

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II

--- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC ---

THESE

Présentée à l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPECIALITE : BIOLOGIE DES ORGANISMES

Formation Doctorale : Parasitologie

Ecole Doctorale : Biologie des Systèmes Intégrés - Agronomie, Environnement

**LE SYSTEME IMMUNITAIRE DU BAR *DICENTRARCHUS LABRAX*.
IMMUNOGLOBULINES, CELLULES PRODUCTRICES
D'IMMUNOGLOBULINES, ONTOGENESE
APPLICATIONS A UNE PATHOLOGIE VIRALE NEONATALE**

PAR

Gilles BREUIL

Soutenue le 13 mai 1997

Devant le jury composé de :

M. BOUIX Georges, Professeur, Université UM2, Montpellier	Président du Jury
M. AVTALION Ramy, Professeur, Université Bar Ilan, Israël	Rapporteur
M. BAUDIN-LAURENCIN Félix, Directeur de Recherche, CNEVA Brest	Rapporteur
M. FEBVRE Alain, Chargé de Mission Ifremer, Sète	Examineur
M. LEFRANC Gérard, Professeur, Université UM2, Montpellier	Examineur
M. ROMESTAND Bernard, Maître de Conférence, Université UM2, Montpellier	Directeur de Thèse

AVANT - PROPOS

Avant l'exposé des résultats de mes recherches, je voudrais préciser que cette étude a été réalisée dans le cadre de l'Unité de Recherche Marine (URM n°1) créée le 6 Novembre 1992 par une convention passée entre le Laboratoire de Parasitologie et Immunologie de l'UM II (Professeur G. BOULX) et l'unité de recherche d'immunopathologie de la Station IFREMER de Palavas-les-Flots (Monsieur A. FEBVRE).

Que Monsieur le Professeur G. BOULX, trouve ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance pour avoir accepté de guider mes recherches.

Que Monsieur le Docteur B. ROMESTAND, qui m'a soutenu dans cette étude et a consacré de nombreuses heures à sa correction. Qu'il sache que cette collaboration restera pour moi un souvenir agréable. Je le remercie très vivement.

Je remercie vivement en lui exprimant ma respectueuse gratitude, Monsieur le Professeur R. AVTALION, qui a bien voulu, malgré ses charges de travail, accepté d'être rapporteur et membre du jury.

Ma reconnaissance va également à Monsieur F. BAUDIN-LAURENCIN, Directeur de Recherche au CNEVA, qui, malgré les nombreuses tâches qui sont les siennes, a bien voulu accepté d'être rapporteur et membre du jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude ainsi que mes plus vifs remerciements.

C'est un grand honneur de compter parmi mes juges, Monsieur le professeur G. LEFRANC.

J'ai plaisir à remercier, Monsieur A. FEBVRE, chargé de mission à IFREMER, pour m'avoir incité et soutenu dans ce travail.

Je ne saurais oublier dans mes remerciements, tous mes collègues de la Station IFREMER de Palavas-les-Flots et plus particulièrement ceux de l'équipe de pathologie.

RÉSUMÉ

Le bar, *Dicentrarchus labrax*, fait l'objet d'une aquaculture intensive sur le littoral Méditerranéen depuis une dizaine d'années. Les écloseries marines représentent un des maillons clefs de cette filière aquacole, et sont confrontées à différentes pathologies, dont une d'origine virale (nodavirus), pouvant remettre en cause leur faisabilité. Aussi, nous avons tenté d'apporter quelques données concernant la protection des larves et des géniteurs reproducteurs.

Dans un premier temps, nous avons étudié les immunoglobulines, éléments de l'immunité spécifique humorale ainsi que leur rôle anticorps. Chez les bars adultes ces immunoglobulines sont des molécules tétramériques de haut poids moléculaire (850 kD), composées de chaînes lourdes (H) de 80 kD et légères (L) de 26 kD. Dans les œufs, des formes plus simples, monomériques ou dimériques, sont mises en évidence et sont localisées sous la membrane chorionique.

Dans un second temps, nous avons étudié la mise en place du système immunitaire spécifique chez les larves, en effectuant le dosage des IgM par ELISA, l'étude de l'organogenèse des principaux organes lymphoïdes, puis celle de l'ontogenèse des cellules productrices d'IgM par cytométrie de flux. L'ensemble de cette étude nous permet de proposer une date d'acquisition de l'immunocompétence à partir du 54^{ème} jour d'élevage chez le bar.

Enfin, ces différents résultats ont été mis à profit dans le cadre d'une pathologie virale (nodavirus) touchant les reproducteurs et les larves. Après avoir défini un modèle de contamination expérimental des larves et des œufs, nous avons mis en évidence une protection des œufs lorsque ceux-ci proviennent d'une femelle vaccinée (vaccin expérimental) contre le nodavirus.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	9
CHAPITRE I : L'ÉLEVAGE DU BAR.	17
1.1. Quelques éléments de systématique, de Biologie et d'élevage au GIE de Palavas (Planche I, Figure 1)	17
1.1.1. Les individus reproducteurs (Géniteurs).	17
Conditions d'élevage	17
Alimentation	20
1.1.2. Les stades larvaires (Planche II).	20
conditions d'élevage (circuit fermé)	20
Alimentation	21
1.1.3. Le sevrage et le prégrossissement (Planche I, Figures 2 et 3)	22
Définition	22
Conditions d'élevage	23
Alimentation	23
1.1.4. Le grossissement (Planche I, Figure 4)	24
Conditions d'élevage	24
Alimentation	24
1.2. Les pathologies en éclosion:	24
1.2.1. Les pathologies bactériennes (Vibriose et Pasteurellose)	24
La Vibriose	24
Historique-Définition	24
Etiologie	25
Epidémiologie	26
Prophylaxie et traitement	26
La Pasteurellose	26
Définition-Historique	26
Symptômes et lésions	27
Etiologie	27
Epidémiologie	27
Prophylaxie et traitement	27
1.2.2. Les pathologies virales : nodavirus (Planche III).	29
Définition-historique	29

