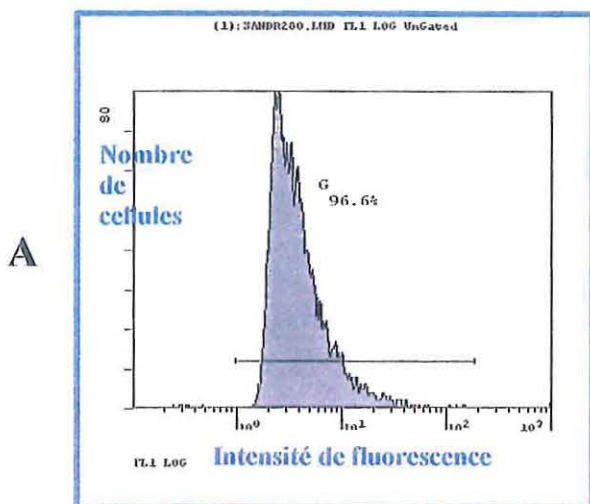


Figure 14 : Intensité de fluorescence des particules d'*E.coli* marquées seules (A) et en présence de bleu Trypan (B).

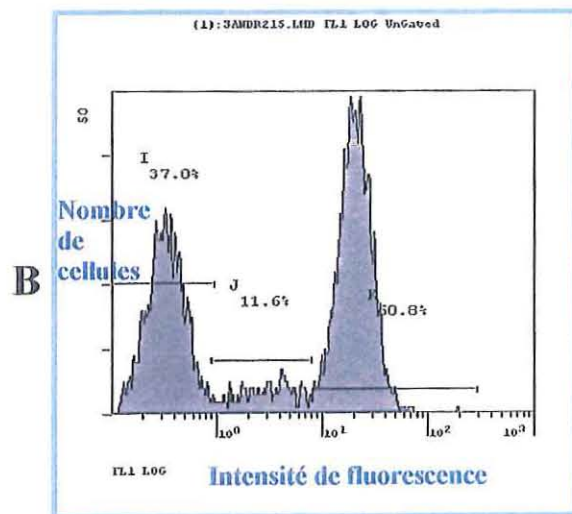
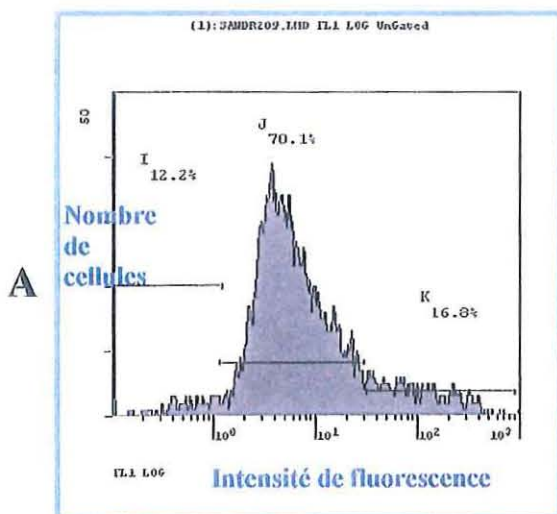


Figure 15 : Intensité de fluorescence de la préparation hémocytaire en présence de bleu trypan, avant passage sur coussin de BSA 6% (A) et après passage sur coussin de BSA 6% (B).

1.4.1.2.PASSAGE SUR COUSSIN DE BSA :

L'observation de l'intensité de fluorescence des particules d'*E.coli* (**Figure 14 A**), montrant un pic important entre 10^0 et 10^1 , confirme une forte fluorescence. L'ajout de bleu Trypan (**Figure 14 B**), confirme l'affadissement de la fluorescence des particules seules.

Après incubation avec les particules d'*E.coli* marquées, la préparation hémocytaire en présence de bleu (**Figure 15 A**) montre un pic important situé essentiellement entre 10^0 et 10^1 similaire au graphe cité précédemment. Il correspond donc, en partie, aux particules d'*E.coli* seules, non phagocytées. Représentant 70% du marquage, ces particules isolées, masquent les résultats de phagocytose. On a essayé de les éliminer sur un coussin de BSA 6%.

Après prélèvement de l'interface, le pic de marquage obtenu est situé entre 10^1 et 10^2 (**Figure 15 B**). Ce résultat montre que cette fluorescence ne provient pas d'une seule particule d'*E.coli* phagocytée ou fixée à la surface d'un hémocyte, mais d'au moins deux ou plus de particules phagocytées. Ce pic correspond à un nombre important d'hémocytes (50.8%) qui ont phagocyté des particules d'*E.coli* marquées.

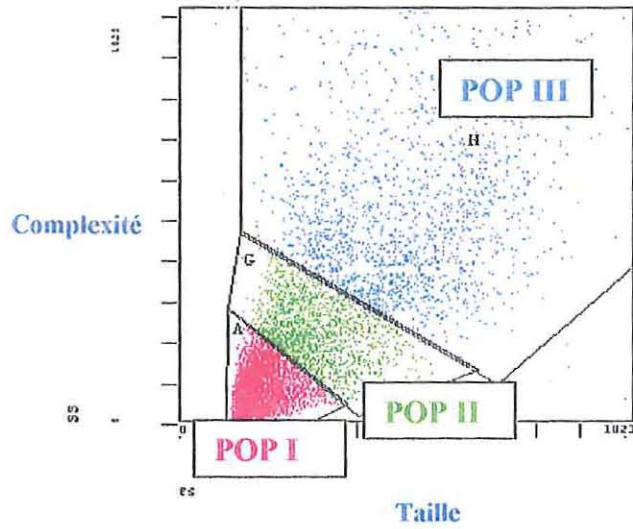
1.4.2.Caractérisation des populations hémocytaires d'huîtres saines :

Toujours effectuée grâce au logiciel du cytomètre en flux, la caractérisation de l'activité phagocytaire de chaque population hémocytaire, donne une répartition à peu près équivalente à celle obtenue pour les activités enzymatiques.

En effet, même si une partie des granulocytes ne présente aucune activité phagocytaire, ce sont ces cellules qui phagocytent le plus grand nombre de particules d'*E.coli*. Comme l'indique la **Figure 16**, le pic obtenu avec ces derniers (POP III) situé entre 10^2 et 10^3 , est celui qui présente le maximum d'intensité fluorescente, donc le nombre de particules ingérées le plus important. Pour ce qui est des agranulocytes (POP II), ils ont **tous** une importante activité phagocytaire à peine plus faible que les granulocytes.

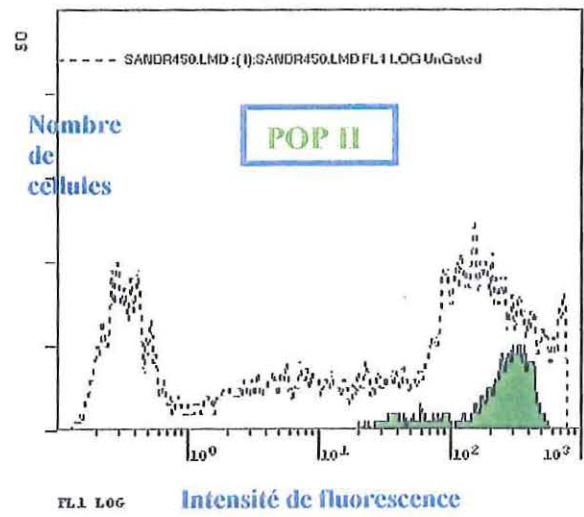
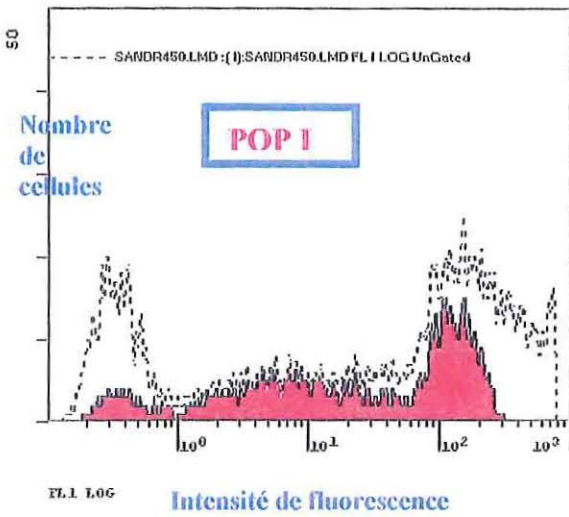
En ce qui concerne les petits hyalinocytes (POP I), alors qu'ils ne présentent aucune activité enzymatique, une bonne partie d'entre eux possède une activité phagocytaire. En effet, le pic en 10^2 sur la **Figure 16**, prouve l'ingestion, par ces derniers, d'une quantité non négligeable de particules marquées. Par contre la fluorescence entre 10^0 et 10^1 provient sûrement des particules libres non éliminées lors du passage sur coussin de BSA.

