

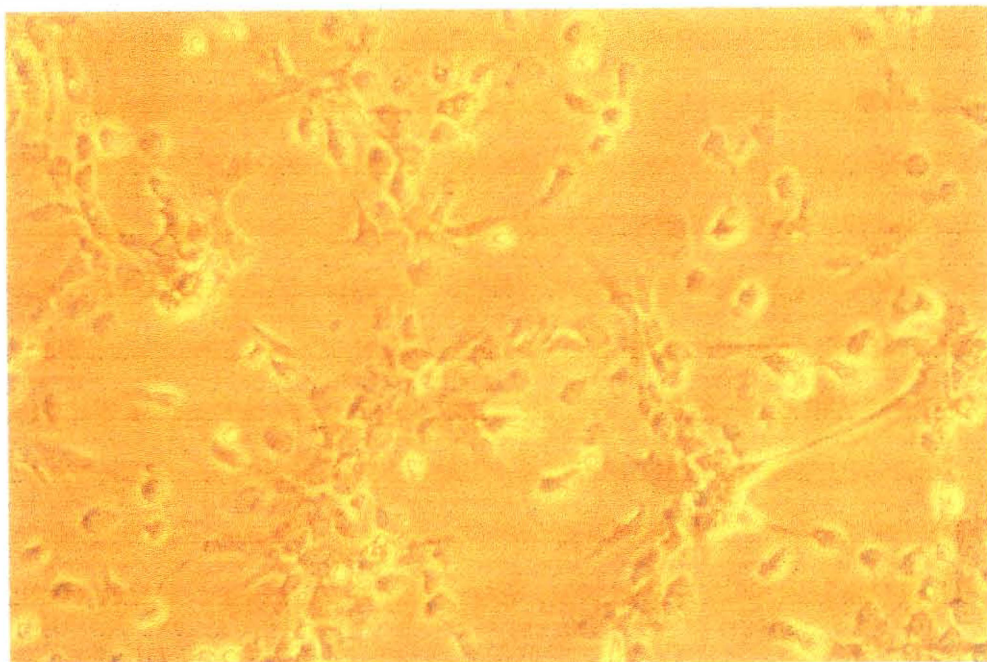
MÉMOIRE SOUTENU PAR M^{lle} GÉRALDINE FLAUJAC
POUR L'OBTENTION DU
CERTIFICAT D'ETUDES SUPÉRIEURES TECHNOLOGIQUES

OPTION :

- CULTURE CELLULAIRE
- MICROSCOPIE ELECTRONIQUE
- BIOLOGIE MOLECULAIRE

Lycée Technique S^t LOUIS - BORDEAUX

Mise au point d'une méthode de primoculture de cellules cardiaques
d'huître plate, *Ostrea edulis*.



IFREMER
URPIG
Station de Ronce les Bains
BP 133
17390 La Tremblade.

Mars - Juin 1994.



REMERCIEMENTS

Je remercie H. GRIZEL pour avoir eu l'obligeance de m'accueillir au sein de la station IFREMER de Ronces les Bains.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à T. RENAULT pour avoir accepté d'encadrer mon stage, pour le temps précieux qu'il m'a accordé ainsi que pour sa bonne humeur.

Je remercie sincèrement R. M. LE DEUFF pour sa disponibilité et ses conseils précieux.

Enfin, j'adresse ma profonde sympathie à Patricia, Bruno, Nathalie ainsi qu'à Serge, Yvette, Ginette, Martine et à toute l'équipe de l'écloserie, Christophe, Pascal, Yamama, André, Emile et Jean-Marie. Sans oublier Patricia et Benoît pour avoir partagé d'agréables moments à la maison des stagiaires.

ABREVIATIONS

IFREMER : Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la MER.

ELISA : Enzyme linked immunosorbant assay, technique de détection immunologique.

PCR : amplification génique enzymatique (Polymerase chain reaction).

MET : microscopie électronique à transmission.

URPIG : Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générale.

SCG : sérum d'huître creuse, *C. gigas*, ou hémolymphe.

SVF : sérum de veau foetal.

mOsm : milliosmole (10^{-3} osmole).

μm : micromètre (10^{-6} mètre).

nm : nanomètre (10^{-9} mètre).

mM : millimole (10^{-3} mole).

cm^2 : centimètre carré.

mg/ml : nombre de milligrammes par millilitre.

U/ml : nombre d'unités par millilitre.

p/v : poids pour volume.

$^{\circ}\text{C}$: degré Celsius.

mn : minute.

rpm : nombre de rotations par minute.

3 X : forme concentrée trois fois.

qsp : quantité suffisante pour.

Kv : kilovolts (10^3 volts).

INTRODUCTION. 2

1. MATERIEL ET METHODES. 5

1.1. Le matériel biologique : huître plate, <i>Ostrea edulis</i> et huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>.	5
1.2. Les milieux de culture.	5
1.2.1. Les milieux synthétiques.	5
1.2.2. Les milieux empiriques.	7
1.2.2.1. L'eau de mer.	7
1.2.2.2. L'hémolymphe, méthode de ponction.	7
1.3. Technique d'obtention de primocultures de cellules d'huître.	8
1.3.1. Protocole de prélèvement et de dissociation des cellules cardiaques.	8
1.3.2. Mise en culture des cellules.	10
1.3.3. Entretien des primocultures.	10
1.4. Test de différents milieux de culture.	10
1.5. Test de la poly-D-lysine.	11
1.6. Variation des proportions eau de mer/hémolymphe dans le milieu de culture.	11
1.7. Addition au milieu de culture d'un anti-aggrégant, l'Alsever.	11
1.8. Test de variation de la proportion en sérum de veau foetal dans le milieu de culture.	12
1.9. Technique de préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission (MET).	12
1.9.1. Traitement des cellules en culture adhérentes, <i>in situ</i> .	12
1.9.2. Traitement des cellules en culture en suspension.	13

2. RESULTATS. 14

2.1. Comparaison des différents milieux de culture.	14
2.2. Rôle de la poly-D-lysine sur l'adhésion des cellules.	14
2.3. Variation des proportions eau de mer/hémolymphe dans le milieu de culture.	17
2.4. Addition d'un anti-aggrégant au milieu de culture.	17
2.5. Etude de l'influence de la proportion en sérum de veau foetal dans le milieu de culture.	18
2.6. Analyse en MET de différents échantillons de cellules cardiaques d'huître plate, <i>Ostrea edulis</i>.	20
2.6.1. Analyse des cellules adhérentes <i>in situ</i> .	20
2.6.2. Analyse des cellules en suspension.	20

DISCUSSION. 27

CONCLUSION. 31

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES. 32

INTRODUCTION.

L'ostréiculture représente une part prépondérante de l'aquaculture marine dans le monde. Cette activité, traditionnellement implantée dans plusieurs pays, fait également l'objet de programmes de développement dans diverses régions du monde (Comps *et al.*, 1976).

En France, le développement de l'activité conchylicole a entraîné une charge importante des bassins d'élevage et une augmentation considérable des transferts entre bassins et pays. Ces facteurs ont probablement favorisé le développement et la propagation de certaines maladies conduisant à de véritables épizooties dont l'extension géographique s'est avérée difficile à enrayer (Comps *et al.*, 1976).

A la fin des années 60, l'élevage de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, a été décimé suite à des infections à iridovirus (Comps et Duthoit, 1976). Simultanément, l'huître plate, *Ostrea edulis*, subissait l'impact de deux parasitoses, la marteilliose, due à *Marteilia refringens* et la bonamiose, due à *Bonamia ostreae*, provoquant une chute notable de la production de cette espèce. Face à ces pertes économiques, des programmes de recherches financés par l'état, les régions et mis en oeuvre par l'IFREMER, ont été établis afin d'aider à la prévention et à la lutte contre ces pathologies.

En effet, la mise en place de mesures prophylactiques par le diagnostic rapide et le développement de populations de mollusques marins résistants aux principaux agents pathogènes deviennent des besoins urgents.

Concernant le diagnostic des pathologies des mollusques bivalves marins, il est actuellement possible de répertorier différentes techniques. Deux de ces techniques rendent déjà un grand service en matière de diagnostic, par ailleurs, d'autres méthodes sont à développer. Ainsi, les techniques d'histologie classique couplées à la microscopie électronique à transmission sont des outils indispensables pour identifier les agents pathogènes connus et pour en mettre en évidence de nouveaux. Cependant ces techniques restent lourdes à mettre en oeuvre et ne permettent pas de traiter un grand nombre d'échantillons.

Les techniques immunologiques de diagnostic direct, c'est-à-dire la détection d'un ou de plusieurs antigènes de l'agent pathogène incriminé, trouvent actuellement leur application sur lames histologiques par immunocytochimie ou immunofluorescence indirecte, grâce à l'existence d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre certains agents pathogènes des mollusques bivalves marins. Cependant, les méthodes immunologiques de dépistage indirect ne sont pas applicables à l'huître. En effet, les mollusques bivalves marins ne produisent pas d'anticorps et de ce fait, il est impossible de mettre en évidence les témoins d'une réponse spécifique vis à vis d'un agent pathogène donné. Ainsi, chez les mollusques, la principale défense développée semble être la phagocytose. Les facteurs humoraux pouvant jouer un rôle de défense sont entre autres : le lysozyme, les bactéricidines, les enzymes plasmatiques ainsi que les lectines sériques. Ces molécules ont des activités de défense à caractère non spécifique .

Enfin, des procédés de biologie moléculaire comme la PCR, l'hybridation sur membrane ou encore l'hybridation *in situ* demeurent à développer pour les pathogènes rencontrés chez les mollusques bivalves marins. Ces techniques présentent un grand intérêt, car elles sont très spécifiques et de grande sensibilité tout en permettant de traiter de nombreux échantillons. Il est cependant nécessaire de bien connaître les agents pathogènes en cause pour pouvoir développer ce type de diagnostic et pour cela, les apports de la culture cellulaire semblent nécessaires. Le développement de la culture cellulaire, objet de ce présent travail, offre de multiples intérêts dans le cadre des pathologies rencontrées chez les mollusques bivalves marins, car ce peut être une méthode de diagnostic rapide, par exemple par la recherche d'un éventuel effet cytopathogène lors d'infections virales. Par ailleurs, elle peut être un outil d'exploration et de compréhension des métabolismes cellulaires et d'agents pathogènes.

Le deuxième volet de lutte contre les maladies chez les mollusques bivalves marins est la sélection de populations de mollusques marins résistants à certains agents pathogènes. Deux méthodes de sélection des animaux résistants peuvent être distinguées.

D'une part, une sélection empirique peut être réalisée par contamination expérimentale des animaux en injectant des grandes quantités d'agent pathogène purifié chez ces individus. A ce sujet, un protocole d'isolement et de purification du parasite, *Bonamia ostreae*, des tissus d'huîtres plates infestées a été développé (Mialhe *et al.*, 1985). La reproduction au laboratoire d'une bonamiose expérimentale par injection de parasites purifiés dans la cavité péricardique après anesthésie des animaux permet de conserver les animaux survivants dont la descendance sera à nouveau testée. De génération en génération, il est ainsi possible d'espérer fixer des caractères de résistance au parasite *Bonamia ostreae*.