Symptômes et lésions (Planche III)	29
Etiologie (Planche III)	29
Epidémiologie	30
Diagnostic	31
Pathogénie	31
1.3. Importance des pathologies sur les stades de l'élevage.	32
1.3.1. Reproducteurs	32
1.3.2. Elevage larvaire	32
1.3.3. Sevrage	32
1.3.4. Grossissement	33
1-4. Conclusion	33
CHAPITRE II : LES IMMUNOGLOBULINES	37
2.1. Etat des connaissances	37
2.2. Les immunoglobulines sériques.	38
2.2.1. Matériel et méthodes	38
Les immunoglobulines sériques: aspects biochimiques	38
Isolement et purification par chromatographie (Planche IV).	38
Caractérisation des IgM du bar par PAGE SDS en conditions réduites et non réduites (Planche VI).	43
Les immunoglobulines sériques: dosages immunologiques (Planche VII).	44
Les réactifs de dosages (Acm, Acp).	44
Les différents dosages ELISA des IgM (Planche VII).	46
2.2.2. Modulation de la réponse immunitaire humorale	49
Etat des connaissances	49
Evolution de la teneur en IgM sérique au cours de la croissance	50
Evolution de la teneur en IgM sérique après immunisation	51
2.2.3. Evolution de la teneur en anticorps chez le bar après immunisation	52
Principe du dosage des anticorps (Planche VIII, Annexe VI)	52
Dosage des anticorps sériques après immunisation expérimentale	55
2.3. Les immunoglobulines « vitellines »	56
2.3.1. Matériel et méthodes	57
Les immunoglobulines « vitellines » : aspects biochimiques	57
Extraction, isolement, purification.(Annexe I)	57
Caractérisation des immunoglobulines « vitellines » par PAGE native , PAGE SDS et immunotransfert (Planche X, Annexe II)	59

Localisation des immunoglobulines « vitellines » dans les œufs par marquage FITC indirect avec un Acm anti-IgM de bar. (Planche X, Annexes IX et XI)	61
Les immunoglobulines « vitellines » : dosages immunologiques (Planche VII, Figures B p 36)	62
2.3.2. Etude du transfert des Immunoglobulines dans le vitellus	66
2.3.3. Rôle biologique des anticorps	67
2.4. Isotypie et Allotypie	68
Pourcentage de reconnaissance des IgM sériques par l'Acm 6E11	68
2.4. Conclusion	70
2.4.1. Les immunoglobulines et leur activité anticorps	70
2.4.2. Evolution de la teneur en immunoglobuline au cours de la croissance	71
2.4.3. Les immunoglobulines et leurs dosages	72
CHAPITRE III: LES ORGANES, LES CELLULES LYMPHOÏDES, ET L'ONTOGENÈSE.	75
3.1. Les Organes lymphoïdes	Erreur! Signet non défini.
3.1.1. Etat des connaissances	77
3.1.2. Matériels et méthodes.	78
Etude histologique	78
Etude structurale	78
Ultrastructure (Annexe VII)	79
3.1.3. Topographie des organes lymphoïdes (Planches XI à XIII)	79
Pronéphros (Planche XI).	79
Thymus (Planche XII).	82
Rate (Planche XIII)	85
Elément lymphoïdes du tube digestif et des branchies	87
Conclusion	87
3.1.4. Organogenèse des organes lymphoïdes (Planches XIV à XVIII)	89
Etat des connaissances.	89
Rein (Planches XIV, XV et XVI).	93
Thymus (Planche XV, Figure B).	93
Rate (Planche XVII)	95
3.1.5. Conclusion sur la mise en place des organes lymphoïdes (Planche XVIII)	95
3.2. Les cellules lymphoïdes.	97
3.2.1. Etats des connaissances	97
3.2.2. Matériels et méthodes	99
Localisation des cellules : techniques microscopiques	99
Les séparations et les types cellulaires.	99

Les types de marquage et la localisation des cellules :	100
résultats	101
Quantification des cellules : techniques cytométriques	104
Isolement des populations lymphocytaires par analyse en cytométrie de flux (Planches XX et XXI).	105
Optimisation des techniques de marquage utilisée en cytométrie de flux..	111
Quantification des cellules : Conclusion.	119
3.2.3. Etude de la répartition des cellules B dans les organes lymphoïdes de l'adulte	120
Variation des cellules IgM ⁺ au cours de la croissance	122
Variation des cellules IgM ⁺ après une immunisation expérimentale	124
Conclusions.	125
3.3. Ontogenèse du système lymphoïde et sa modulation dans le temps.	127
3.3.1. Objectif de l'étude.	127
3.3.2. Matériel et méthodes	128
3.3.3. Résultats	129
Dosage des immunoglobulines dans les larves	129
Quantification des cellules IgM ⁺ au cours du développement larvaire.	132
Isolement de la population lymphocytaire dans les extraits larvaires (Planche XXVI).	132
Pourcentage de cellules IgM ⁺ chez les larves	136
Localisation des cellules IgM ⁺ dans le pronéphros des larves (Planche XXIX).	137
3.3.4. Conclusion	139
3.4. Conclusion	141