(1): SANDR450.LMD F2/S2 UnGated



(1): SANDR450.LMD FL1 LOG A

(1): SANDR450.LMD FL1 LOG G



(1): SANDR450.I

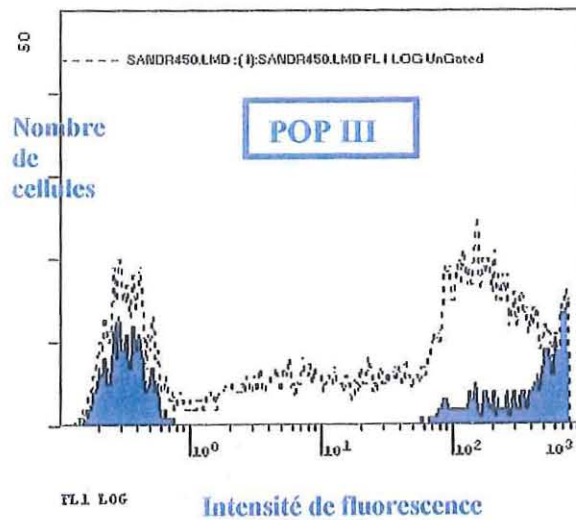


Figure 16 : Caractérisation de l'activité phagocytaire de chaque population hémoctaire.

2.ETUDE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES *IN VIVO* :

Toutes les manipulations suivantes ont été réalisées sur des hémocytes vivants. Elles ont été réalisées afin d'essayer de répondre, en partie aux questions suivantes :

Quels sont les mécanismes mis en jeu par les huîtres plates pour se défendre contre le parasite *Bonamia ostreae* ?

Y-a-t'il des différences d'activités enzymatiques entre les deux espèces d'huîtres, une sensible, l'autre non à la Bonamiose ?

Comment comprendre les phénomènes impliqués dans la résistance ?

2.1.Comparaison des huîtres plates, *Ostrea edulis*, et des huîtres creuses, *Crassostrea gigas* :

Les deux activités enzymatiques ont été recherchées, dans un premier temps, sur 2 huîtres plates et 2 huîtres creuses. Puis, afin de lisser la variabilité individuelle et surtout pour confirmer les résultats obtenus, les activités enzymatiques ont été évaluées, de nouveau, sur un pool de 3 huîtres plates et 3 huîtres creuses.

Les **Tableaux 4 et 5** sont réalisés à partir des graphes représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence (voir M&M paragraphe 2.4.3.). Il apparaît clairement sur ces derniers que les huîtres creuses ont un pourcentage d'hémocytes enzymatiquement actifs pour les estérases plus important (73.5%) que les huîtres plates (39.6%). Ce qui n'est pas le cas pour la flambée oxydative dont les pourcentages restent équivalents, respectivement 82.8% et 84.8%.

Ce résultat est visualisé très nettement sur la **Figure 17** superposant les réponses des huîtres plates et creuses pour chaque activité enzymatique. Mais, une information supplémentaire est apportée par le graphe B de la **Figure 17**, concernant l'activité des enzymes de la flambée oxydative ; alors que le pourcentage d'hémocytes actifs est à peu près équivalent entre les creuses et les plates, les hémocytes des creuses répondent beaucoup plus fortement que ceux des plates. C'est-à-dire que la production de molécules toxiques est plus importante chez les hémocytes d'huîtres creuses que chez les hémocytes d'huîtres plates.

Ceci pourrait s'expliquer par une répartition des populations hémocytaires différentes entre les huîtres creuses et les huîtres plates. Les granulocytes sont reconnus pour avoir des activités enzymatiques supérieures aux deux autres populations hémocytaires. On pourrait alors penser que les huîtres creuses en possèdent une plus grande quantité que les huîtres plates. Cependant, après sélection de la population la plus complexe (supposée correspondre aux cellules granuleuses), le cytomètre en flux donne des pourcentages équivalents pour les

	Huître plate 1	Huître plate 2	Pool de 3 huîtres plates	Moyennes
Esterase	31.4	46.3	41.1	39.6
Flambée oxydative	84.5	85.1	-	84.8

Tableau 4 : Pourcentages des activités enzymatiques d'hémocytes d'huîtres plates.

	Huître creuse 1	Huître creuse 2	Pool de 3 huîtres creuses	Moyennes
Esterase	76.4	73.7	70.4	73.5
Flambée oxydative	88.0	72.4	88.0	82.8

Tableau 5 : Pourcentages des activités enzymatiques d'hémocytes d'huîtres creuses.

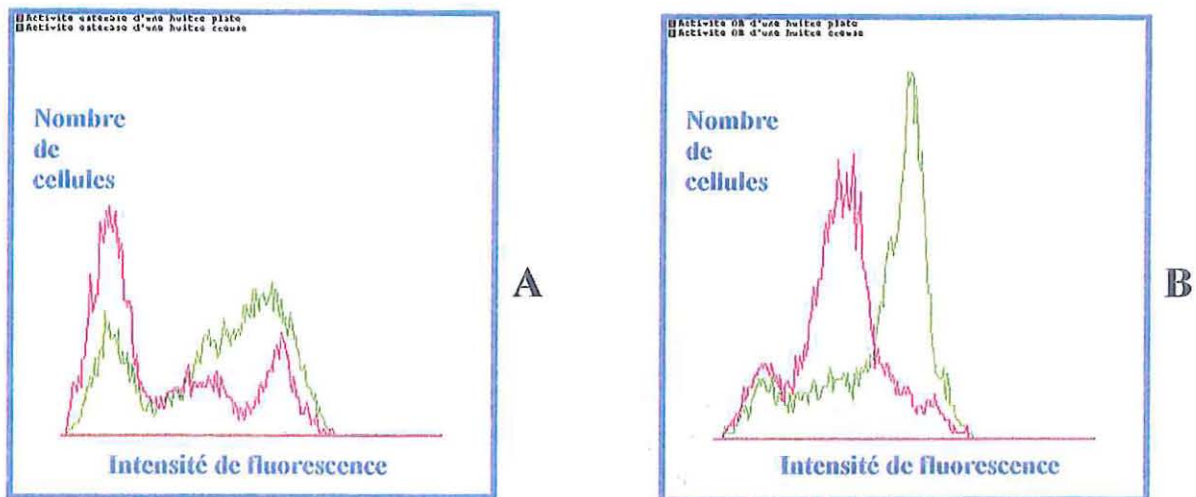


Figure 17 : Superposition des réponses estérases (A) d'hémocytes d'une huître plate (en rouge) et d'une huître creuse (en vert). Et superposition des réponses des enzymes de la flambée oxydative (B) d'hémocytes d'une huître plate (en rouge) et d'une huître creuse (en vert).

creuses et les plates avec respectivement 20.3% et 18.7% de granulocytes (**Figures 18 A et B**). Ainsi, les huîtres creuses ont des hémocytes semblant posséder une activité oxydative supérieure à celle des hémocytes d'huîtres plates. Ces résultats pourraient expliquer, en partie, leur état réfractaire vis à vis du parasite *Bonamia ostreae*.