D'autre part, la sélection peut se faire en ciblant directement des caractères de résistance à certaines pathologies. Cette approche est plus précise que la précédente et nécessite, là aussi, la compréhension des relations « hôte-pathogène », l'identification des activités impliquées dans la résistance ainsi que leur quantification. La sélection des animaux peut reposer uniquement sur ces caractères étudiés qui participent aux mécanismes de résistance ou de défense.

Toutes ces mesures sont développées, car il est impossible de concevoir des mesures thérapeutiques dans un milieu ouvert comme le milieu marin, pour un traitement anti-protozoaire par exemple. En outre, la vaccination des animaux est impossible puisqu'ils ne possèdent pas d'immunité humorale spécifique.

Les connaissances acquises sur les pathogènes des bivalves marins sont limitées et concernent essentiellement la description morphologique des agents et anatomopathologique des syndromes associés. Une difficulté majeure rencontrée pour l'étude de ces agents pathogènes réside dans l'impossibilité de les cultiver *in vitro*. En effet, il n'existe actuellement aucune lignée cellulaire de mollusques bivalves marins.

Dans cette optique, l'objectif de ce stage a été d'étudier différents milieux susceptibles d'obtenir le maintien et une éventuelle multiplication de cellules d'huître plate, *O. edulis*, en culture, malgré le manque de données physiologiques et biochimiques nécessaires pour élaborer des milieux de culture convenables.

1. MATERIEL ET METHODES.

1.1. Le matériel biologique : huître plate, *Ostrea edulis* et huître creuse, *Crassostrea gigas*.

L'huître plate, *Ostrea edulis* (Fig. 1), est présente de la Norvège jusqu'au Maroc ainsi qu'en Méditerranée et en Mer Noire. Les primocultures ont été conduites à partir d'animaux élevés dans le Morbihan.

L'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Fig. 1), ou huître japonaise, est aujourd'hui l'espèce la plus largement élevée en France et connaît un essor dans divers pays du monde. Les huîtres creuses utilisées pour ce travail sont originaires du bassin de Marennes-Oléron.

Ces huîtres sont maintenues en salle de quarantaine de l'écloserie d'IFREMER de Ronces les Bains dans des bacs prévus à cet effet. L'eau de mer circulant dans ces bacs est filtrée sur un filtre biologique et est renouvelée de manière cyclique à raison d'une heure toutes les six heures.

1.2. Les milieux de culture.

1.2.1. Les milieux synthétiques.

Nous nous sommes proposé de tester trois milieux de culture synthétiques : BHK21 (ou milieu Glasgow-MEM), 199 et L15 (ou milieu de Leibovitz). Ces trois milieux, commercialisés par GIBCO BRL, sont présentés sous une forme lyophilisée. Après leur reconstitution par addition de la quantité d'eau distillée préconisée par le fournisseur, ces milieux adaptés à la culture de cellules de vertébrés, ont une osmolarité d'environ 350 mOsm. Or, les cellules d'*Ostrea edulis* nécessitent une osmolarité d'environ 1000 mOsm. C'est pourquoi ces milieux ont été préparés ici sous une forme trois fois plus concentrée (3X) afin d'obtenir une osmolarité d'environ 1050 mOsm. Lorsqu'ils sont dilués avec de l'eau de mer (soit ~1000 mOsm) stérile, filtrée sur 0,22 μm , l'osmolarité de ces milieux reste compatible avec celle des cellules d'*Ostrea edulis*.

Ces milieux sont tamponnés par du Tris à 20 mM ainsi que du NaHCO_3 (selon les indications du fournisseur).

Le pH des solutions est ajusté à 7,4 avec de l'acide chlorhydrique fumant. Les milieux sont ensuite préfiltrés sur une double toile à 0,5 μm , puis ils sont filtrés stérilement, sous une hotte à flux laminaire horizontal, sur filtre à 0,22 μm , conditionnés en bouteilles stériles et conservés à 4°C.

Avant utilisation, ces milieux de culture sont testés à 37°C pendant 48 heures. Après deux jours d'incubation, un milieu non stérile se trouble.



Fig. 1. A gauche : huître plate, *Ostrea edulis* ; à droite : huître creuse, *Crassostrea gigas*.



Fig. 2. Huître creuse, *C. gigas*. Membrane de la cavité péricardique (flèche).

En ce qui concerne le milieu L15, nous avons aussi testé une reconstitution en eau de mer filtrée (EMF) sur 0,22 μm à 3% de L15 (p/v) selon les travaux de Kleinschuster *et al.* (1992).

1.2.2. Les milieux empiriques.

1.2.2.1. L'eau de mer.

L'eau de mer utilisée pour élaborer les milieux de culture, ou pour effectuer toute autre manipulation sur les cellules en culture, est prélevée à l'écloserie IFREMER de Ronce les Bains où elle est filtrée à un micron. Elle est ensuite filtrée sur 0,45 μm , puis sur 0,22 μm . L'eau est conditionnée en bouteilles stériles et conservée à 4°C.

Pour plus de sécurité vis-à-vis d'éventuels contaminants bactériens, une solution mère d'antibiotiques à 1000X est additionnée (sa préparation est présentée en annexe 1). Après dilution au 1/1000^e de cette solution, une concentration finale en antibiotiques de 100 U/ml de pénicilline, 0,1 mg/ml de streptomycine et 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fluméquine est obtenue.

1.2.2.2. L'hémolymphe, méthode de ponction.

L'hémolymphe est l'analogue du sang chez les invertébrés. Outre les éléments figurés qui la composent, elle renferme un plasma de nature très complexe et mal connue. La composition de l'hémolymphe varie selon les espèces, les individus et les conditions physiologiques de chaque animal (Mialhe *et al.*, 1988).

La ponction de l'hémolymphe est réalisée de façon simple chez *C. gigas*. Après avoir ouvert précautionneusement l'huître, sans léser la membrane de la cavité péricardique (Fig. 2), elle est retournée sur un papier absorbant afin d'éliminer l'excès d'eau de mer. L'hémolymphe est prélevée lentement dans la cavité péricardique, à l'aide d'une aiguille (23G, n°16) et d'une seringue de un millilitre. Il est possible de récupérer jusqu'à deux millilitres d'hémolymphe par animal. La suspension ainsi recueillie est centrifugée à 2500 rpm pendant 10 mn à 4°C, le surnageant est filtré sur 0,22 μm dans des conditions stériles, additionné éventuellement d'antibiotiques à une concentration finale de 1X. L'hémolymphe, ou sérum de *C. gigas* (SCG), est conservée à 4°C.

1.3. Technique d'obtention de primocultures de cellules d'huître.

La technique d'obtention de primocultures de cellules d'huître a été mise au point sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, (Le Deuff, comm. pers.). La méthode générale a été transposée à l'huître plate, *Ostrea edulis*, puis optimisée afin d'obtenir des primocultures de cellules cardiaques de cette dernière espèce.

La plupart des organes des mollusques bivalves est en contact avec le milieu extérieur. Ces organes sont alors contaminés par différents types de microorganismes ou de protozoaires (Mialhe *et al.*, 1988). Une des difficultés majeures de la mise en place de primocultures réside dans une décontamination préalable efficace des tissus.

1.3.1. Protocole de prélèvement et de dissociation des cellules cardiaques.

Décontaminées, dans un premier temps, par brossage et lavage des coquilles à l'eau courante, les huîtres subissent ensuite un bain d'alcool à 70° pendant 30 secondes. Elles sont disposées sur du papier absorbant sous une hotte à flux laminaire pour séchage. La suite des opérations est effectuée stérilement sous hotte à flux laminaire horizontal.

De la même manière que pour une ponction d'hémolymphe, l'huître est ouverte délicatement, sans léser la membrane de la cavité péricardique (Fig. 3). La masse viscérale est rincée à l'eau de mer additionnée de Tween 80 (0,1 %), puis à l'eau de mer (filtrée sur 0,45 µm et autoclavée). La membrane péricardique est incisée à l'aide d'un scalpel stérile (flambé à l'alcool). Une pince stérile permet de prélever le coeur entier (oreillettes et ventricule) et de l'immerger dans un broyeur de Dounce préalablement stérilisé et rempli d'environ 20 ml de milieu L15 : EMF (1:1). Après élimination du milieu L15 : EMF (1:1), les coeurs sont décontaminés par une solution de Dakin modifié, à 1000 mOsm, dont la composition est présentée dans le tableau 1. Après 10 mn d'incubation dans le Dakin, les coeurs sont rincés dans du L15 : EMF (1:1) qui est ensuite remplacé par une solution de trypsine-versène (16 ml) et dont la formulation est indiquée dans le tableau 2, diluée au 1/8 dans du L15 : EMF (1:1).

La dissociation enzymatique est couplée à une dissociation mécanique par un mouvement « aller et retour » du piston A dans le Dounce. L'action mécanique est précise : trois coups de piston par minute pendant les trois premières minutes, puis un coup de piston par minute pendant les sept minutes suivantes. Après 10 mn de digestion, l'action de la trypsine est neutralisée par addition de 16 ml d'une solution de SVF décomplémenté, 30 mn à 56°C qui est diluée au 1/10^e dans du L15 : EMF (1:1). Les cellules ainsi dissociées sont centrifugées à 2500 rpm pendant 15 mn à 20°C.



Fig. 3. Huître plate, *O. edulis*. Membrane de la cavité péricardique (flèche).

1.3.2. Mise en culture des cellules.

Le culot de cellules est resuspendu dans le milieu de culture désiré. La culture des cellules est conduite sur plaque de culture six puits. Deux millilitres de suspension cellulaire sont distribués par puits. Huit coeurs sont considérés nécessaires pour ensemercer une plaque de six puits et obtenir un inoculum suffisant. Les boîtes de culture sont incubées à 20°C, à l'obscurité.

1.3.3. Entretien des primocultures.

A jour J=1, 2, 3, 5, 7 et 10, le surnageant est éliminé des puits, le tapis cellulaire est rincé avec deux millilitres de milieu L15 : EMF (1:1) et remplacé par deux millilitres de milieu neuf.

1.4. Test de différents milieux de culture.

Nous avons voulu comparer différents milieux de culture afin de retenir celui qui permettrait la meilleure survie cellulaire et une éventuelle multiplication des cellules.

Trois milieux synthétiques ont été testés : L15, 199, BHK21, tous sont dilués dans les proportions 1:1 en EMF. Le mélange SCG : EMF (1:1) et EMF seule sont également utilisés au cours de nos expériences. Pour rappel, l'eau de mer utilisée ici est stérilisée par filtration sur 0,22 µm, additionnée d'antibiotiques et conservée au réfrigérateur. En effet, par stérilisation à l'autoclave, l'eau de mer forme un petit précipité blanc au fond des bouteilles. Il s'agit probablement de précipités de sels se formant à la chaleur. Pour les cultures de cellules, il est préférable de limiter l'addition de tels précipités qui pourraient interférer avec les métabolismes cellulaires. C'est pourquoi, l'eau de mer est filtrée.