CHAPITRE IV: APPLICATION A UNE PATHOLOGIE VIRALE A NODAVIRUS145

4-1. Objectifs de l'étude	145
4.1. Immunité spécifique et vaccination.	146
4.1.1.:Matériel et méthodes	146
Purification du virus (Annexe XV).	146
préparation du vaccin	147
Titration des anticorps sériques	147
Dosage des anticorps sériques anti nodavirus et exemple de calcul (Annexe XVII)	147
4.1.2. Résultats	150
Sérologie des géniteurs.	150
Vaccination des reproducteurs: cinétique d'apparition des anticorps.	153
Existence d'une isotypie dans le sérum des malades ?	154
4.2. Transmission expérimentale de la maladie	156

4.2.1. Contaminations expérimentales de larves (L1 et L4) à différentes températures d'élevage.	157
Protocole expérimental	157
Résultats	157
4.2.2. Transmission d'une protection chez les larves	160
Protocole expérimental	161
Résultats	161
4.2.3. Mise en évidence des anticorps sériques neutralisants	166
Protocole expérimental (Tableau XX)	166
Séroneutralisation	166
Epreuve virulente des larves	166
Résultats	167
4-3. Conclusion	168
CONCLUSION GENERALE	173
ANNEXES	177
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	193

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La consommation d'espèces marines (poissons crustacés mollusques) fait partie des habitudes alimentaires les plus répandues. Selon les peuples et leur culture, la part que joue ce type d'alimentation, en terme d'apport protéique global peut être très variable, mais le rôle qualitatif est toujours important dans la mesure où cette consommation permet de diversifier la source de protéine. Au niveau Européen, cet aspect qualitatif est primordial et contribue à l'élevage des espèces marines les plus prisées afin de compléter les ressources halieutiques. Malheureusement, l'aquaculture c'est à dire l'élevage d'espèces marines, repose sur la disponibilité des formes juvéniles que sont les alevins de poissons, le naissaim de mollusques ou les post-larves de crustacés. Pour certaines espèces et certains sites, cette disponibilité a pu être assurée par la récolte ou la pêche de juvéniles présents dans le milieu à certaines périodes et cette disponibilité *naturelle* fut à l'origine du développement de la forme la plus ancienne de l'aquaculture telle que l'élevage de l'huître plate (*Ostrea edulis*) pratiquée dès l'antiquité par les peuples latins. C'est encore sous une forme dite *traditionnelle* toujours basée sur la récolte des juvéniles mais avec une gestion du stock naturel que ce système d'aquaculture s'est prolongé jusqu'à nos jours avec l'ostréculture (*Crassostrea angulata* et *Ostrea edulis*) et la mytiliculture (*Mytilus edulis*) pratiquées sur les côtes Françaises et la Valliculture (*Dicentrarchus labrax*, *Mugil cephalus*, *Sparus aurata*) pratiquée sur les côtes Italiennes.

L'Aquaculture, au sens moderne du terme, cherche à s'affranchir de cette dépendance en ressources naturelles et n'a pu se développer que lorsque les connaissances biologiques générales minimales indispensables à la maîtrise de la reproduction et de l'élevage larvaire de certaines espèces ont été acquises. Le contrôle du cycle de la reproduction en captivité a été plus ou moins difficile à obtenir pour chaque espèce et ceci explique en grande partie la succession des nouvelles espèces candidates à l'aquaculture. Dans le cas des poissons marins, comme le bar, les pontes sont obtenues par induction

hormonale et le transfert de cette technique au secteur professionnel fut délicat (Barnabé, 1991). L'amélioration des techniques d'élevage larvaire et l'acquisition de connaissances de bases sur les besoins nutritionnels ont alors permis l'essor de ces productions aquacoles dites *nouvelles*. La maîtrise de ces différents paramètres a conduit ainsi à la constitution de structures d'élevage spécialisées permettant une gestion appropriée des différents cheptels nécessaires à l'obtention des juvéniles (géniteurs, œufs, larves) et ces structures d'élevages sont regroupées sous la forme d'écloseries.

La notion d'écloserie est donc un point vital dans le secteur aquacole moderne. Dans ce type de structure, de nombreux facteurs viennent agir en synergie pour favoriser le développement de pathologies (haute densité d'élevage, fragilité des œufs et des larves, besoins nutritionnels encore imparfaitement définis, etc.). En outre, l'alimentation des jeunes stades larvaires de toutes les espèces aquacoles est toujours tributaire de proies vivantes (*Artemia salina*, *Brachionus plicatilis*) dont l'élevage est pratiqué dans des enceintes spécialisées des écloseries. La production de ces proies représente ainsi un facteur de risque supplémentaire pour l'élevage des espèces marines.

Le contrôle des différents paramètres de l'élevage est encore insuffisant pour enrayer le développement des pathologies en écloserie et ce phénomène est observé pour toutes les espèces. Parmi les différents agents pathogènes, les virus sont la cause de pertes économiques très importantes car les moyens de lutte sont pratiquement inexistantes et reposent pour l'essentiel sur l'éradication des animaux malades, quand cela est possible (NHI: Nécrose Hémorragique Infectieuse des salmonidés). Aussi, ces pathologies sont d'autant plus redoutables, quand elles surviennent en écloseries, car, outre les pertes directes dues aux virus s'ajoutent souvent les pertes indirectes dues aux difficultés rencontrées pour la commercialisation des produits provenant des écloseries contaminées.

La mise au point des techniques d'élevage du bar a suivi point par point les grandes lignes ainsi tracées (maîtrise de la reproduction en captivité et maîtrise de l'élevage larvaire), et la production aquacole de ce poisson repose

également sur la fiabilité des écloséries produisant les alevins commercialisables. Cette fiabilité peut cependant être remise en cause par l'apparition de nouvelles pathologies dont une pathologie virale (nodavirus) touchant les larves (Breuil et coll., 1991).