2.2. Comparaison d'huîtres plates saines et d'huîtres plates parasitées par *Bonamia ostreae* :

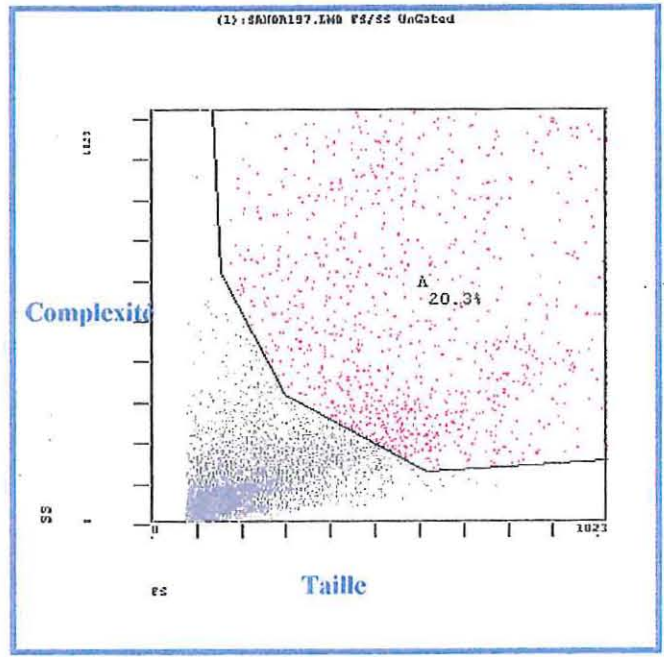
Après analyse de différentes huîtres saines (**Tableau 6**), les activités des deux types d'enzymes étudiées semblent concerner environ 70% des hémocytes, ce qui est important. Alors que l'analyse de sept huîtres plus ou moins parasitées (**Tableau 7 et 8**), indique des réponses différentes qui ont tendance à diminuer avec l'augmentation du nombre de parasites. En effet, seulement 40% des hémocytes présentent une activité pour chacune des deux enzymes chez des huîtres fortement parasitées.

En ce qui concerne la réponse hémocytaire des huîtres faiblement parasitées, comparées à celle des saines, elle diminue de 10% pour les estérases (63.7%) alors qu'elle augmente de 10% pour le mécanisme oxydatif (87.9%). Ces variations étant faibles, on peut considérer qu'un faible taux de parasites n'influence pas significativement les activités enzymatiques des hémocytes. Par contre dépassé une certaine charge parasitaire (nombre de parasite par hémocyte), qu'il serait intéressante d'évaluer, les parasites inhiberaient les réponses aussi bien des estérases que des enzymes du mécanisme oxydatif.

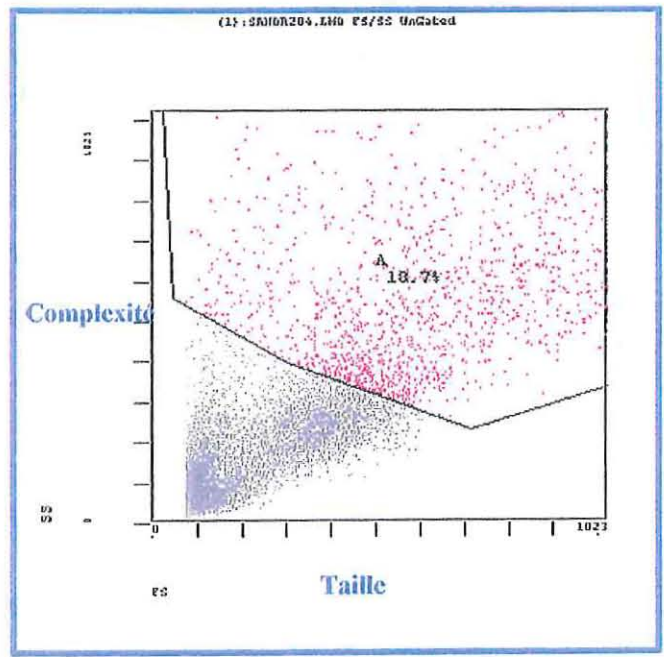
Ces résultats sont visualisés clairement sur les graphes de la **Figure 19**. Ils mettent en évidence les mêmes types de réponses pour les estérases et pour le mécanisme oxydatif. A savoir que, les réponses fluorescentes maximales sont celles de l'huître saine (en rouge), suivies des réponses à peine plus faible de l'huître faiblement parasitée (en vert) et viennent ensuite les plus faibles correspondant à l'huître fortement parasitée (en bleu).

L'hypothèse d'entrée « discrète » du parasite, *Bonamia ostreae*, dans les hémocytes sans déclencher de réponses oxydatives est alors à revoir. En effet, si cette hypothèse était vraie, l'hémocyte possédant encore toutes ses enzymes devrait les relarguer lors de nos stimulations expérimentales.

Il est alors possible que *Bonamia ostreae* rentre dans l'hémocyte par la voie habituelle qu'est le phagosome dans lequel il résisterait aux attaques enzymatiques par différents mécanismes non encore élucidés. Les enzymes de défense des hémocytes étant plus ou moins inhibées, seule une faible quantité de ces dernières est émise lors de nos stimulations expérimentales. En ce qui concerne les moyens de résistance aux attaques enzymatiques, il



A



B

Figure 18 : Graphes de la complexité des hémocytes en fonction de leur taille d'un pool d'huîtres creuses (A) et d'un pool d'huîtres plates (B).

	Pool de 4 huîtres plates saines	Pool de 3 huîtres plates saines	Huître plate saine	Moyennes
Estérase	65.5	77.9	77.3	73.6
Flambée oxydative	72.9	79.5	77	76.5

Tableau 6 : Pourcentages des activités enzymatiques d'hémocytes d'huîtres plates saines.

	Huîtres plates faiblement parasitées			Moyennes
Estérase	86.8	60.1	44.2	63.7
Flambée oxydative	94.7	75.8	93.4	87.9

Tableau 7 : Pourcentages des activités enzymatiques d'hémocytes d'huîtres plates faiblement parasitées.

	Huîtres plates fortement parasitées			Moyennes
Estérase	32	53.2	29	44.2
Flambée oxydative	23.6	48.6	59.6	49.6

Tableau 8 : Pourcentages des activités enzymatiques d'hémocytes d'huîtres plates fortement parasitées.

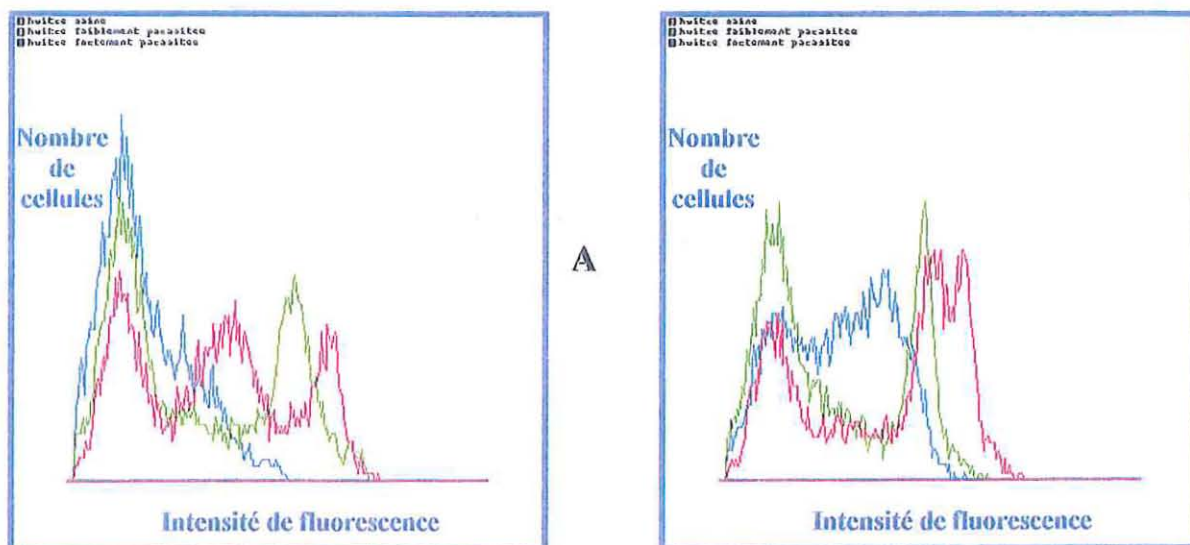


Figure 19 : Superposition des réponses des estérases (A) et du mécanisme oxydatif (B) d'hémocytes d'une huître saine (en rouge), d'une huître faiblement parasitée (en vert) et d'une huître fortement parasitée (en bleu).

pourrait s'agir d'enzymes de type catalase, capables de détoxifier les produits nocifs (H_2O_2 , anion superoxyde). Ce système de défense est comparable à celui des *Leishmanies* (Roitt *et al.*, 1985).