Tous ces milieux de base sont complétés avec 10% de SVF, 5% de SCG et une solution d'antibiotiques à une concentration finale de 1X.

Après dissociation des cellules et neutralisation de la trypsine par le SVF, la suspension cellulaire est aliquotée en fonction du nombre de milieux testés. Après centrifugation, chaque fraction de culot cellulaire est resuspendue dans le volume de milieu de culture nécessaire.

Pour l'entretien des cultures, les tapis cellulaires sont rincés avec les milieux de base respectifs sans additifs (SVF et SCG). Plusieurs techniques ont été testées :

* A jour J = 1, 2 et 3, le surnageant éliminé, le tapis cellulaire est rincé avec le milieu de base correspondant et est remplacé par du milieu neuf. A jour J = 5, 7 et plus, le tapis cellulaire n'est pas rincé, seul le milieu est changé.

* Les trois premiers jours les tapis cellulaires sont traités comme précédemment. A partir du cinquième jour, seul un ml de surnageant est prélevé et est remplacé par la même quantité de milieu neuf.

1.5. Test de la poly-D-lysine.

La poly-D-lysine utilisée dans ce test est commercialisée par BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA, sous une forme lyophilisée stérile. La solution de polymère est reconstituée dans de l'eau distillée stérile à raison de 0,1 mg/ml et est conservée à -20°C.

Les puits de culture de 10 cm² sont traités extemporanément à raison de deux millilitres de poly-D-lysine à 0,1 mg/ml. Après une incubation de 10 mn à température ambiante, sous la hotte, le surnageant est éliminé et les puits sont rincés deux fois par deux millilitres d'eau distillée stérile.

Ce test a été effectué pour chacun des milieux décrits dans le paragraphe précédent, dans les mêmes conditions.

1.6. Variation des proportions eau de mer/hémolymphe dans le milieu de culture.

En partant des résultats obtenus avec le milieu SCG : EMF (1:1), 10% SVF et 5% SCG, nous avons voulu tester l'influence des proportions relatives de SCG et d'EMF dans le milieu de culture. Sept ratios d'EMF/SCG : 6/0, 5/1, 4/2, 3/3, 2/4, 1/5, 0/6, ont été testés.

Les proportions de SVF ne varient pas. Pour sept puits de culture, neuf coeurs d'*O. edulis* ont été disséqués. Les ratios ont été conservés pour les mélanges servant au rinçage des tapis cellulaires.

1.7. Addition au milieu de culture d'un anti-aggrégant, l'Alsever.

La composition de l'Alsever est décrite dans le tableau 3. Trois concentrations de cet anti-aggrégant et un témoin négatif ont été testés. Il a été dilué au 1/500e, 1/1000e, 1/5000e, pour des proportions finales de 0,2%, 0,1% et 0,02%.

Les mélanges de rinçage ne contiennent pas d'Alsever.

Ce test a été effectué en double, d'une part, avec le milieu de culture SCG/EMF (1:1), 10% SVF et les quantités décroissantes d'Alsever et d'autre part avec le milieu décrit par Kleinschuster *et al.* en 1992. Il s'agit d'un milieu L15 à 3% (p/v) reconstitué en EMF qui est ensuite dilué au demi en

SCG (L15 3%/SCG = 3/3). Nous l'avons additionné de 10% SVF et de proportions décroissantes d'Alsever.

Pour huit puits de culture, 11 huîtres ont été sacrifiées.

1.8. Test de variation de la proportion en sérum de veau foetal dans le milieu de culture.

Quatre proportions de SVF ont été comparées : 0%, 1%, 5%, 10% ; pour deux milieux de culture : EMF/SCG (4/2) et L15 3%/SCG (3/3). Les deux milieux sont complétés avec 0,2% d'Alsever. Pour huit puits de culture, 12 coeurs d'huître plate ont été prélevés.

1.9. Technique de préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission (MET).

Le protocole général de préparation des échantillons pour la MET est le même dans les deux cas, pour les cellules adhérentes et pour les cellules en suspension. Il consiste à fixer les cellules dans une solution de glutaraldéhyde à 3% dans un tampon cacodylate dont l'osmolarité est fixée à 1100 mOsm pour les cellules de mollusques marins. Cette étape est suivie d'une post-fixation à l'acide osmique à 1% dans le même tampon, d'une déshydratation et d'une inclusion en résine Epon. La composition des réactifs est présentée en annexe 2.

Les blocs d'Epon sont coupés à l'aide d'un ultramicrotome NOVA LKB en coupes semi-fines (1 µm), dans un premier temps et observées au microscope photonique pour repérer l'objet dans le bloc, puis en coupes ultrafines (80 à 100 nm) qui sont observées grâce à un microscope électronique à transmission JEOL JEM 1200EX, à 60 Kv..

Les coupes semi-fines sont colorées à chaud au bleu de toluidine et sont montées entre lame et lamelle à l'Eukitt pour observation. Les coupes ultra-fines sont déposées sur grilles de cuivre et sont contrastées à l'acétate d'uranyle à 2,5% en solution alcoolique à 50° et au citrate de plomb à 0,4% en solution alcaline.

1.9.1. Traitement des cellules en culture adhérentes, *in situ*.

Après une semaine de culture, au minimum, les cellules sont traitées directement dans les puits de culture, si le tapis est suffisamment dense. Le protocole suivi, détaillé en annexe 3, appliqué à une monocouche cellulaire, est plus rapide que pour le traitement de pièces de tissus d'huître. La déshydratation se fait à l'éthanol pour les boîtes de culture en plastique.

1.9.2. Traitement des cellules en culture en suspension.

Les surnageants de culture sont récupérés et centrifugés en tubes Eppendorf à 2500 rpm pendant 10 mn à 20°C. Lorsque les cellules sont en quantité suffisante pour être traitées, un petit culot blanchâtre se forme. Les culots cellulaires sont fixés et post-fixés comme pour un traitement *in situ*. Cependant, pour faciliter les manipulations de déshydratation et d'inclusion en Epon, les culots sont préalablement inclus en agarose à faible point de fusion, à 1%. La déshydratation en tube Eppendorf est réalisée par des bains d'éthanol, puis par l'oxyde de propylène. Pour l'inclusion en Epon, la résine est versée directement dans le tube qui est découpé après polymérisation à 60°C. Une technique différente consiste à déposer le petit morceau d'agarose, contenant le culot cellulaire, dans un moule en matière plastique souple prévu pour la confection des blocs de résine.

2. RESULTATS.

2.1. *Comparaison des différents milieux de culture.*

Au cours des trois premiers jours de culture, les différences de survie cellulaire entre les différents milieux de culture ne sont pas perceptibles. En effet, cette période est considérée comme critique. De nombreux débris cellulaires sont éliminés par rinçages soigneux et répétés des tapis cellulaires. Les cellules apparaissent alors de petite taille, mais elles semblent adhérer au fond des puits.

Dès le quatrième jour, les débris éliminés, le fond des puits s'éclaircit et les cellules adhérentes commencent à s'étaler. Des variations morphologiques de ces cellules sont observables. Les cellules de type fibroblastique ou de type cardiomyocyte présentent un aspect fusiforme, alors que les cellules de type hémocytaire semblent rester arrondies.

De nombreux amas cellulaires sont fixés au support de culture. Les cellules adhérentes tendent à proliférer à proximité de ces amas.

A partir du septième jour, l'aspect général de la prolifération cellulaire apparaît variable selon les milieux de culture. Les milieux synthétiques ne permettent pas d'obtenir de bons résultats, les cellules semblent dégénérer. Les deux milieux empiriques à base d'eau de mer et d'hémolymphe permettent d'obtenir de meilleurs résultats. Les cellules, de bel aspect, sont étalées et semblent se multiplier jusqu'à J 7, après quoi, la densité cellulaire paraît diminuer progressivement.

Par ailleurs, il semble que des cellules en suspension apparaissent dans les cultures et que leur nombre augmente avec le nombre de jours de culture pour tous les milieux de cette expérience.

2.2. *Rôle de la poly-D-lysine sur l'adhésion des cellules.*

Après deux jours de culture, la différence de capacité d'adhésion des cellules est observable entre les puits traités à la poly-D-lysine et les puits non traités, où elle est la plus faible.

Après sept jours de culture, une survie cellulaire, voire une prolifération, est constatée et est optimale dans les puits traités à la poly-D-lysine (Fig. 4). Les cellules en puits non traités n'adhèrent pas et sont éliminées par les rinçages (Fig. 5).

Là aussi, à J 7, les cellules en milieux synthétiques paraissent dégénérer. Seuls les milieux empiriques présentent des cellules adhérentes possédant une morphologie plus normale (Figs. 4, 5 et 6).

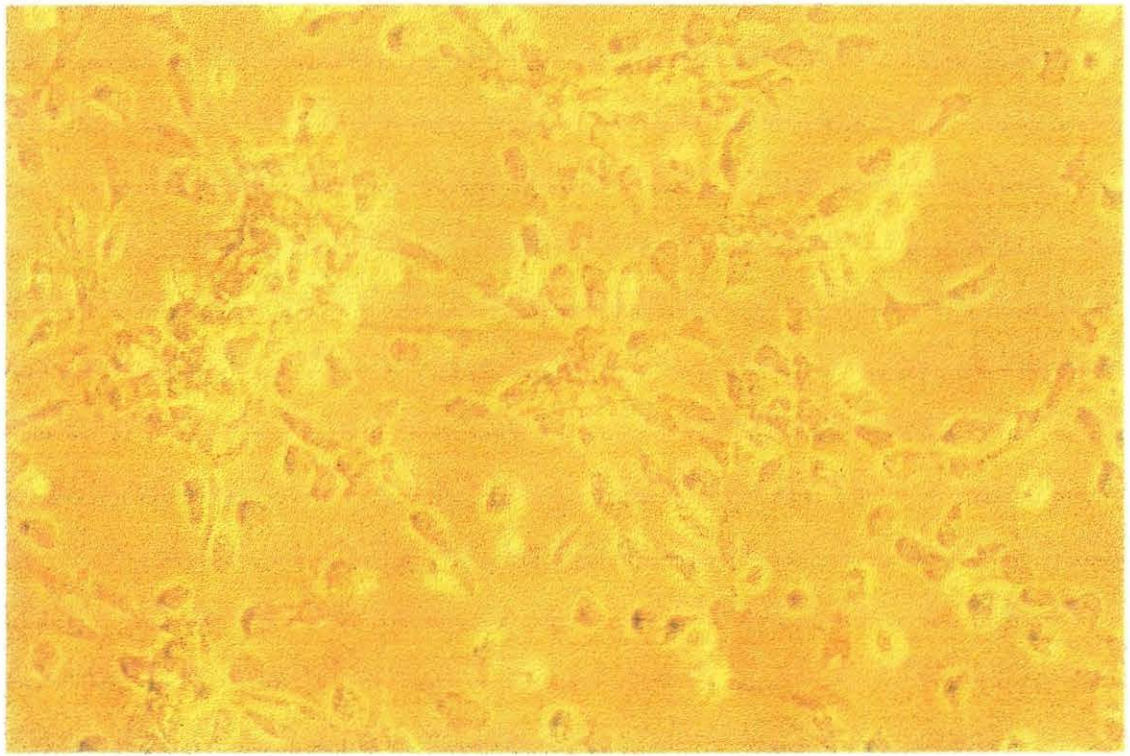


Fig. 4. Cliché de primoculture de cellules cardiaques d'*O. edulis* après sept jours de mise en culture. Test de la poly-D-lysine. Milieu EMF/SCG (1/1) additionné de 10% de SVF, en puits traité à la poly-D-lysine.