Il nous a semblé opportun d'approfondir les recherches concernant la protection des différents stades de développement (poisson adulte géniteur, œufs, larves et alevins commercialisables) impliqués dans une éclosérie de poisson.

Une voie d'approche de ce type de problème nécessite l'acquisition des connaissances générales concernant le système immunitaire des poissons.

Selon Roberts R.J. (1979), *le système immunitaire spécifique est l'un des éléments du mécanisme de protection qui permet au vertébré de survivre et de conserver son homéostasie dans un milieu naturellement hostile. Il se différencie des autres éléments du mécanisme de protection par sa spécificité et par sa faculté de « se souvenir » d'un agent d'infection donné*. Les deux principes sur lesquels repose l'immunité spécifique sont donc l'adaptation et la mémoire.

Les phénomènes intervenant dans l'immunité spécifique sont le fait de cellules spécialisées, les lymphocytes. Ces lymphocytes, ou une partie de la population lymphocytaire, synthétisent une famille particulière de molécules d'une grande variabilité de conformation qui peuvent se lier spécifiquement à la surface de nombreux micro-organismes différents. Ces molécules appelées *anticorps* ne réagissent pas avec la totalité des constituants de l'agent infectieux mais avec une seule molécule dénommée *antigène*, présente à la surface du micro organisme. Les anticorps présents dans le sérum sont des glycoprotéines particulières ou immunoglobulines synthétisées par une catégorie de lymphocytes, les lymphocytes B. Chaque anticorps est donc spécifique d'un antigène et inversement chaque antigène peut induire la production d'anticorps capables de le reconnaître. Cette propriété est mise à profit dans le processus de la vaccination qui consiste à modifier (par différents traitements: chaleur, formol, dénaturation) le pouvoir pathogène d'un agent infectieux (virus, bactérie, parasite ou toxine) sans détruire ces propriétés

antigéniques. Le micro organisme ainsi modifié induit chez l'hôte la production d'anticorps spécifiques qui le protégeront contre une infection ultérieure. Chez les poissons téléostéens, seule la forme M (chaîne μ) des immunoglobulines est présente et ces immunoglobulines M (IgM) sont synthétisées par des lymphocytes présents dans différents éléments du système lymphoïde (sang, rein, rate, et tube digestif). Aussi l'étude de la réponse immune spécifique doit prendre en compte à la fois l'aspect biochimique c'est à dire la caractérisation des différents isomorphes d'immunoglobulines et l'aspect cellulaire c'est à dire la caractérisation des cellules productrices d'immunoglobulines.

Comment peut on aborder l'étude générale du système immunitaire des poissons en fonction d'un objectif qui vise à approfondir les connaissances concernant la protection des divers stades de développement que sont les géniteurs, les œufs, les larves et les alevins impliqués dans une éclosion de bar ?

Parmi les multiples voies de recherche (thérapeutique, études des défenses non spécifique, etc.), l'étude des défenses spécifiques nous a semblé incontournable, voire prioritaire, dans la mesure où elle pouvait déboucher sur des applications telles que des vaccins utilisables chez les géniteurs et chez les alevins c'est à dire chez les deux stades de développement correspondants aux entrées et aux sorties d'une éclosion de poisson. L'étude de l'immunité spécifique a, alors, été abordée selon deux modalités d'approche. La première modalité concerne la mise en place du système immunitaire chez la larve et l'acquisition de l'immunocompétence chez l'alevin. La seconde modalité est focalisée sur l'étude de la transmission d'une immunité (passive) de la mère à sa descendance (œuf et larves).

Chaque étape de recherche a consisté à mettre au point la méthodologie chez des poissons en croissance puis à utiliser les techniques, en les adaptant au besoin, pour l'étude des larves ou des œufs.

Une **première partie** présente les généralités sur l'élevage du bar indispensables à la compréhension de notre problématique de recherche (description des stades de développement et importance des pathologies).

La **deuxième partie** décrit les types d'immunoglobulines isolées dans le sérum des adultes puis dans les œufs et les larves et leur rôle (activité anticorps). L'influence de différents facteurs comme la croissance pondérale, d'une part, et l'effet d'une stimulation contrôlée (immunisation) ou non contrôlée (contacts avec différents antigènes au cours de l'élevage), a été également étudiée.

La **troisième partie** décrit les organes lymphoïdes et les types cellulaires impliqués dans la réponse spécifique chez l'adulte (une attention particulière étant portée sur la reconnaissance des cellules productrices d'IgM à l'aide de différents marquages) puis chez les larves (étude de l'organogenèse des organes lymphoïdes et étude de l'ontogenèse des cellules productrices d'IgM).

Enfin la **quatrième partie** concerne l'étude du rôle des immunoglobulines c'est à dire l'étude des anticorps intervenants dans la protection contre une pathologie virale (nodavirus) néonatale chez le bar. La résolution de ce type de pathologie nécessite une prophylaxie portant sur l'élimination des reproducteurs porteurs sains et sur la vaccination des poissons (géniteurs, larves et juvéniles). Un protocole de transmission expérimentale de la maladie chez les larves de bar nous a alors servi de modèle pour étudier *in vivo* la sensibilité des larves provenant de géniteurs vaccinés et pour rechercher la présence d'anticorps protecteurs dans le sérum des poissons immunisés.

CHAPITRE I : L'ÉLEVAGE DU BAR

CHAPITRE I - L'ÉLEVAGE DU BAR

CHAPITRE I : L'ÉLEVAGE DU BAR

1.1. Quelques éléments de systématique, de Biologie et d'élevage au GIE de Palavas (Planche I, Figure 1)

Le Bar (*Dicentrarchus labrax* L.) est un poisson téléostéen, de l'ordre des Perciformes (sous ordre des Percoïdes) appartenant à la famille des Serranidae. Ce poisson est aussi connu sous le nom de loup sur les côtes méditerranéennes, principal lieu de son élevage.