2.3. Comparaison entre des huîtres « sauvages » (naturelles), des huîtres « témoins éclosionerie » et des huîtres « résistantes » au parasite *Bonamia ostreae*:

Cette expérience réalisée début Mai était prévue pour trois huîtres de chaque population d'huître à comparer dans un premier temps : « sauvages », « témoins éclosionerie » et « résistantes » au parasite *Bonamia ostreae*. Mais, deux prélèvements d'hémolymphe sur trois se sont avérés souillés par des particules (spermatozoïdes ou morceaux de glande digestive). Ces dernières étant détectable par le cytomètre, l'étude a été effectuée sur une seule huître de chaque type.

Le **Tableau 9**, récapitulant les résultats obtenus, montre des activités estérases assez faibles avec seulement 20 à 40% d'hémocytes actifs pour les trois populations d'huître. Alors que les études précédentes en comptaient 40 à 70% (**Tableaux 4 et 6**). De plus, une différence existe entre les trois populations d'huître : la population « sauvage » a la plus faible activité, suivie de la population « témoin éclosionerie » puis vient la population « résistante » avec une forte activité.

Cette différence est aussi notée pour l'activité du métabolisme oxydatif, mais avec un taux d'activité plus élevé pour la population « résistante » et la population « témoin éclosionerie » pour lesquels 60 à 70% d'hémocytes sont actifs.

La superposition de ces activités enzymatiques, présentée sur la **Figure 20**, souligne la nette différence entre les trois populations d'huîtres qui est beaucoup plus marquée pour le métabolisme oxydatif.

Les activités enzymatiques supérieures des huîtres « résistantes » pourrait expliquer la difficulté du parasite à s'installer et à se multiplier dans un milieu si hostile. Alors que les huîtres « sauvages », du milieu naturel, offrent des conditions plus propice au parasite, avec des moyens de défense enzymatiques peut être moins importants. En ce qui concerne les huîtres « témoins éclosionerie », elles ont une activité intermédiaire entre la population « sauvage » et la population « résistante ». En effet, ayant résistées aux conditions expérimentales pendant 5 ans, elles sont, elles aussi, en partie sélectionnées. On peut parler d'une certaine forme de résistance acquise.

Afin de confirmer ces résultats, des expériences supplémentaires, sur un nombre d'individus plus important, ont été réalisées. Mais, étant donné la forte proportion de

	Sauvage	Témoin éclosionerie	Résistant
Estérase	16.1	27.7	41.1
Flambée oxydative	22.4	56.6	71.2

Tableau 9 : Pourcentages des activités enzymatiques d'hémocytes d'huîtres plates saines.

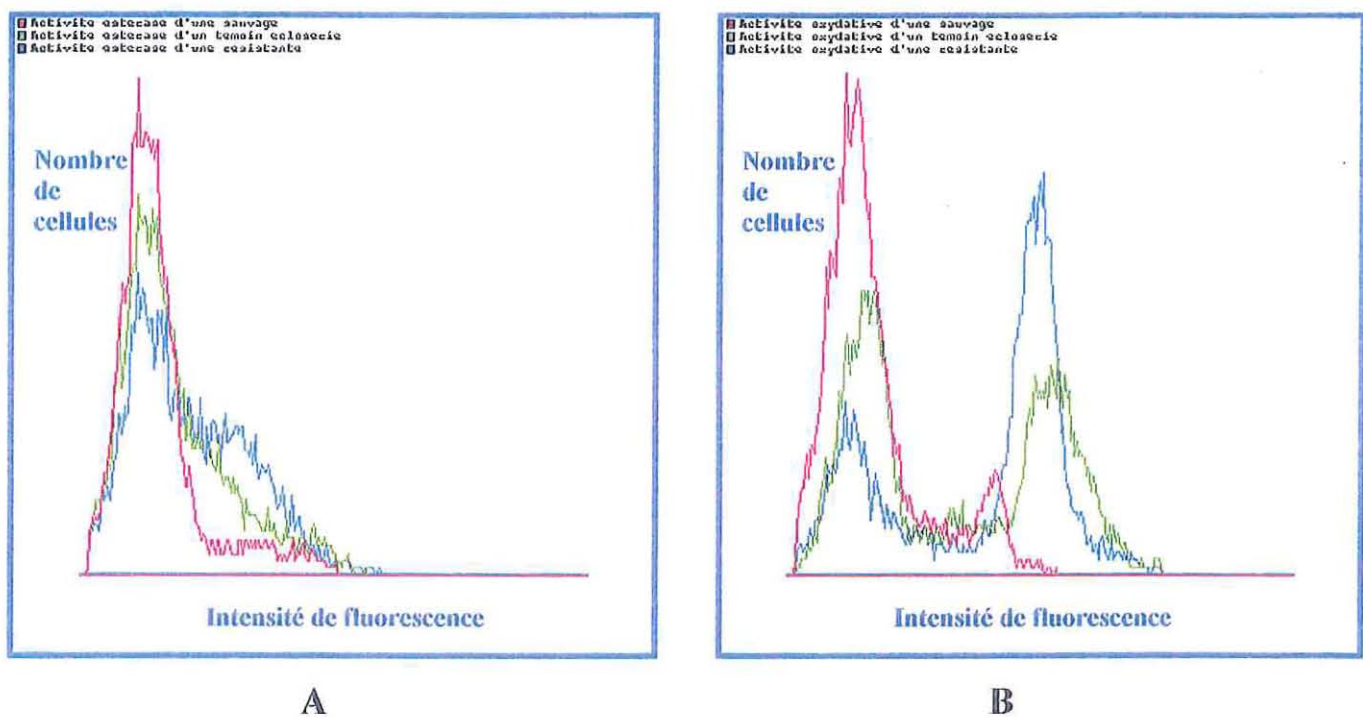


Figure 20 : Superposition des réponses des estérases (A) et du mécanisme oxydatif (B) d'hémocytes d'une huître sauvage (en rouge), d'une huître témoin d'éclosionerie (en vert) et d'une huître résistante (en bleu).

spermatozoïdes présents dans l'hémolymphe, la manipulation a été reconduite pour les mois de Septembre/Octobre.

3. ETUDE DE L'ACTIVITE PHAGOCYTAIRE *IN VITRO* :

La phagocytose étant le moyen de défense principal de l'huître, il est aussi intéressant de s'y attarder afin de savoir si le parasite est phagocyté en tant que particule étrangère. Pour cela, une étude du phénomène est étudiée chez les huîtres plates en comparaison avec les huîtres creuses, dans un premier temps. Puis, une comparaison entre la phagocytose d'*E. coli* et la phagocytose du parasite *Bonamia ostreae* est effectuée.

3.1. Comparaison de la phagocytose chez les huîtres plates, *Ostrea edulis*, et chez les huîtres creuses, *Crassostrea gigas* :

L'analyse de deux pools d'huîtres plates et deux pools d'huîtres creuses, composés de trois huîtres chacun, donne les graphes de la **Figure 21**. Sur ces derniers, représentant le nombre d'hémocytes en fonction de l'intensité de la réponse fluorescente, le pourcentage d'activité phagocytaire des hémocytes est indiqué. Il est plus important pour les huîtres creuses (75 à 80% **Figure 21 A**) que pour les huîtres plates (50 à 60% **Figure 21 B**) et ceci pour les deux pools analysés. Cette activité phagocytaire plus importante chez les huîtres creuses, appuie le résultat précédent. Ainsi, les hémocytes des huîtres creuses ont une activité oxydative et une activité phagocytaire supérieure à celle des plates. D'avantage approfondis, ces nouveaux résultats pourraient permettre de comprendre les mécanismes de résistance des creuses vis à vis de la bonamiose. Ce qui permettrait peut être de trouver un moyen pour protéger les huîtres plates de ce fléau.