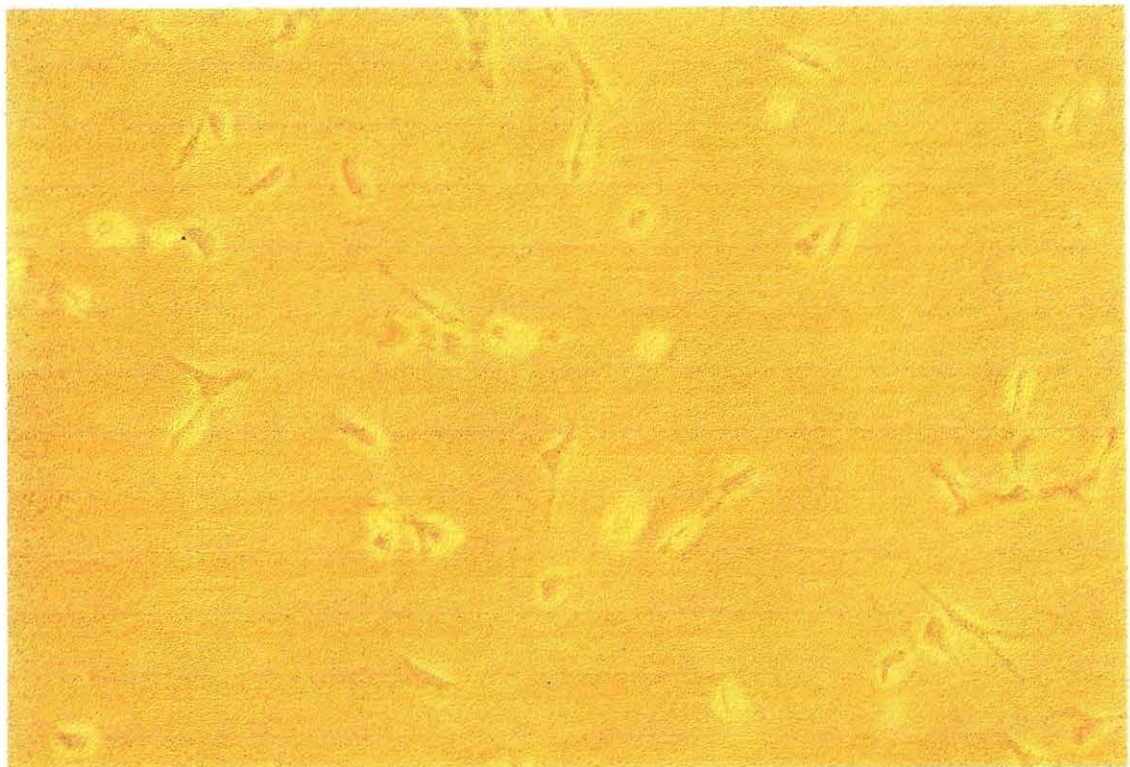


Fig. 5. Cliché de primoculture de cellules cardiaques d'*O. edulis* après sept jours de mise en culture. Test de la poly-D-lysine. Milieu EMF/SCG (1/1) additionné de 10% de SVF, en puits non traité à la poly-D-lysine.

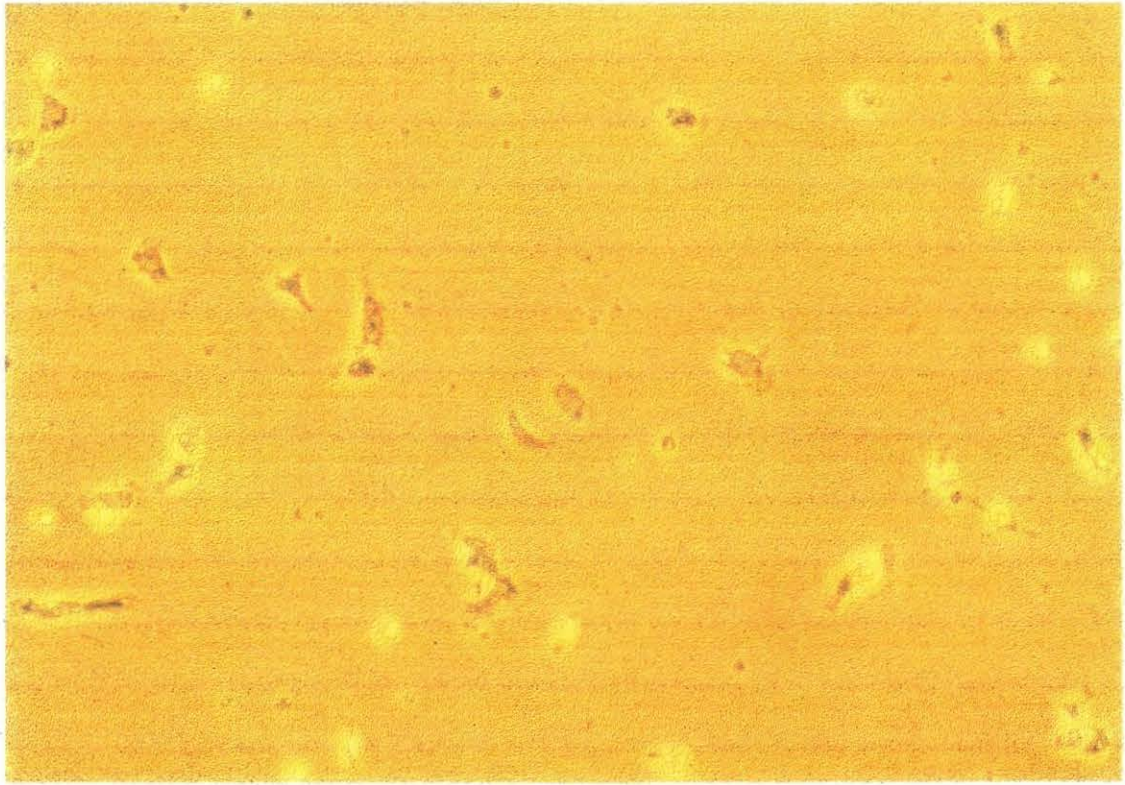


Fig. 6. Cliché de primoculture de cellules cardiaques d'*O. edulis* après sept jours de mise en culture. Test de la poly-D-lysine. Milieu EMF additionné de 10% de SVF et 5% de SCG, en puits non traité à la poly-D-lysine.

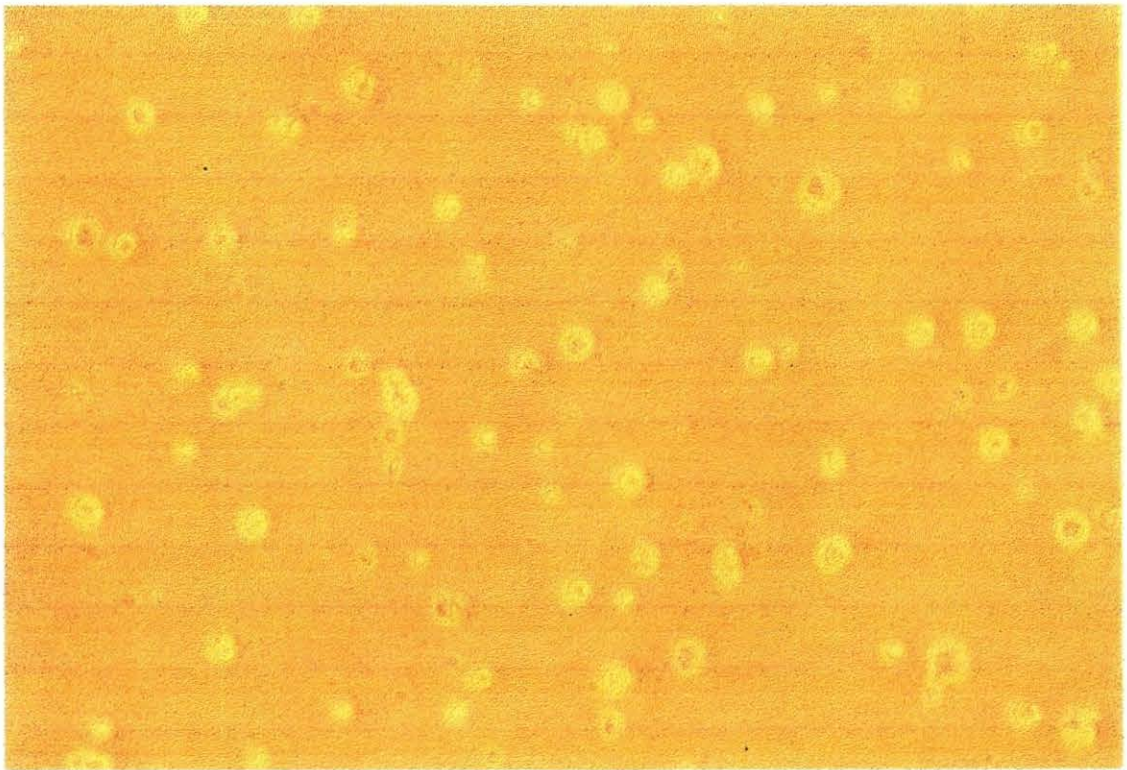


Fig. 7. Cliché de cellules en suspension après huit jours de mise en culture, prélevées du puits en milieu L15/EMF (1/1) additionné de 10% de SVF, 5% de SCG et en puits traité à la poly-D-lysine.

Le milieu considéré comme étant optimum est le mélange SCG : EMF (1:1) additionné de 10% de SVF, en puits traité à la poly-D-lysine. Les cellules des puits traités et correspondant au milieu EMF, 10% SVF et 5% SCG et au milieu EMF : SCG (1:1), 10% SVF ont été fixées en glutaraldéhyde à 3% *in situ* et sont préparées pour la MET (cf. paragraphe 2.6.1.).

Des cellules en suspension (Fig. 7) apparaissent dans les puits traités et non traités par la poly-D-lysine. Ces cellules ont été elles aussi fixées en glutaraldéhyde à 3%.

2.3. Variation des proportions eau de mer/hémolymphe dans le milieu de culture.

Après trois jours de culture, les cellules adhérentes présentent un aspect morphologique correct dans tous les milieux testés. Elles demeurent cependant en nombre restreint. Dès le quatrième jour, des cellules en suspension sont observables. Au cinquième jour, les cellules fixées en plus grand nombre semblent se situer dans le milieu de culture de ratio 0/6. A partir du sixième jour d'incubation, le milieu est changé tous les deux jours.