1.1.1. Les individus reproducteurs (Géniteurs).

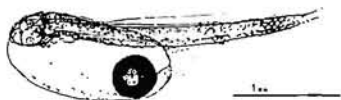
Conditions d'élevage

Environ 40 à 50 reproducteurs (sex ratio 1/1) d'un poids moyen de 700 g à 2,5 Kg sont placés dans des bassins cylindriques de 30 m³ équipés d'un circuit fermé (Filtre Biologique). La salinité est de 30 à 35 pour 1000, et la température de l'eau de mer est stabilisée (groupes frigorifiques) aux alentours de 16 °C pendant la période de ponte. Après chaque saison de ponte, les animaux les plus âgés (les plus gros) sont remplacés par des individus plus jeunes de manière à renouveler 20 % du groupe.

Chaque reproducteur est marqué individuellement au moyen de marques magnétiques placées sous la peau en région dorsale. En conditions naturelles de photopériode et de température, la période de ponte se prolonge de janvier à avril. Des biopsies ovariennes permettent de suivre l'ovogenèse de chaque femelle et de prévoir la date de ponte. Lorsque une femelle arrive en stade terminal d'ovogenèse (stade 4), la ponte est déclenchée par induction hormonale (injection de Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) : 10 à 20 µg.Kg⁻¹) et la femelle est transférée dans un bac équipé d'un collecteur permettant la récupération des œufs.

Planche I: Les stades biologiques de l'élevage du bar *Dicentrarchus labrax*.

I: ELEVAGE LARVAIRE



1 Oeuf de 1180 μm de diamètre

2 Larve éclosue de 3,5 mm de long.
Noter la présence du sac vitellin contenant une goutte d'huile.



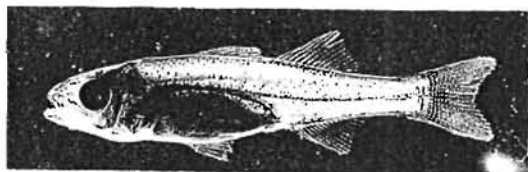
3 Larve de 10 jours .
Quelques aliments sont visibles dans l'intestin

II: SEVRAGE



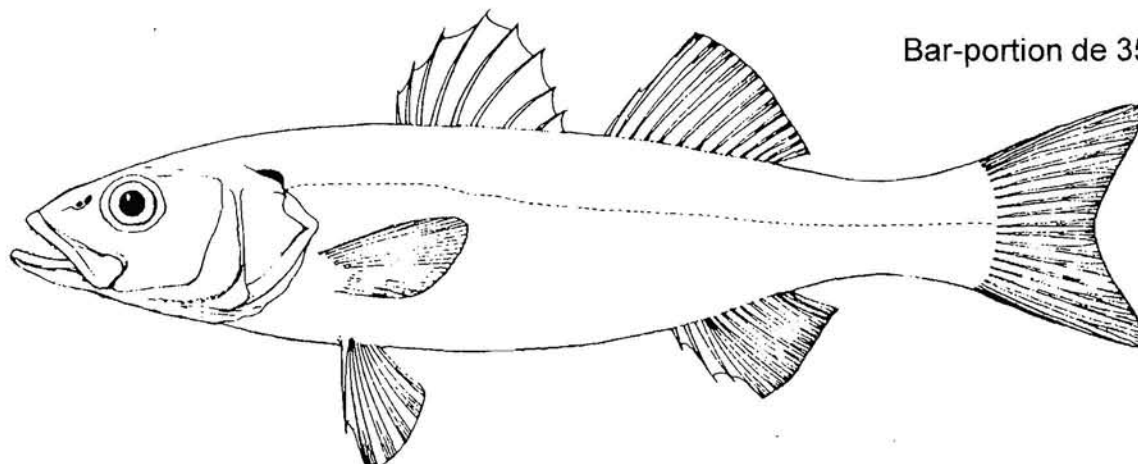
Larve de 45 jours de 15 mm de long.