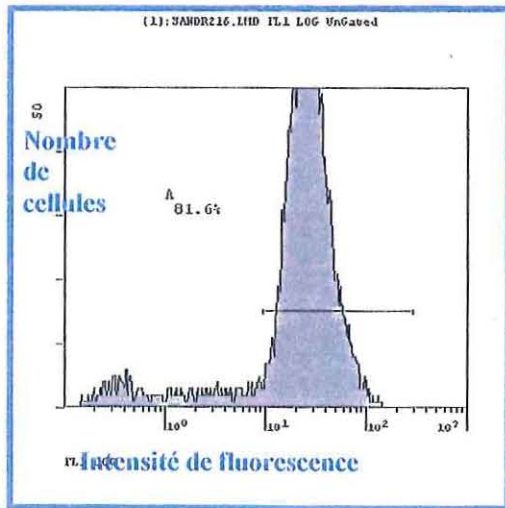
3.2. Phagocytose du parasite *Bonamia ostreae* :

3.2.1. Vérification de la phagocytose du parasite *Bonamia ostreae* :

La vérification de l'ingestion de *Bonamia ostreae* par les hémocytes se fait grâce à l'adaptation du protocole du kit « LIVE/DEAD » (voir M&M paragraphe 6.1.).

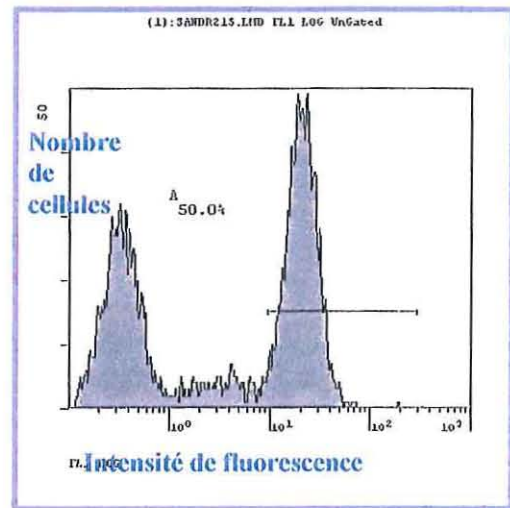
La phagocytose d'*E. coli* par les hémocytes ayant déjà été observée et confirmée, celle du parasite va alors être vérifiée. Pour cela, des triplicats de trois ratios différents 1 : 10 ; 1 : 20 et 1 : 30 contenant respectivement 1 hémocyte pour 10, 20 et 30 parasites, sont mis à incuber 2 heures, puis 18 heures.

Un exemple de nuage de points obtenu pour chaque temps d'incubation est présenté sur les graphes de la **Figure 22**. Sur ces derniers, représentant le logarithme de la fluorescence



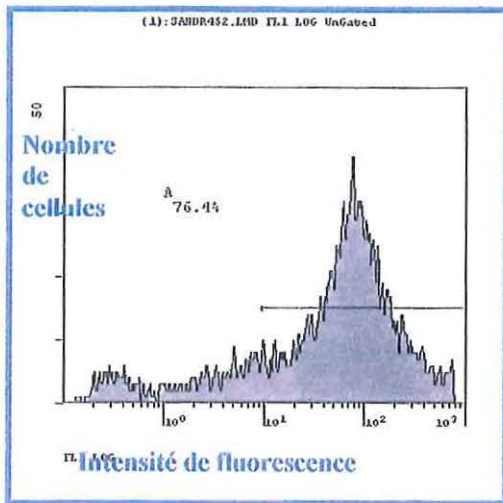
Pool 1 d'huîtres creuses

A

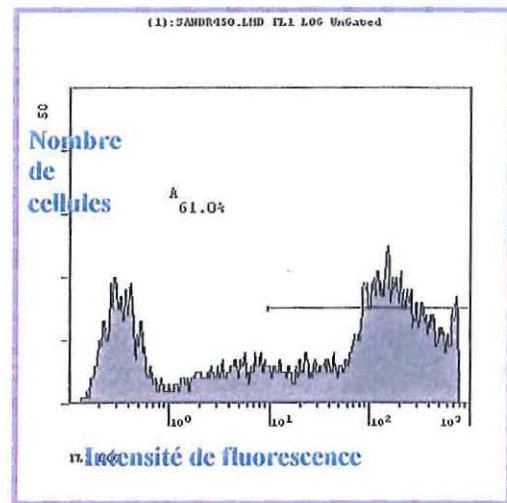


Pool 1 d'huîtres plates

B



Pool 2 d'huîtres creuses



Pool 2 d'huîtres plates

Figure 21 : Pourcentages d'activité phagocytaire des hémocytes des différents pools d'huîtres creuses (A) et d'huîtres plates (B) après passage sur BSA

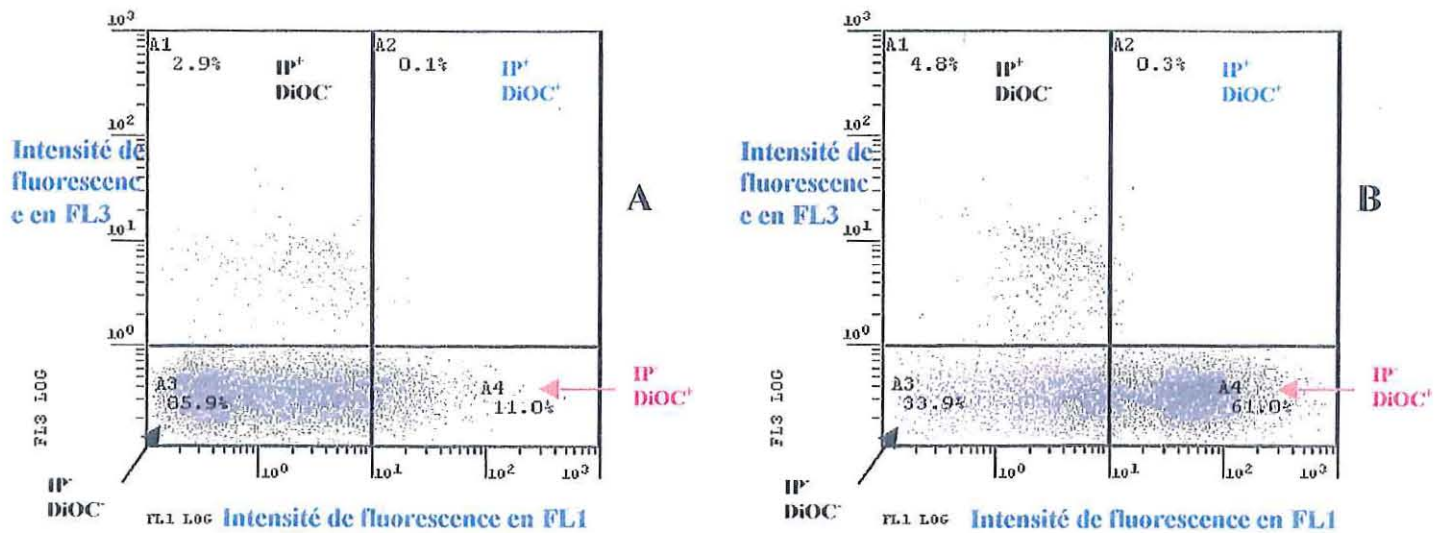


Figure 22 : Nuages de points du logarithme de la fluorescence émise en FL3 par l'IP en fonction du logarithme de celle émise en FL1 par le DiOC₁₈ après 2 heures d'incubation (A) et après 18 heures d'incubation (B).