Les cellules adhérentes paraissent moins nombreuses au profit des cellules en suspension. Ces dernières sont récupérées lors du changement de milieu et sont fixées en glutaraldéhyde à 3% afin de les traiter pour la MET.

En deux jours, d'autres cellules en suspension sont apparues, bien que la population de cellules adhérentes ne semble pas régresser. Ces cellules flottantes sont prélevées et centrifugées lentement (700 rpm, 10 mn) afin d'en éliminer l'ancien milieu de culture et de le remplacer par du nouveau. La suspension obtenue est placée dans le puits d'origine pour être en présence de cellules adhérentes.

Jusqu'au 25^e jour de culture, les cellules adhérentes présentent un aspect morphologique correct, elles s'étalent bien à la surface des puits, elles forment des ramifications pour se mettre en contact avec les cellules voisines. Cependant, des variations entre les différents ratios ne sont pas observables. Par la suite, les cellules en suspension envahissent les puits et toute la population cellulaire semble dégénérer.

2.4. Addition d'un anti-aggrégant au milieu de culture.

Les cellules ont été numérées lors de leur mise en culture dans les puits, l'ensemencement étant effectué à raison de $1,5 \cdot 10^6$ cellules par puit (sous deux ml de milieu).

Comme pour les autres tests, les trois premiers jours d'incubation consistent en un changement de milieu de culture journalier accompagné de rinçages soigneux des tapis cellulaires afin

d'éliminer le maximum de débris cellulaires. Dès le quatrième jour, il est possible d'observer des cellules adhérentes réparties régulièrement à la surface des puits. Le lendemain, la densité cellulaire semble s'être accrue. Les amas cellulaires paraissent toujours aussi nombreux, malgré la présence d'un anti-aggrégant. En outre, l'Alsever ne semble pas modifier la croissance cellulaire, à ce stade aucune différence entre les puits ne semble observable. Cependant la présence d'Alsever semble permettre une meilleure distribution des cellules sur l'ensemble du fond des puits de culture (Fig. 8).

Au huitième jour, le milieu de culture est changé, mais sans rinçage préalable des puits car la proportion de débris cellulaires apparaît faible. A partir du 13^e jour, seul un millilitre de surnageant des puits est renouvelé par du milieu neuf et cela, environ tous les trois jours.

Les cellules ont un très bel aspect morphologique. Les amas cellulaires sont sujets à de nombreuses contractions régulières. La morphologie des cellules semble variable en fonction du milieu de culture utilisé, elle paraît plus arrondie en milieu à base d'EMF et de SCG alors qu'un milieu à base de L15 et de SCG favoriserait des formes plus effilées, plus arborescentes.

Des cellules en suspension sont apparues également au cours de cette manipulation. Ce phénomène semble être une constante dès lors que les cellules adhérentes s'étalent et qu'elles donnent l'impression d'avoir un métabolisme actif.

Au 20^e jour, la différence de croissance cellulaire entre les deux catégories de milieu est nette, en milieu à base de L15/SCG les cellules sont nombreuses et bien étalées alors qu'en milieu à base d'EMF/SCG les cellules adhérentes sont peu nombreuses et peu étalées. Progressivement, la densité cellulaire régresse dans le milieu à base d'EMF/SCG. C'est, dans l'autre milieu de culture (à base de L15/SCG) que de faibles variations entre les puits seront observées à partir du 28^e jour. Les cellules adhérentes les plus nombreuses et de belle morphologie semblent se trouver dans le puits dont le milieu à base de L15/SCG contient 0,02% d'Alsever, contrairement aux puits à 0 et 0,2% d'Alsever où les cellules sont les moins nombreuses.

Trente et un jours après leur mise en culture, les cellules en milieu à base de L15/SCG ne semblent pas être altérées, cependant, la densité cellulaire semble diminuer progressivement avec le nombre de jours.

2.5. Etude de l'influence de la proportion en sérum de veau foetal dans le milieu de culture.

Dès le quatrième jour, les cellules adhérentes les plus nombreuses et présentant une morphologie correcte se situent dans les puits contenant le milieu à base d'EMF/SCG. Le démarrage de la culture semble moins facile avec le milieu à base de L15/SCG. Après sept jours de culture, les cellules adhérentes n'ont toujours pas acquis l'aspect morphologique obtenu dans les autres tests. Il semble que les cellules éprouvent des difficultés à démarrer leur croissance. La densité cellulaire la plus importante paraît se situer dans les puits à 10% de SVF pour les deux catégories de milieu.

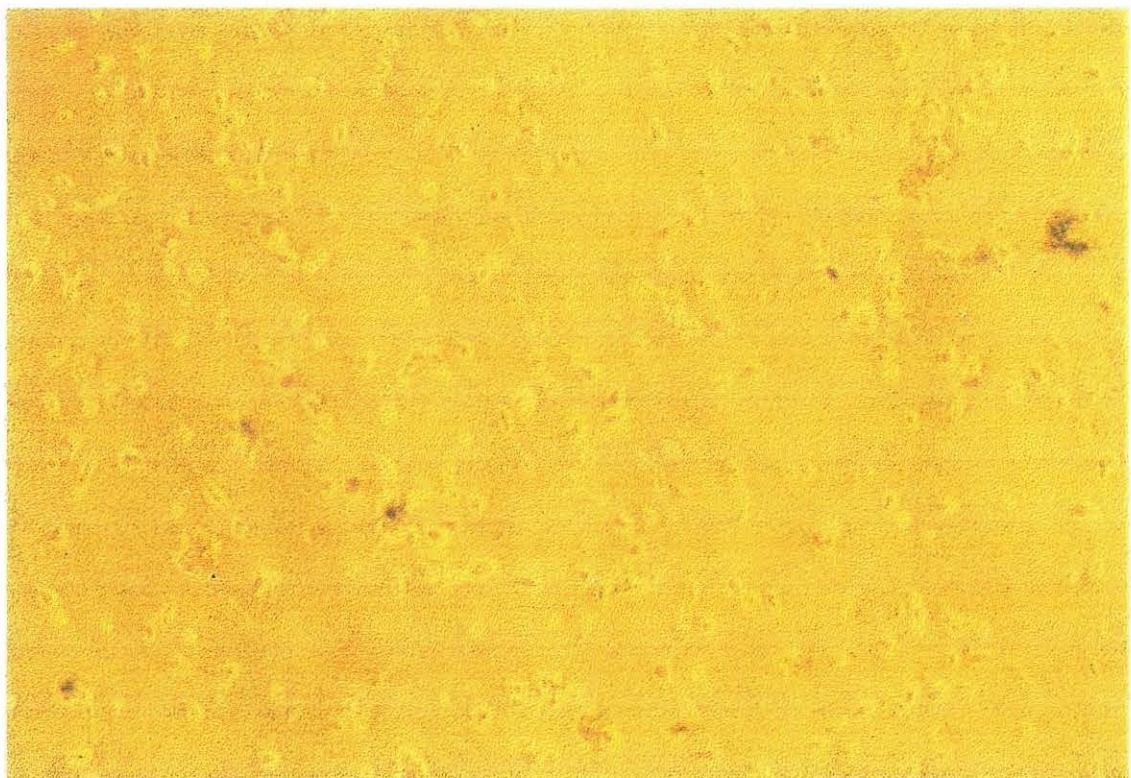


Fig. 8. Cliché de primoculture de cellules cardiaques d'*O. edulis* après huit jours de mise en culture. Test de l'Alsever. Milieu EMF/SCG (1/1) additionné de 10% de SVF et 0,2% d'Alsever, en puits traité à la poly-D-lysine.

Quand la quantité de SVF contenue dans les milieux de culture décroît, la prolifération cellulaire semble en être affectée. Au 16^e jour, aucune modification ne semble observable. A J 20, les cellules sont peu nombreuses, mais elles ont un aspect morphologique relativement correct.

2.6. Analyse en MET de différents échantillons de cellules cardiaques d'huître plate, *Ostrea edulis*.

2.6.1. Analyse des cellules adhérentes *in situ*.

L'analyse de cellules adhérentes a porté sur deux échantillons (cf. paragraphe 2.2). Cette analyse permet de mettre en évidence un type majoritaire de cellules dans des primocultures de sept jours : de grandes cellules présentant des granulations polymorphes plus ou moins denses aux électrons d'un diamètre compris entre 500 nm et 5 µm (Figs. 9 et 10). Ces cellules présentent un aspect morphologique correct avec une bonne conservation des membranes nucléaires et cytoplasmique. Cependant, il est possible d'observer des structures comparables à des phagolysosomes, pour un nombre important de ces cellules (Fig. 11). En outre, ces cellules semblent pouvoir constituer les amas cellulaires observables en microscopie photonique (Fig. 12).

Par ailleurs, il semble qu'il soit possible d'observer une autre catégorie cellulaire de type hémocytaire, hémocyte granuleux ou hyalinocyte (Figs. 13 et 14). Ces cellules semblent également en bon état, des organites possédant une structure normale, tels que le réticulum endoplasmique granuleux, les mitochondries ou encore les saccules golgiens, sont observables dans le cytoplasme (Fig. 14). Ces cellules, à l'inverse des cellules granuleuses, apparaissent isolées et ne semblent pas former d'amas. En revanche, elles présentent des prolongements cytoplasmiques nombreux (Fig. 14). Apparemment, aucun autre type cellulaire ne semble être observable dans les puits de culture.

Ces deux types de cellules sont rencontrés quel que soit le milieu de culture utilisé : soit le milieu composé de EMF/SCG (1/1), 10% SVF, soit le milieu EMF, 10% SVF, 5% SCG.

2.6.2. Analyse des cellules en suspension.

L'analyse des cellules en suspension a porté sur plusieurs échantillons (cf. paragraphes 2.2. et 2.3.). Cette analyse permet de mettre en évidence une certaine hétérogénéité des types cellulaires rencontrés (Fig. 15). En effet, il est possible d'observer de grandes cellules de type granuleuses, des hémocytes granuleux, des hyalinocytes et d'autres types de cellules dont la caractérisation reste difficile. A l'inverse des cellules adhérentes observées au paragraphe précédent, la morphologie des cellules en suspension apparaît très altérée. En effet, un grand nombre de cellules présentant une intense vésiculation (Fig. 16) ainsi qu'une accumulation de membranes myélinoïdes

(Fig. 17) sont observables. Par ailleurs, de très nombreuses cellules granuleuses présentent des structures identifiables à des résidus de phagocytose. Dans ces cellules, des granules dont l'aspect est non homogène sont également observées. Des variations dans la conservation d'une morphologie normale selon les échantillons semble intervenir.