III: PREGROSSISSEMENT



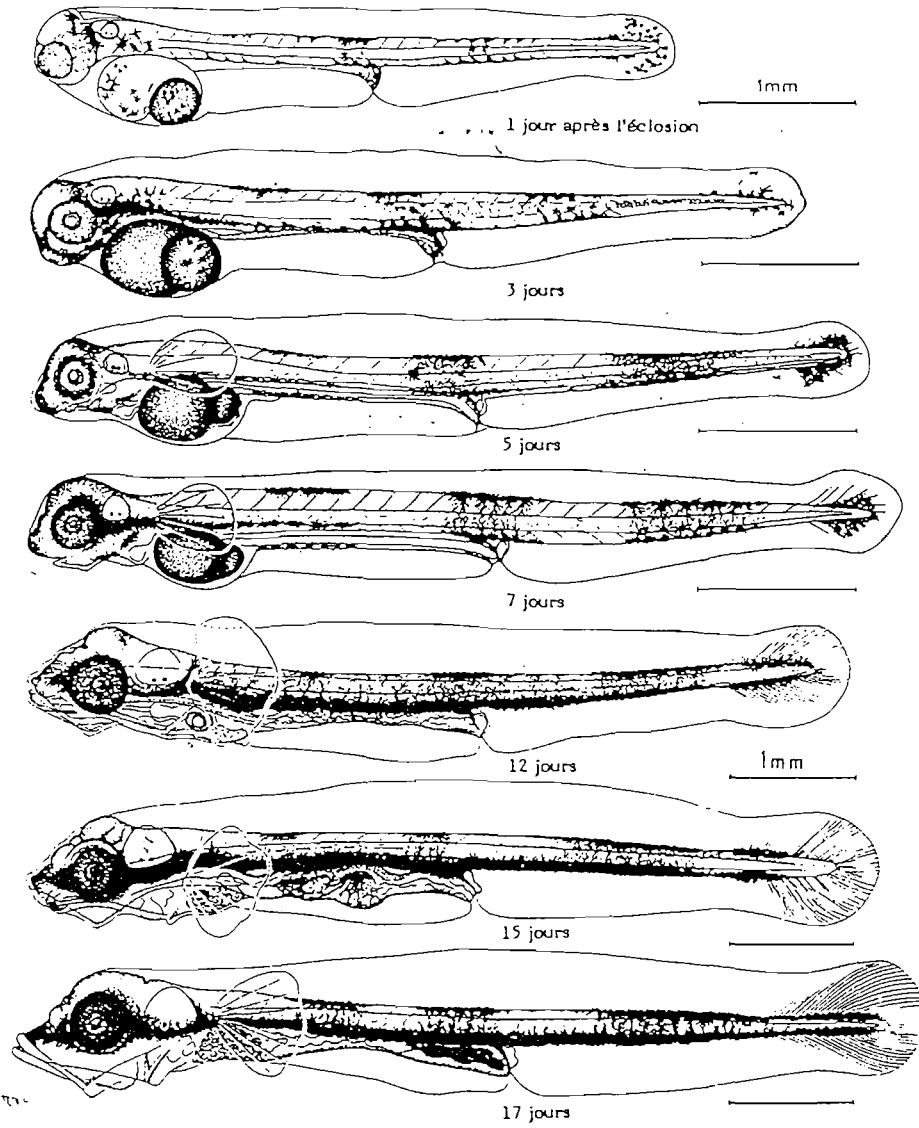
Larve de 75 jours de 30 mm de long.
La larve est semblable à l'adulte

IV: GROSSISSEMENT



Bar-portion de 350 g.

Planche II: Les stades larvaires du bar *Dicentrarchus labrax*.
(selon Barnabé, 1995).



Les ovules sont récupérés par massage manuel de l'abdomen de la femelle (stripping) et la fécondation artificielle est effectuée dans un bêcher par brassage des ovules avec du sperme récupéré chez un mâle fluent. Les ovules fécondés (œufs) sont alors placés dans des incubateurs recevant de l'eau de mer stérilisée par passage sur une rampe équipée de lampes à ultraviolet (UV). L'incubation des œufs fécondés dure 3 jours à une température de 13 à 14 °C. (Planche I, Figures 1 et 2).

A l'éclosion, les larves (3,5 mm de longueur) sont récupérées à la surface des incubateurs et placées dans les bacs d'élevage larvaire.

Alimentation

Les reproducteurs reçoivent une alimentation mixte constituée pour partie d'aliments décongelés (sardines) et de granulés.

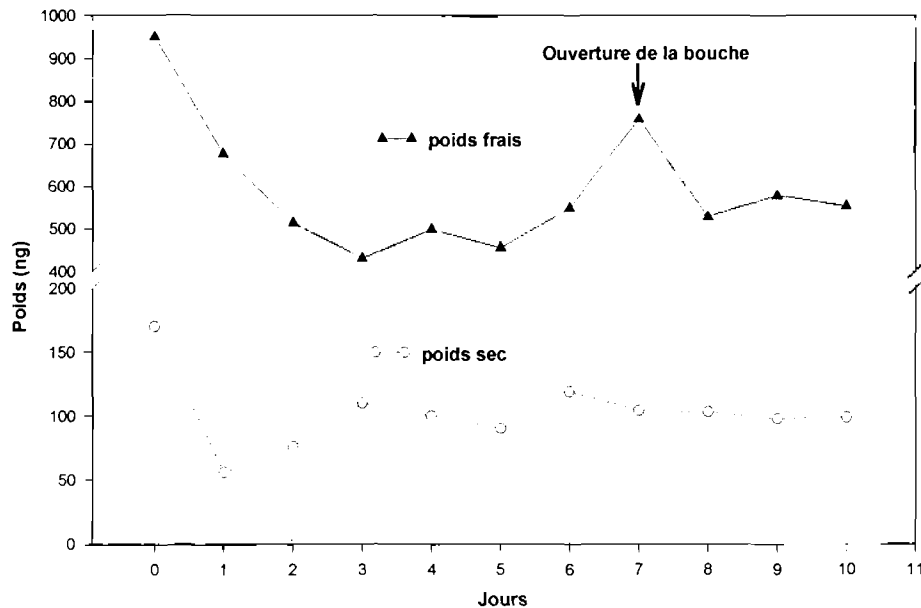
1.1.2. Les stades larvaires (Planche II).

conditions d'élevage (circuit fermé)

Les larves sont élevées dans des bacs cylindrocôniques de 5 m³ à une densité de 100 larves par litre. Les bacs sont équipés de filtres biologiques et reçoivent un apport journalier de 10% d'eau de mer filtrée (50 µm) et stérilisée (UV).

Bien que l'ouverture de la bouche soit effectuée dès le 7^{ème} jour, les larves ne reçoivent aucune nourriture au cours des dix premiers jours d'élevage, et sont placées à l'obscurité. Au cours de cette phase de l'élevage, la température de l'eau de mer est progressivement remontée de 16 à 20 °C et la salinité est progressivement abaissée à 20 pour 1000 (Coves et coll., 1992). Un soin tout particulier est apporté au nettoyage de la surface de l'eau qui doit être dépourvue de toute pellicule huileuse afin de ne pas entraver la prise d'air par les larves lors de leur montée en surface. Cette prise d'air est indispensable au gonflement initial de la vessie natatoire des larves.