		1 : 10			1 : 20			1 : 30		
2 heures d'incubation	triplicats	4.4	3.4	0.4	10.8	6.2	5.3	11.0	8.6	21.1
	moyenne	2.7			7.4			13.6		
18 heures d'incubation	triplicats	51.4	32.8	19.9	61.4	54.4	47.5	61.0	67.5	60.6
	moyenne	34.7			54.4			63.1		

Tableau 10 : Pourcentages d'hémocytes émettant une fluorescence en A₄, donc vivants et ayant phagocytés, pour chaque ratio et chaque temps d'incubation.

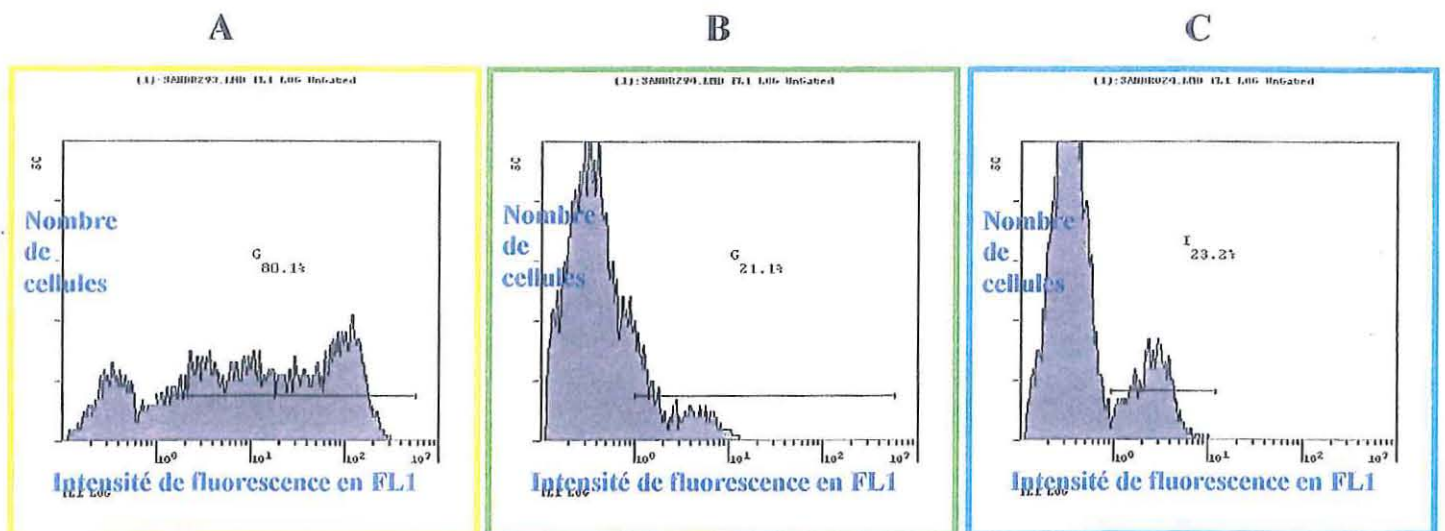


Figure 23 : Pourcentages d'hémocytes ayant une activité oxydative chez des hémocytes **saints** (graphe A), chez des hémocytes **parasités *in vitro*** (graphe B) et chez des hémocytes **parasités *in vivo*** (graphe C).

émise en FL3 par l'IP en fonction du logarithme de celle émise en FL1 par le DiOC₁₈, on délimite la zone de réponse fluorescente au delà de 10¹ en abscisse. En effet, le marquage par le DiOC₁₈ des parasites isolés émet une fluorescence entre 10⁰ et 10¹. Toute réponse au delà de 10¹ correspond alors à l'émission de fluorescence d'au moins deux parasites par hémocyte. En FL3, qui est dans ce cas en ordonnée, la délimitation de la réponse positive (incorporation d'IP dans les cellules mortes) est fixée à 10⁰.

Sur ces graphes, on regarde d'abord la zone A₁ pour s'assurer qu'il n'y ait pas un nombre d'hémocytes morts trop important. Dans notre cas, les mortalités sont de l'ordre de 3 à 5%, la manipulation est alors correcte. L'analyse des pourcentages d'hémocytes vivants ayant phagocytés des parasites, en A₄, répertoriés dans le **Tableau 10** est donc possible. Ils montrent d'une part, que plus le nombre de parasites est important, plus la quantité d'hémocytes ayant phagocyté augmente. D'autre part, plus le temps de mise en contact des parasites avec les hémocytes est long, plus ces derniers ont le temps de phagocyter, ou, autre hypothèse, plus nombreux sont les parasites qui pénètrent activement dans les hémocytes. Cette activité de phagocytose est bien visualisée par comparaison des graphes de la **Figure 22**, précédemment citée, où l'on peut voir une nette évolution du nuage de points qui se déplace vers la droite. En effet, au bout de deux heures d'incubation, le nombre d'hémocytes non marqués, c'est-à-dire qui n'ont pas ingérés de parasite, est important. Alors qu'après 18 heures, la plus grande partie des hémocytes émettent une fluorescence, donc ont phagocyté des parasites.

La phagocytose *in vitro* du parasite par les hémocytes étant confirmée, on peut alors vérifier si ce dernier a la même influence sur le mécanisme oxydatif des hémocytes que lorsqu'il est phagocyté *in vivo*.

3.2.2. Comparaison des activités du mécanisme oxydatif entre hémocytes parasités *in vitro* et *in vivo* :

Les graphes de la **Figure 23** indiquent le pourcentage des hémocytes ayant une activité oxydative chez des hémocytes sains (**graphe A**) et chez les mêmes hémocytes mis en contact préalable avec des parasites (qui ont donc phagocyté une partie de ces derniers, **graphe B**). Le taux d'hémocytes sains émettant une fluorescence, donc ayant une réponse enzymatique oxydative, qui est de 80%, est comparable aux résultats obtenus précédemment sur d'autres hémolymphes. Le pourcentage des hémocytes parasités ayant une activité est de seulement 20%. Cette activité est comparable à celle obtenue *in vitro* pour des hémocytes parasités *in vivo* (**graphe C**).

Ainsi, les résultats obtenus *in vitro* confirment ceux obtenus *in vivo* et permettent l'hypothèse suivante : le parasite semblerait avoir une influence importante sur l'activité des enzymes de la flambée oxydative en les inhibant en partie.

Ces résultats ne nous donnent, cependant, aucune information sur le mécanisme d'entrée du parasite *Bonamia ostreae* dans les hémocytes. Pour savoir s'il pénètre de manière active ou s'il est phagocyté, on pourrait utiliser de la cytochalasine B qui est une molécule inhibant la phagocytose dirigée par les hémocytes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AUFFRET, M. 1986. Internal defence in bivalve molluscs : ultrastructural observation on the fate of experimentally injected bacteria in *Ostrea edulis* granular hemocytes. Pathologie in Marine Aquaculture (special publication) **9** : 351-356.

BRERETON, J.D. and Alderman, D. 1979. Wound healing in the European oyster, *Ostrea edulis*. L. Aquaculture **16** : 147-151.

CHENG, T.C., Huang J.W., Howland, H., Schoenberg, D.A. and Sullivan, J.T. 1981. Effect of preinjection of *Crassostrea virginica* with bacteria subsequent chemotactic response by its hemocytes. J. Invertebr. Pathol. **38** : 122-126.

COCHENNEC, N, 1997. La Bonamiose : Caractérisation du parasite *Bonamia ostreae* et étude de ses interactions avec l'hôte, l'huître plate *Ostrea edulis*. Thèse de l'école Pratique des Hautes Etudes.

COMPS, M., Tige, G., and Grizel, H., 1980. Etude ultrastructurale d'un protiste de l'huître *ostrea edulis* . C.R. Acad. Sc. Paris, Serie D, 290 : 383-384.

DENOIX, M, 1997. Approche in vitro et in vivo des interactions hémocytes/parasite *Bonamia ostreae*, chez l'huître plate *Ostrea edulis*. Formation complémentaire POST-BTS.

ESPIAU, B, 1999. Caractérisation des populations hémocytaires de l'huître plate *Ostrea edulis* à l'aide de lectines. Formation complémentaire POST-BTS.