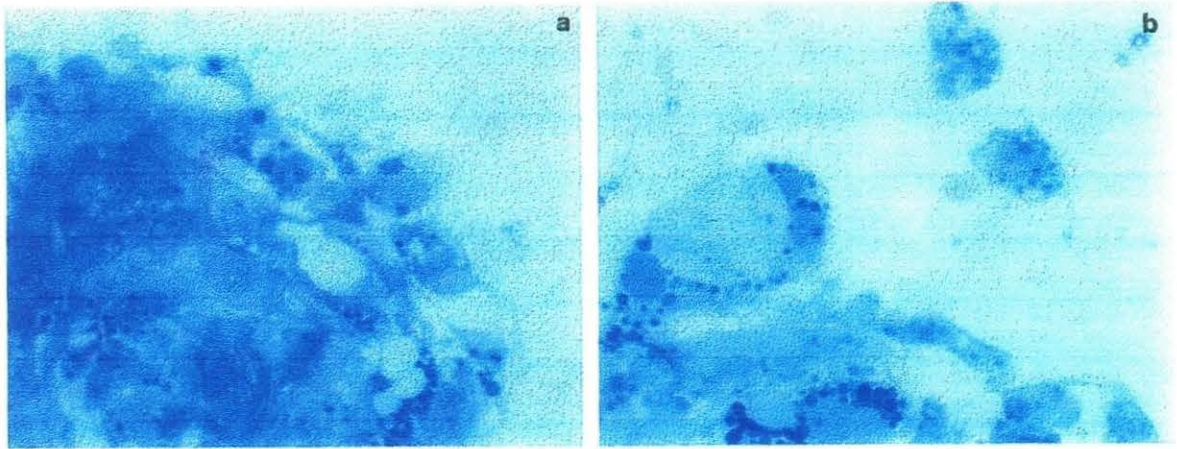


Fig. 9. Cliché en microscopie photonique d'une coupe semi-fine de cellules cardiaques d'*O. edulis* adhérentes et fixées *in situ* (a et b).

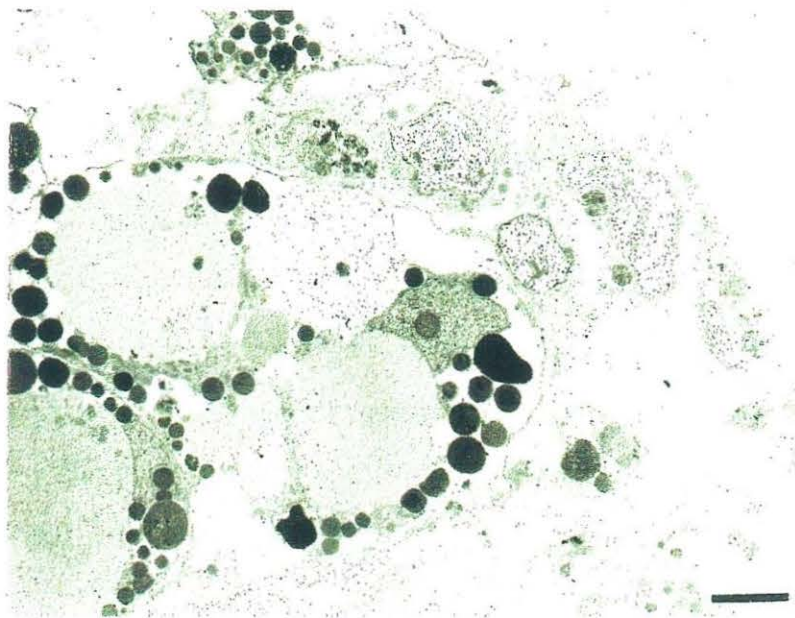


Fig. 10. Cliché en MET de grandes cellules à granulations polymorphes denses aux électrons (cellules pigmentées). Barre : 5 μ m.

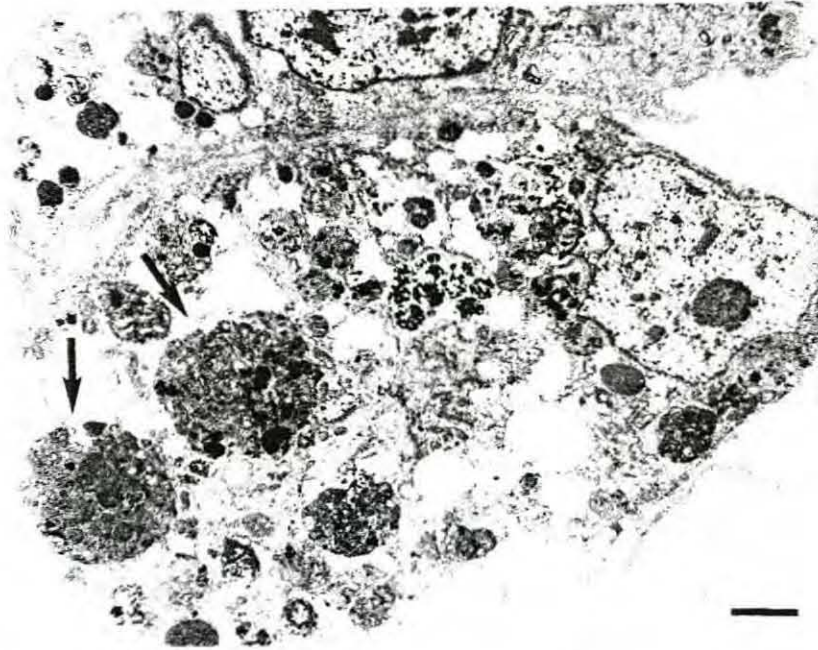


Fig. 11. Cliché en MET d'une cellule pigmentée présentant des structures comparables à des phagolysosomes (flèches). Barre : 2 μm .

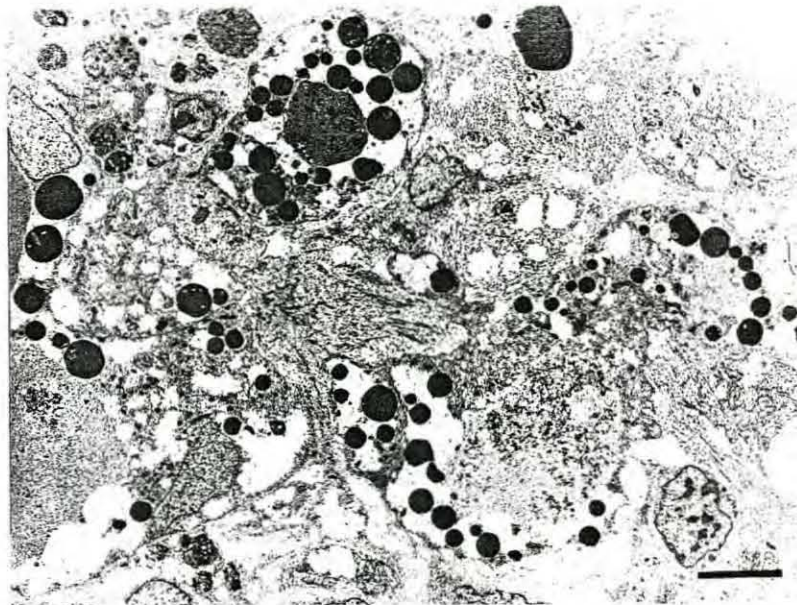


Fig. 12. Cliché en MET montrant un amas de grandes cellules pigmentées. Barre : 5 μm .

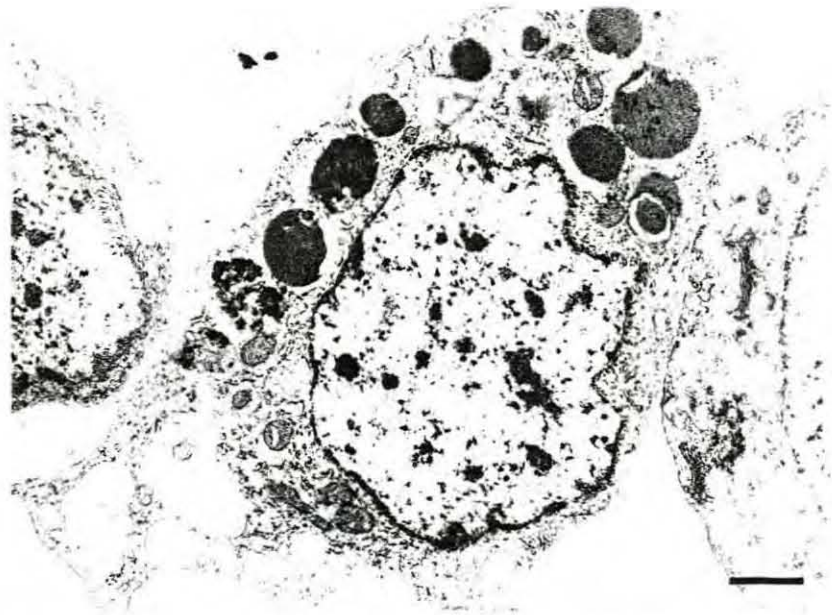


Fig. 13. Cliché en MET d'une cellule de type hémocyte granuleux. Barre : 1 μ m.

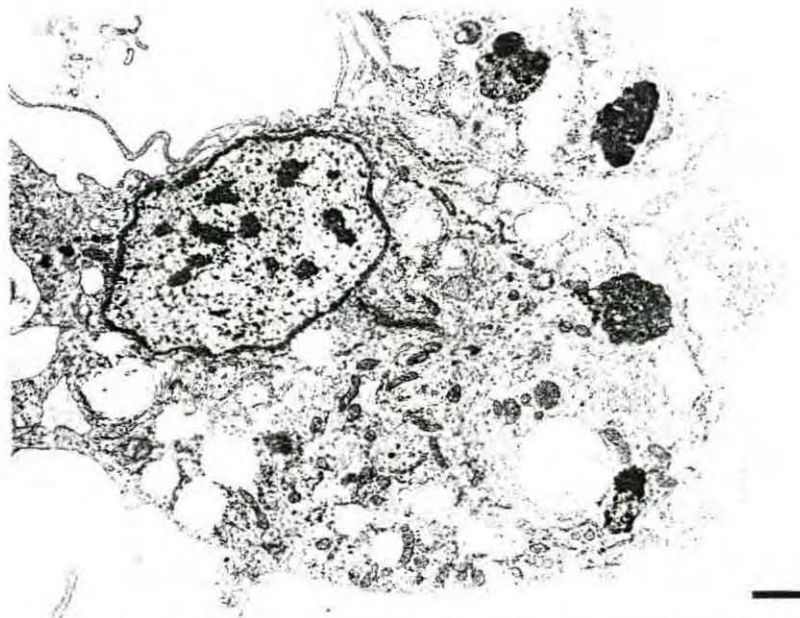


Fig. 14. Cliché en MET d'une cellule de type hyalinocyte. Noter la présence de mitochondries, saccules de Golgi et réticulum endoplasmique granuleux à structure normale. Barre : 1 μ m.