Figure 1 : Evolution pondérale des larves de *D. labrax* au cours des 10 premiers jours d'élevage



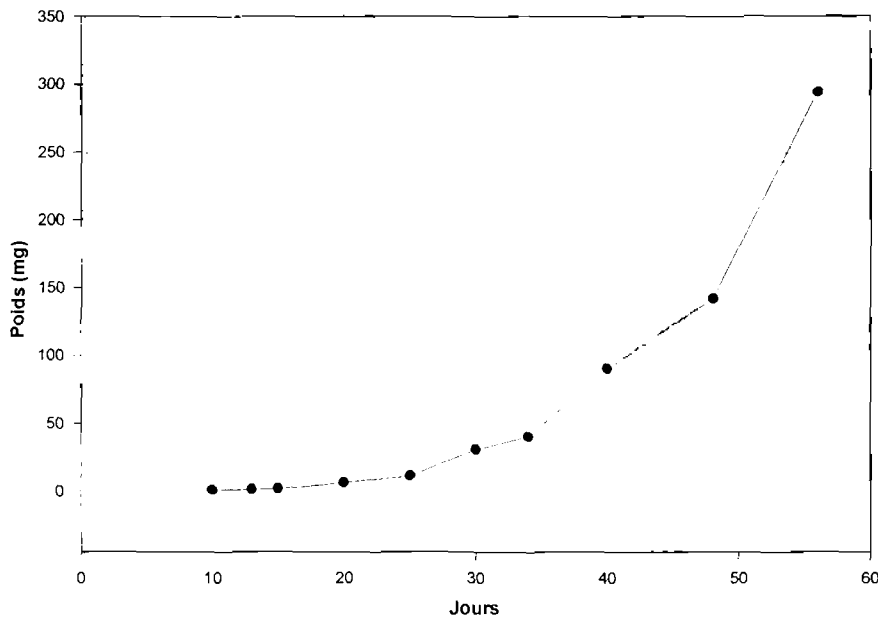
Pendant les dix premiers jours, la larve se nourrit sur ses propres réserves qui sont épuisées lorsque la vésicule vitelline est totalement résorbée (entre le 8^{ème} et le 10^{ème} jour). Au cours de cette période, le poids moyen des larves diminue progressivement de moitié et passe de 950 ng au premier jour (larves L1) à 553 ng au dixième jour (larves L10). L'augmentation de poids frais observée au 7^{ème} jour d'élevage est consécutive à l'ouverture de la bouche et pourrait correspondre à une absorption active d'eau de mer par la larve. En effet le poids sec des larves reste relativement constant du 3^{ème} au 10^{ème} jour (Figure 1).

Alimentation

Passé le dixième jour, les conditions de température et de salinité sont maintenues à 20°C et 20 pour 1000. Les larves sont alors éclairées selon une photopériode croissante et reçoivent une distribution de proies vivantes constituées de stades *nauplii* d'*Artemia salina* fraîchement éclos (A0) du 10^{ème} au 20^{ème} jour, puis de stades *nauplii* de 1 jour (A1) du 20^{ème} au 45^{ème} jour. Après le 40^{ème} jour, les larves reçoivent une nourriture mixte composée de

nauplii d'Artemia (A1) et de microparticules (Kyowa). Dès que les larves sont nourries, la croissance est très rapide (Figure 2)

Figure 2: Croissance pondérale de larves de *D. labrax* âgées de 10 à 58 jours



1.1.3. Le sevrage et le prégrossissement (Planche I, Figures 2 et 3)

Définition

Traditionnellement cette phase correspondait à l'arrêt de la distribution de proies vivantes et à l'adaptation progressive des larves à un aliment inerte de type granulé. Auparavant, cette période débutait lorsque le poids moyen des larves atteignait 500 mg et s'achevait entre 1 et 2 grammes de poids moyen (Barnabé, 1991). Les recherches concernant la nutrition des larves de poissons ont abouti à la mise au point d'aliments inertes dont la granulométrie est adaptée aux différents stades de développement de la larve, depuis les premiers stades (aliment microparticulaire), jusqu'aux larves de 200 à 500 mg (aliment de sevrage).

Avec ce type d'alimentation, l'ancienne définition du sevrage est rendue caduque; aussi une définition plus adaptée aux conditions modernes d'élevage consiste à considérer l'étape du sevrage comme la phase d'élevage débutant à la métamorphose et se poursuivant jusqu'à l'obtention de larves d'environ 1 gramme de poids moyen (Coves et coll., 1992). Les larves de cette taille sont alors commercialisées sous le nom d'alevins qui peuvent éventuellement être vaccinés contre différentes pathologies (Vibriose principalement) avant d'être transférées dans le milieu extérieur.

Conditions d'élevage

En fin d'élevage larvaire, les larves âgées de 45 jours sont anesthésiées à l'aide d'une solution de phénoxy éthanol (100ppm) et transférées, à raison de 10 larves par litre, dans un bac circulaire de 25 m³ équipé d'un circuit fermé et de distributeurs automatiques d'aliment. Les paramètres d'élevages sont les suivants : température 20±2 °C, salinité 20-25 pour 1000, teneur en azote ammoniacal non ionisé (N-NH₃) 0,02 mg.l⁻¹, oxygénation 120 à 150% de la saturation, débit de renouvellement de l'eau de mer 100% / heure.

Alimentation

Au cours de cette phase de l'élevage, les poissons reçoivent une distribution croissante d'aliment inerte (granulé de sevrage Sevbar) tandis que l'apport de proies vivantes et de microparticules est progressivement diminué. Au fur et à mesure du développement des larves, l'aliment inerte initial (Sevbar) est remplacé par un aliment sec de granulométrie supérieure et adapté à la taille des larves.