LORTEAU, C, Auffret, M, et Le Bris, H, 1995. Le système de d'immuno-défense des Mollusques bivalves. Rec. Méd. Vét.,171 (6/7), 415-422.

ROITT, I, Brostoff, J, et Male, D, 1985. Immunologie fondamentale et appliquée. Médecine et sciences internationales, Paris.

SEGRETIN, A, 1997. Caractérisation de types hémocytaires dans l'hémolymphe de l'huître plate, *Ostrea edulis* , par classification robuste. IUP Génie Informatique.

ANNEXE 1 :

Collecte de la fluorescence émise en cytométrie en flux

Les différents signaux optiques émis par la cellule doivent être focalisés, séparés, puis acheminés vers des systèmes de détection, photomultiplicateurs ou photodiodes. Ils sont pour cela, sélectionnés par différents circuits optiques, composés d'une alternance de miroirs et de filtres.

Un miroir est une surface réfléchissante. Suivant le traitement de sa surface, on peut obtenir trois types de miroirs: passe-haut, passe-bas et passe bande (**Figure** ci-dessous).

De plus, les longueurs d'onde réfléchies varient aussi avec l'angle formé par le rayon incident et la surface du filtre. Si les longueurs d'onde non réfléchies sont transmises, on obtient ainsi des miroirs dichroïques.

Pour les filtres, on retrouve en transmission les mêmes courbes que pour les miroirs, par contre les longueurs d'onde non transmises ne sont pas réfléchies. Elles sont soit absorbées, soit détruites.

Après avoir traversé cette succession de miroirs et de filtres, la lumière est recueillie et transformée en signal électrique par un photomultiplicateur ou une photodiode.

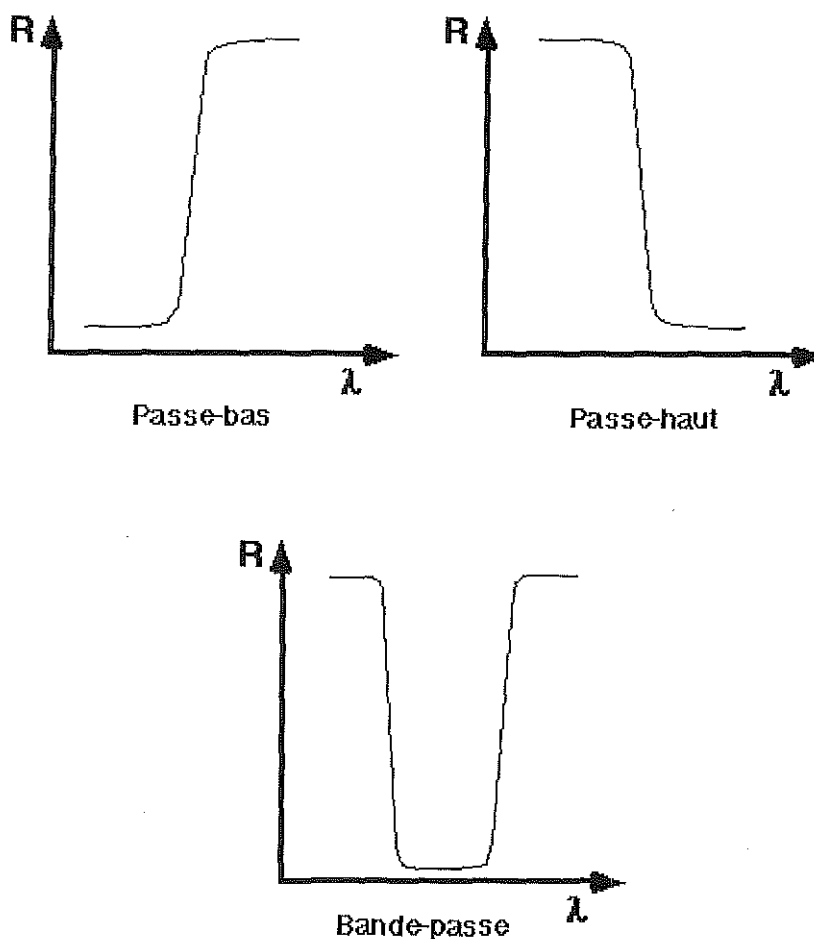


Figure : Différents types de filtres utilisés en Cytométrie en flux (avec **R** : Réflexion et λ : Longueur d'onde).

ANNEXE 2 : Purification du parasite *Bonamia ostreae*

Des huîtres fortement parasitées sont identifiées par examen cytologique d'empreintes de tissus cardiaques. Le système circulatoire des huîtres étant semi-ouvert, les hémocytes sont disséminés dans les différents organes. De ce fait, le corps entier de l'animal est utilisé pour la purification, à l'exception du muscle adducteur dont la nature fibreuse empêche une homogénéisation correcte des tissus. Ces tissus infectés sont lavés avec de l'eau de mer filtrée stérile, additionnée de détergent, Tween 80, à la concentration finale de 1% (EMFST), puis broyés dans de l'EMFST à l'aide d'un homogénéiseur de tissus, Ultra-Turrax, qui permet de dissocier tissus et cellules sans altérer les parasites. L'utilisation de broyats tissulaires permet de récupérer les parasites localisés dans les hémocytes. L'homogénéisat est ensuite filtré sur des toiles de porosité décroissante (100, 60 et 20 μm) afin d'éliminer les débris fibreux. La suspension ainsi filtrée est centrifugée (2000g, 30 min, 8°C). Le culot est repris dans un petit volume d'EMFST, puis à nouveau broyé à l'homogénéiseur. Les parasites et les éléments particuliers présents dans les culots sont séparés par une première centrifugation différentielle (2000g, 30 min, 8°C) dans une solution de saccharose 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 (2000g, 30 min, 8°C) sur un gradient discontinu de saccharose (20%-40% p/p dans de l'EMFST). Les parasites sont prélevés à l'interface 20-40% et dilués lentement avec de l'EMFST afin d'éviter un choc osmotique. Ils sont ensuite lavés dans un grand volume d'EMFST, puis remis au culot par centrifugation (2000g, 30 min, 8°C).

L'étape suivante de purification repose sur une centrifugation en gradient de densité de Percoll (30-40-50-60-70% ; v/v Percoll/EMFST ; 2000g, 30min, 8°C). L'osmolarité du Percoll est ajustée à celle du milieu marin, c'est à dire 1100 mOsm, par addition de 4.1% de chlorure de sodium. Les parasites purifiés sont localisés aux interfaces 50-60% et 60-70% du gradient. Ils sont prélevés, à l'aide d'une seringue, dilués dans de l'eau de mer filtrée stérile sans Tween (EMFS), puis centrifugés (2000g, 30 min, 8°C) sur un gradient de saccharose 20% (p/p dans de l'EMFS). Cette dernière étape permet d'éliminer le Percoll et de concentrer les protozoaires. La numération des parasites ainsi purifiés est réalisée à l'hématimètre de Malassez. Les suspensions de parasites sont reprises dans l'EMFS pour les ramener à la concentration voulue.

ANNEXE 3 : Techniques expérimentées :

1. Coupes histologiques :

Fixation :

Après section du muscle adducteur, l'huître est extraite de sa coquille et plongée dans le liquide de Davidson (*Eau de mer : 1200 ml ; alcool à 95 °C : 1200 ml ; formaldéhyde 40% : 300 ml ; glycérol : 400 ml ; acide acétique : 10 % à rajouter extemporanément*). Ce fixateur permet de conserver les structures tissulaires et de réaliser une gamme de coloration importante.

Déshydratation et imprégnation en paraffine :

Après quelques jours de fixation dans le liquide de Davidson, les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol 95° et 100°. L'alcool est ensuite éliminé par 3 bains de xylène qui prépare également l'échantillon à l'inclusion en paraffine liquide (60 °C). Ces différentes étapes sont réalisées à l'aide d'un automate à inclusion Tissue-Tek (Miles). L'échantillon est ensuite inclus en bloc de paraffine à l'aide d'une console LKB (Tissu Tek) composée de trois parties : un bac de paraffine, un distributeur de paraffine et une plaque réfrigérante.