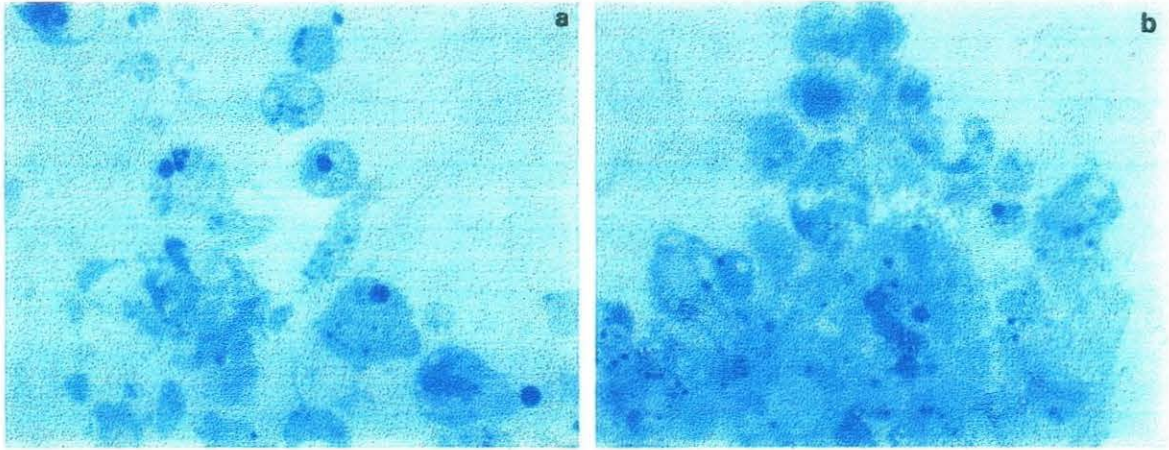


Fig. 15. Cliché en microscopie photonique d'une coupe semi-fine de cellules cardiaques d'*O. edulis* en suspension (a et b).

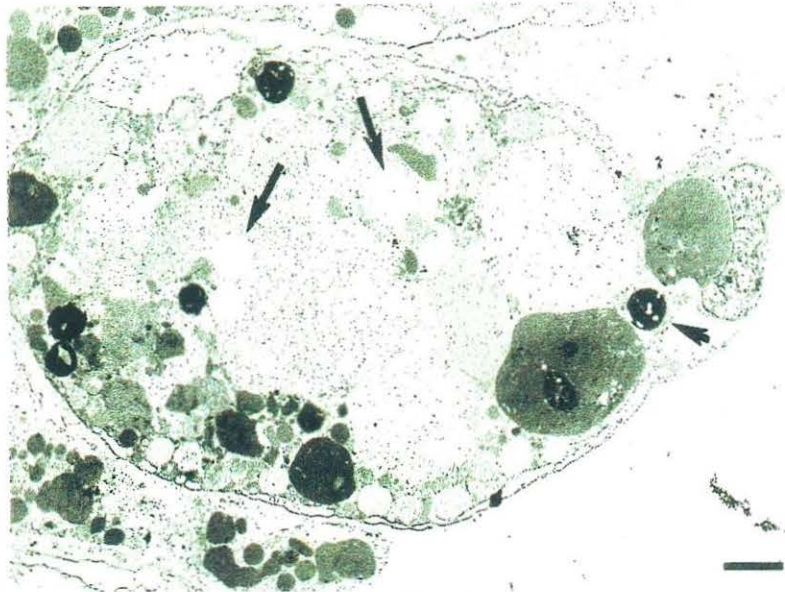


Fig. 16. Cliché en MET d'une cellule présentant d'importantes vacuoles (flèches). Aspect non homogène des granules denses aux électrons (tête de flèche). Barre : 2 μ m.

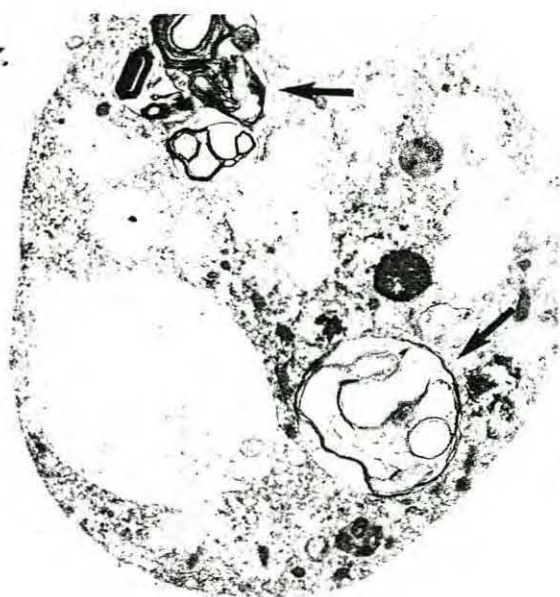


Fig. 17. Cliché en MET d'une cellule présentant une accumulation de membranes myélinoides (flèches).
Barre : 1 μ m.

DISCUSSION.

En milieux synthétiques reconstitués avec de l'eau distillée, les cellules ne paraissent pas avoir un aspect morphologique correct. Ce phénomène peut être lié à la qualité de l'eau distillée utilisée pour la préparation de ces milieux. Ce mode de reconstitution ne nous semble pas convenable, c'est pourquoi un milieu synthétique, le L 15, reconstitué en eau de mer a été testé.

Wen *et al.* (1993a) signalent que la forte concentration en acides aminés des milieux de culture, combiné au bicarbonate de sodium pourrait initier des précipités à la surface des cellules. Cependant, la plupart des milieux de culture, hormis le L15, sont tamponnés par du bicarbonate de sodium, ce qui pourrait contribuer aux bons résultats obtenus avec ce milieu.

Le milieu L15 reconstitué avec de l'eau distillée et dilué au demi en EMF ne donne pas d'aussi bons résultats que ceux obtenus avec le L15 reconstitué avec de l'EMF et dilué au demi en SCG. L'apport de SCG à ce milieu synthétique semble bénéfique. En effet, le milieu L15 ne contient ni proline, ni taurine, alors que ces acides aminés sont contenus dans l'hémolymphe des bivalves marins. Toutefois, si ils sont ajoutés au milieu synthétique, ils ne permettent pas d'obtenir de meilleurs résultats (Wen *et al.*, 1993b). Il semble que d'autres facteurs existant dans l'hémolymphe puissent être à l'origine d'une meilleure prolifération cellulaire. Ainsi, une connaissance plus approfondie des composants de l'hémolymphe apparaît nécessaire. En effet, plusieurs publications signalent que l'utilisation d'hémolymphe dans les milieux de culture de primocultures d'huître creuse permettrait d'améliorer la croissance cellulaire. Toutefois, une telle approche reste empirique. C'est pourquoi, une identification de constituants particuliers faciliterait peut-être des progressions dans le domaine des primocultures et des lignées cellulaires de mollusques bivalves marins. En effet, les résultats obtenus dans le test de « comparaison des milieux », avec le milieu SCG : EMF (1:1) et les résultats obtenus dans le test de « variation des proportions SCG/EMF » avec le même milieu de culture n'étaient pas semblables. Certes, le facteur « cellules » peut être considéré. Ce paramètre concerne la qualité des cellules, qui varie selon l'état physiologique des animaux prélevés, ainsi que la densité de la suspension mise en culture. Le facteur « eau de mer » est à éliminer car celle-ci provient du même lot, il en est de même pour le sérum de veau foetal puisqu'un seul lot a été utilisé. Le facteur « hémolymphe » est à étudier. En effet, la composition de cette dernière, notamment sa concentration en acides aminés, varie beaucoup selon les espèces, les individus, les conditions physiologiques de chaque animal et la salinité de l'environnement (Mialhe *et al.*, 1988 ; Wen *et al.*, 1993b).

Contrairement aux résultats observés lors des travaux de Le Deuff *et al.* (comm. pers.), où 10% de SCG semblait toxique pour les cellules cardiaques d'huître creuse, *C. gigas*, nous obtenons de bons résultats de survie cellulaire pour un milieu EMF : SCG de ratio 2/4 (soit ~ 67% de SCG), additionné de 10% de SVF. De même, le milieu EMF : SCG de ratio 0/6 (100% de SCG) ne semble pas toxique pour nos cultures.

L'examen en MET des cellules adhérentes de primocultures de cellules cardiaques d'huître plate ne permet de déceler que deux types cellulaires distincts : de grandes cellules granuleuses et des cellules de type hémocytaire. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus lors des travaux d'essais de primocultures de cellules cardiaques d'huître creuse (Le Deuff, comm. pers.). En effet, dans le cas de l'huître creuse, une diversité de types cellulaires peut être notée : cardiomyocytes, hémocytes-like, fibroblastes-like et grandes cellules granuleuses étaient observables. Cependant, il est à noter que les essais de primocultures de cellules cardiaques d'huître creuse ont été réalisés à partir de ventricules et non de coeurs entiers. Dans nos essais de primoculture de cellules cardiaques d'huître plate, le coeur dans sa totalité, ventricule et oreillettes, a été utilisé pour ensemercer les puits de culture. Des analyses précédemment effectuées, au laboratoire, en MET, sur des échantillons de coeur d'huître plate (Lipart, 1993) montrent que les oreillettes cardiaques chez *O. edulis* sont très riches en grandes cellules pigmentées. Ainsi, la grande quantité de cellules pigmentaires observées dans nos essais peut être expliquée par ce fait. Par ailleurs, la présence de structures pouvant être interprétées comme des phagolysosomes à l'intérieur des grandes cellules granuleuses laissent suspecter une activité phagocytaire de ces dernières. De ce fait, il est possible d'émettre l'hypothèse que les différents types cellulaires cardiaques soient éliminés des puits par ces grandes cellules pigmentées.

Nous avons cependant constaté qu'il était difficile d'évaluer de véritables différences entre les sept ratios testés en EMF/SCG. C'est pourquoi, il serait intéressant de reprendre les tests en plaque de 96 puits. La densité des monocouches serait appréciée par une technique colorimétrique, au cristal violet par exemple, la lecture se ferait alors en densité optique. Il serait aussi possible d'y appliquer un test d'incorporation de thymidine tritiée qui informerait, par comptage radio-actif, de la prolifération cellulaire. De telles techniques permettraient d'obtenir des résultats quantitatifs. En outre, la multiplication du nombre de tests offrirait la possibilité d'en faire une approche statistique.

Par ailleurs, Wen *et al.* (1993b) observent de nombreuses cellules fibroblaste-like ainsi que de nombreuses cellules en suspension après un traitement à la trypsine pour dissocier les tissus. C'est aussi le cas pour nos primocultures. Une apparition de cellules en suspension, parmi les cellules adhérentes, est constatée de manière générale quels que soient les milieux utilisés.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

- Les cellules adhérentes pourraient se détacher pour entrer en phase de dégénérescence.

- Les cellules en suspension pourraient proliférer après addition d'éléments nutritifs par apport de milieu neuf.

- Ou bien, le passage en suspension n'est peut-être qu'un stade au cours du cycle cellulaire. Les deux dernières hypothèses demandent d'autres travaux pour être confirmées et l'application d'un test d'incorporation de thymidine tritiée serait probablement riche d'informations. Concernant la première hypothèse, les résultats de MET laissent suspecter que les cellules en suspension dans les puits de culture sont en phase de dégénérescence au vu de la présence de grandes vacuoles et de structures myélinoides. Egalement, des granules d'aspect non homogène sont

observables dans les grandes cellules granuleuses pour les cellules en suspension et non pour les cellules adhérentes.