Confection des coupes :

A partir des blocs, des coupes de 3 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome LBK. Prélevées sur une lame de verre à la surface d'un bain d'eau distillée à 45°C (étalement), les coupes sont égouttées avant d'être séchées une nuit à l'étuve à 60°C. Ce séchage à chaud élimine l'excès de paraffine et facilite l'adhérence des coupes à la lame.

Coloration des coupes :

Afin de déparaffiner, puis réhydrater les coupes avant coloration, les lames sont placées dans des bains successifs de xylène (2x10min), d'éthanol (2x10min) qui élimine ce solvant et d'eau courante. La coloration est ensuite effectuée en plongeant successivement les lames dans l'hématoxyline (3 min), sous l'eau du robinet (5 min), dans l'éosine (3 min), sous l'eau du robinet (30 sec), dans l'éthanol absolu (3x10 sec) et dans le xylène (2x1 min). L'hématoxyline colore les structures nucléaires en bleu-violet foncé, les cytoplasmes basophiles en bleu et les cytoplasmes en gris ; les autres structures sont colorées en rose par l'éosine. De par sa simplicité et sa reproductibilité, cette coloration est effectuée en routine au laboratoire.

Les préparations sont ensuite montées entre lame et lamelle dans une goutte d'Eukitt.

2. Réactions immunologiques sur coupes :

Les coupes histologiques sont, tout d'abord, déparaffinées par deux bains de xylène (15 min), suivis de deux bains d'éthanol absolu (10 min), puis rincées en PBS 1X (2x10 min). Les sites non-spécifiques sont ensuite saturés par 1 ml de PBS 6 % lait écrémé (régilait), durant 1 heure à température ambiante. Après un rinçage en PBS, 200 µl de la suspension du premier anticorps dilué en PBS au 1/50^{ème} sont déposés sur la lame et laissés en chambre humide 1 heure à température ambiante.

Après deux nouveaux rinçages en PBS 1X, 200 µl du deuxième anticorps dirigé contre le premier et couplé à une phosphatase sont déposés. Ce deuxième anticorps est dilué au 1/400^{ème} dans du PBS 1X(5 ml)/triton (60µl)/régilait 1% (1 ml régilait 6%) et laissé 1 heure à température ambiante. Un autre rinçage en PBS est nécessaire avant d'ajouter 20 µl de substrat dilué dans 1ml de DIG3 pour révéler la phosphatase. Après incubation de 5 à 20 minutes à l'obscurité, arrêter la réaction par du DIG4 dès que la coloration brune apparaît.

La coloration des coupes se fait par deux bains successifs d'une minute et 30 secondes en Bismarck Brown Yellow (BBY), puis en méthanol (30 sec) et enfin en xylène (1 min) avant de les monter entre lame et lamelle en résine Eukitt et d'observer au microscope photonique.

ANNEXE 4 : POSTER

Etude comparative en cytométrie en flux des activités estérase et du métabolisme oxydatif des hémocytes d'huîtres saines et parasitées par le protozoaire *Bonamia ostreae*

Nathalie Cochenne et Sandrine Garcia
Ifremer - Laboratoire de Génétique et Pathologie - 17300 La Tremblade

Introduction

La Bonamiose, maladie due au protozoaire intracellulaire *Bonamia ostreae*, a été décrite pour la première fois en France en 1979 suite à des mortalités. Cette maladie s'est ensuite rapidement propagée à tous les centres ostréicoles français puis européens (Pichot *et al.*, 1980 ; Grizel, 1988).

Pour lutter contre cette maladie les moyens de lutte sont limités et essentiellement basés sur un diagnostic précoce qui limite le transfert d'animaux parasités et l'accroissement de la « résistance » à la maladie par sélection génétique.

Différents travaux sont réalisés pour tenter de comprendre les mécanismes de défense mis en jeu par les huîtres plates, *Ostrea edulis*, vis à vis de ce parasite, afin de proposer des solutions pour développer des méthodes de prophylaxie et de lutte. Les mécanismes de défense des huîtres sont essentiellement basés sur l'activité des cellules circulantes de l'hémolymphe : les hémocytes (Auffret, 1988). D'autre part dans ce modèle particulier de parasitisme ces cellules sont à la fois les cellules effectrices de l'immunité cellulaire et les cellules hôtes de *B. ostreae*. Cela confère à ce modèle un intérêt unique pour la caractérisation des réactions cellulaires de défense et des interactions hôte-parasite (Cochenne, 1997). La répartition des différents types hémocytaires, l'activité d'estérase non spécifique et du métabolisme oxydatif ont été étudiées chez des huîtres saines et parasitées en cytométrie en flux.

B. ostreae huître saine



B. ostreae huître hématocyttaire

Matériel et méthodes



500 µl d'hémolymphe (de 40 huîtres) sont prélevés dans la cavité péricardique puis dilués avec 500 µl d'une solution de PBS (1000mOs). Chaque prélèvement est analysé au cytomètre en flux : 10 000 événements (Beckman Coulter, EPICS XL).

* centrifugé sur lame histologique puis coloré (Hémacolor). La répartition hémocytaire est effectuée sur 100 cellules au microscope photonique.

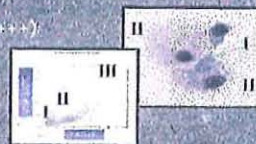
* analyse pour l'activité estérase (FDA - estérase).

* analyse pour l'activité du métabolisme oxydatif (DCFH-PMA - Oxydatif buret).

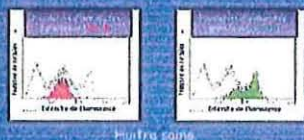
Résultats

La répartition des différents types hémocytaires est variable en fonction des animaux étudiés, de leur statut d'infection et de la technique utilisée. Malgré cette variabilité individuelle, il a été possible de définir une « numération hémocytaire type » caractéristique de l'état d'infection des individus en cytométrie en flux.

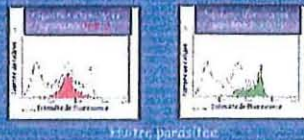
	Huître saine	Infestée (-)	Infestée (+++)
POP III	32 +/- 13	26 +/- 6	19 +/- 7
POP II	24 +/- 8	37 +/- 10	37 +/- 12
POP I	44 +/- 20	35 +/- 8	44 +/- 10



ACTIVITE ESTERASE



Huître saine



Huître parasitée

Une activité enzymatique de type estérase est détectée dans les hémocytes d'huîtres plates. Cette activité est différente en fonction des types hémocytaires. Les cellules de la population III présentent une plus forte activité que les cellules des populations I et II. De même l'analyse de la production d'espèces activées de l'oxygène montre une réactivité importante dans les hémocytes de type III.

L'analyse de 15 individus fortement parasités ne permet pas de mettre en évidence d'augmentation significative de l'activité de type estérase dans les 3 populations hémocytaires. Par contre, la présence du parasite *B. ostreae* réduit de manière significative la réponse du métabolisme oxydatif des hémocytes des types II et III.

ACTIVITE DU METABOLISME OXYDATIF



Huître saine



Huître parasitée

Discussion - Conclusion

L'analyse en cytométrie en flux des hémocytes permet de discriminer 3 populations hémocytaires. Ces populations correspondent aux types cellulaires décrits en microscopie photonique. Cependant il n'y a pas de corrélation entre la numération réalisée en microscopie photonique et en cytométrie en flux. Ces résultats soulignent la difficulté à déterminer sur la seule base de critères morphologiques et tinctoriaux les populations hémocytaires d'huîtres. Bien qu'il existe une certaine variabilité individuelle, l'activité enzymatique de type estérase et le métabolisme oxydatif sont principalement détectés dans les hémocytes de type granuleux. Ces résultats confirment de fonctions cellulaires différentes entre les types granuleux et agranuleux.

L'analyse d'hémocytes infectés *in vivo* par le parasite *Bonamia ostreae* montre une diminution de l'activité de la flamme oxydative. Ces résultats suggèrent que l'établissement et la multiplication du parasite à l'intérieur des hémocytes semblent en partie liés à l'inhibition de certaines fonctions microbicides.