Même avec un traitement des puits de culture à la poly-D-lysine, les cellules se détachent de leur support. En effet, ce polymère facilite l'adhésion des cellules par interaction avec la matrice extracellulaire. Il est bien connu que l'environnement extracellulaire est d'une grande importance et favorise le métabolisme cellulaire, influence la structure du cytosquelette, la morphologie des cellules, initie la division cellulaire (Alberts *et al.*, 1983).

Il serait intéressant de tester des molécules comme les laminines ou le collagène qui sont rencontrées naturellement dans la matrice extracellulaire des mollusques. Elles ont un rôle important dans de nombreuses activités biologiques comme la promotion de l'adhésion cellulaire, la migration, la mitogénèse, la croissance et la différenciation cellulaire (Har-EI *et al.*, 1993).

En ce qui concerne le test d'un anti-aggrégant, il semble que la répartition des cellules au fond des puits soit plus uniforme lorsque ce facteur est utilisé. Cependant, dès les premiers jours de culture, des amas cellulaires non dissociés se fixent à la surface de culture. Progressivement, ces amas semblent former un micro-environnement extracellulaire qui faciliterait la croissance et le métabolisme cellulaire. En effet, les cellules adhérentes paraissent proliférer à ce niveau. Il est alors aisé de penser que certains types cellulaires pourraient libérer des facteurs nécessaires au développement d'autres types cellulaires, ce phénomène pourrait se nommer « la croissance coopérative ».

Selon Fadool *et al.* (8), les cellules n'adhèrent pas uniformément à la surface quand le SVF est ajouté immédiatement dans les puits, de même si les cultures sont laissées dans une pièce éclairée. Ainsi, le facteur SVF pourrait participer à la conservation de ces amas cellulaires, même en présence d'un anti-aggrégant.

Il est difficile de vérifier cette hypothèse dans le test de variation des proportions en SVF. En effet, dans ce test, les amas semblent de taille plus petite mais plus nombreux par rapport aux autres tests. La proportion en SVF ne paraît pas influencer la présence d'amas. En revanche, il est possible d'observer que la présence de SVF à 10% dans les milieux de culture permet une croissance plus rapide des cellules, contrairement à un milieu à 0 ou 1%.

Enfin, le mode d'entretien des cultures semble avoir son importance. Nous avons constaté que le changement de un millilitre de milieu par puits de culture à partir du cinquième jour, permettait de conserver les cellules le plus longtemps, par rapport à la méthode de rinçages successifs des tapis cellulaires. Cependant, cette dernière méthode est indispensable durant les premiers jours car elle permet d'éliminer tous les débris cellulaires. Par la suite, il semble que ce soient les cellules de type hémocyte-like qui remplissent ce rôle.

Les cellules viables libèrent peut-être des facteurs de croissance qui sont perdus en cas de rinçage. Ainsi, le fait de changer seulement la moitié du milieu de culture, permettrait de conserver

en partie d'éventuels facteurs de croissance libérés et d'apporter des éléments nutritifs essentiels à la croissance cellulaire.

En outre, les cellules semblent moins affectées par un tel traitement, contrairement aux rinçages ou à l'élimination totale du milieu qui pourrait « stresser » les cellules. Par ailleurs, ce type de traitement élimine une grande partie des éléments en suspension, dont les cellules en suspension, ce qui n'est peut-être pas recommandé si ces cellules sont viables ou nécessaires au micro-environnement extracellulaire.

CONCLUSION.

Il apparaît possible que les primocultures de cellules cardiaques d'huître plate pourraient être maintenues dans un milieu de culture dont la composition serait basée sur les caractéristiques physico-chimiques de l'hémolymphe de bivalves marins. En effet, de nombreux additifs tels que l'insuline, EGF, FGF, collagénase et pronase ont été testés. Ils se sont rarement montrés efficaces sur la croissance cellulaire (Wen et al., 1993a).

Il n'en demeure pas moins que les résultats obtenus lors de ce présent travail nous permettent d'espérer le maintien des cellules cardiaques d'huître plate *in vitro* pendant un mois même si la densité des cellules adhérentes ne semble pas encore suffisante pour prétendre à une éventuelle dilution des cellules.

A long terme, le travail serait d'obtenir des lignées cellulaires de mollusques bivalves marins.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. D., 1983. Cell-cell adhesion and the extracellular matrix. In : Molecular biology of the cell, Eds Garland Publishing Inc. New-York 674-717.
- CHAGOT D., BOULO V., HERVIO D., MIALHE E., BACHERE E., MOURTON C., GRIZEL H., 1992. Interaction between *Bonamia ostreae* (Protozoa : Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca : Bivalvia) : entry mechanisms. J. Invertebr. Pathol. **59**, 241-249.
- CHAGOT D., 1989. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas* mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Ascetospora). Thèse pour l'obtention du diplôme de l'école pratique des hautes études. 72 p.
- COMPS M., BONAMI J. R., VAGO C., CAMPILLO A., 1976. Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* LMK). C. R. Acad. Sci. Paris **282**, 1991-1993.
- COMPS M., DUTHOIT J. L., 1976. Infection virale associée à la « maladie des branchies » de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata* Lmk. C. R. Acad. Sci. Paris **283**, 1595-1596.
- FADOOL D. A., MICHEL W. C., ACHE B. W. Cultured lobster olfactory neurons : utility for studying signal transduction. In marine invertebrate cell culture : breaking the barriers. Proceedings of an international workshop, 16 june 1991, Anaheim, California, U. S. department of commerce. March 1993.
- GUMBINER B. M., 1993. Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. Neuron **11**, 551-564.
- HAR-EL R., TANZER M. L., 1993. Extracellular Matrix 3 : Evolution of the extracellular matrix in invertebrate. FASEB J. **7**, 1115-1123.
- KLEINSCHUSTER S. J., SWINK S. L., 1992. *In vitro* culture of presumptive nervous tissue of *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). Journal of shellfish research vol. **11**, n° 2, 349-361.
- LIPART C., 1993. Contribution à l'étude d'agents pathogènes de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Histologie classique, Microscopie électronique à transmission, Culture cellulaire. Rapport de stage, 30 p.
- MIALHE E., BACHERE E., CHAGOT D., GRIZEL H., 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot and coll., 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. Aquaculture, **71** : 293-299.
- MIALHE E., BOULO V., GRIZEL H., 1988. Bivalve Mollusc Cell Culture. American Fisheries Society Special Publication **18** : 311-315.

- MOURTON C., BOULO V., CHAGOT D., HERVIO D., BACHERE E., MIALHE E., GRIZEL H., 1992. Interaction between *Bonamia ostreae* (Protozoa : Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca : Bivalvia) : *in vitro* system establishment. J. Invertebr. Pathol. **59**, 235-240.
- SEVALA V. M., SEVALA V. L., KUNIGELIS S. C., SALEUDDIN A. S. M., 1993. Circadian timing of a daily rythm of hemolymph insulin-like peptide titers in *Helisoma* (Mollusca). The journal of experimental zoology **266**, 221-226.
- VAGO C., QUIOT J. M., 1992. Infection *in vitro* d'embryons d'invertébrés : un principe d'étude de pathogénèse intracellulaire. C. R. Acad. Sci. Paris **295**, 461-464.
- WEN C. M., KOU G. H., CHEN S. N., 1993a. Cultivation of cell from heart of the hard clam, *Meretrix lusoria* (Röding). J. Tissu Culture Method **15**, 123-130.
- WEN C. M., KOU G. H., CHEN S. N., 1993b. Establishment of cell lines from the pacific oyster. In vitro cell dev. biol. **29A**, 901-903.

ANNEXE 1.

Protocole de préparation des solutions mères d'antibiotiques à 1000X.

Solution 1000X de pénicilline-streptomycine :

pénicilline G	:	10 ⁶ unités
streptomycine	:	1 g
eau distillée stérile	:	10 ml

Cette solution est stérilisée par filtration sur 0,22 µm et conservée par aliquots à -20°C.

Solution 1000X de fluméquine :

fluméquine	:	1,5 g
eau distillée stérile	:	50 ml

Ajouter une solution de NaOH 5N goutte à goutte jusqu'à dissolution complète de la fluméquine. Stériliser par filtration sur 0,22 µm, aliquoter, conserver à -20°C.

ANNEXE 2.

Composition des réactifs de préparation des échantillons pour la MET.

Cacodylate de sodium à 0,4 M (PM : 214,05).

8,6 g dans 100 ml d'eau distillée

Glutaraldéhyde à 3% à 1100 mOsm.

glutaraldéhyde à 25%	: 2,5 ml
cacodylate à 0,4 M	: 5 ml
NaCl à 10%	: 3,5 ml
eau distillée	qsp 20 ml.

Tampon cacodylate à 1100 mOsm, pH=7,4.

cacodylate à 0,4 M	: 10 ml
NaCl à 10%	: 4 ml
eau distillée	qsp 20 ml

Ajuster le pH à 7,4 avec HCl N/10.

Acide osmique à 1% à 1100 mOsm.

OsO ₄ à 4%	: 2 ml
cacodylate à 0,4 M	: 2 ml
NaCl à 10%	: 2 ml
eau distillée	qsp 8 ml

Le mélange est inutilisable s'il vire au rose ou noircit.

Toutes ces solutions sont à conserver à +4°C.

Mélange Epon, à préparer extemporanément (produits FLUKA Chemika).

Epon 812 (poly bed) :	12,32 g
DDSA (dodeceny succinic anhydre) :	6,2 g
MNA (nadic methyl anhydre) :	6,2 g
DMP 30 (2, 4, 6-tris (dimethyl amino methyl)-phenol) :	0,3 g

Bien homogénéiser et conserver au froid si nécessaire pour 24 heures.

Contraste des coupes ultra-fines.

Acétate d'uranyle :

La solution mère est à 5% d'acétate d'uranyle en eau distillée.

La solution de contraste est préparée en diluant au demi la solution mère d'acétate d'uranyle en alcool à 50°.

Citrate de plomb :

La solution de contraste est préparée par dissolution de 0,04 g de citrate de plomb dans 10 ml d'eau distillée et 1 ml de NaOH à 10 N.

Protocole de contraste :

- solution de contraste d'acétate d'uranyle : 10 mn à l'obscurité
- rinçage à l'alcool à 25°, puis à l'eau distillée
- séchage sur papier filtre
- solution de contraste de citrate de plomb : 15 à 20 mn à l'obscurité
- deux rinçages à l'eau distillée
- bien laisser sécher avant l'observation (éventuellement à l'étuve).

ANNEXE 3.

Protocole de traitement des cellules *in situ*.

- Fixation : glutaraldéhyde à 3% en cacodylate 0,4 M; 1 heure à +4°C (et plus)

- Lavage : 3 fois 15 mn en tampon cacodylate 0,2 M, pH=7,4

- Post-fixation : acide osmique à 1% en cacodylate 0,4 M, 1 heure à 20°C

- Déshydratation : à température ambiante

éthanol à 70% : 3 fois 5 mn

éthanol à 95% : 2 fois 20 mn

éthanol à 100 % : 3 fois 20 mn

mélange Epon : éthanol (1:1) : 1 heure

- Inclusion : mélange Epon : une nuit

- Polymérisation : jusqu'au lendemain à 60°C.