Pendant la période d'adaptation des larves à l'aliment sec le taux de mortalité est très élevé (environ 50%). Le sevrage est achevé vers le 75^{ème} jour lorsque les alevins ont un poids moyen de 150 à 200 mg.

1.1.4. Le grossissement (Planche I, Figure 4)

Conditions d'élevage

Les structures d'élevages sont variées (cages ou bassins) et le bar supporte des conditions extrême de température (min. 5 °C max. 30°C) et de salinité (0,5 à 40 pour 1000). Pour nos expérimentations, les alevins issus de la phase de sevrage ont été placés dans des bacs d'expérimentation de 100 litres (bacs de type Ewos) équipés de filtre biologique et ont été maintenus en captivité pendant 2 ans jusqu'à atteindre un poids supérieur à 300 g. Tout au long de cette période de grossissement, la température a été stabilisée entre 18 et 22 °C, et la salinité est restée voisine de celle de l'eau de mer (35 à 37 pour 1000).

Alimentation

Un aliment sec de granulométrie adaptée à la taille des poissons est distribué à raison de 7 à 8 % du poids vif. Les indices de conversion (IC) de ces types d'aliments sont voisins de 2. Dans nos conditions d'élevage, Il faut environ 1 kg d'aliment sec pour produire un poisson de 300 g commercialisable en 3 ans .

1.2. Les pathologies en éclosion:

Nous nous attacherons à la description des principales pathologies susceptibles d'être identifiées en éclosion.

1.2.1. Les pathologies bactériennes (Vibriose et Pasteurellose)

La Vibriose

Historique-Définition

La vibriose est une maladie bactérienne liée à *Vibrio anguillarum*. Cette maladie a été décrite chez l'anguille par Bonaveri en 1718 et la bactérie a été

isolée pour la première fois par Cannestrini en 1893 (Richards et Roberts, 1979). Cette maladie (vibriose) touche de nombreuses espèces de poissons, dont le saumon (Evelyn, 1971), la truite (Baudin-Laurencin, 1981), le mulot (Burke et Rodgers, 1981), le poisson chat (Lewis, 1985), le turbot (Baudin-Laurencin, 1986) et le bar (Breuil et Haffner, 1989). Les symptômes (léthargie) sont en général peu spécifiques de la maladie et l'observation des lésions permet souvent d'orienter le diagnostic. On observe en général des érosions des nageoires (nageoire caudale en particulier), des pétéchies et suffusions hémorragiques au niveau de l'abdomen et de la sous gorge, ainsi que des lésions ulcératives circulaires au niveau des flancs. L'autopsie révèle une congestion généralisée des viscères (foie et rate) avec présence d'un liquide jaune paille à l'intérieur du tube digestif (Breuil et Haffner, 1989).

Etiologie

Un sérotypage des différentes souches bactériennes isolées a permis d'identifier 10 sérotypes différents (Sorensen et Larsen, 1986). Parmi ces 10 sérotypes de *Vibrio anguillarum*, 3 sérotypes (notés O1, O2 et O3) sont pathogènes chez les poissons. Le sérotype O1 de *V. anguillarum* représente le sérotype le plus communément isolé (70 %) dans les cas de vibriose chez les salmonidés (Sorensen et Larsen, 1986). Ce sérotype présente différents biotypes (Colwell et Grimes, 1984; West et Colwell, 1984) : le biotype 408 a été isolé chez la truite (Baudin-Laurencin, 1981) alors que le biotype 62 est rencontré chez le Bar (Breuil et Haffner, 1989). Le sérotype O2 de *Vibrio anguillarum* est très souvent isolé dans les populations de poissons sauvages d'Europe du Nord (Sorensen et Larsen, 1986). La classification initiale du sérotype O2 comme *V. anguillarum* (Pacha et Kiehn, 1969) a été revue et cette bactérie est maintenant décrite comme *Vibrio ordalii* ! (Schiewe et coll, 1981). L'ancienne terminologie (*Vibrio anguillarum* sérotype O2) est cependant toujours en vigueur pour désigner les vaccins actuellement commercialisés et utilisables chez les poissons marins : la plupart de ces vaccins combinent les sérotypes O1 et O2). Le sérotype O3 dont la souche de référence a été isolée chez la morue est également identifié dans les élevages de poissons en Méditerranée. Ce sérotype est responsable de quelques cas de mortalité chez

le bar. Des test ELISA permettent la détection rapide de ces différents sérotypes dans des broyats d'organes (Romestand et coll., 1993).

Epidémiologie

Chez le bar, les mortalités surviennent lorsque la température s'élève au dessus de 10 °C. En écloséries, la mortalité est forte et peut atteindre 50 à 70 % du lot d'alevins pendant la phase de sevrage, alors qu'en grossissement elle n'excède pas 5 à 10 % (Breuil et Haffner, 1989). Selon Demoury (1987) le *Vibrio anguillarum* serait un germe opportuniste c'est à dire une bactérie normale de la peau des poissons qui se développerait dans les élevages à la suite de facteurs *favorisants* tels que les problèmes nutritionnels liés au sevrage, ou de facteurs *déclenchants* tels que les traumatismes liés à une manipulation ou à la suite d'un stress induit par une brusque variation de la température.

Prophylaxie et traitement

Le traitement consiste à administrer un antibiotique à spectre Gram négatif (Tétracycline, Fluméquine et acide oxolinique). Différents vaccins commercialisés en Europe sont utilisables par balnéation chez l'alevin à partir de 1 g.

La Pasteurellose

Définition-Historique

Une épizootie brutale touchant de nombreuses espèces de poissons dont le bar, se développa dans l'ensemble du bassin Méditerranéen au cours de l'été 1990. Les mortalités furent signalées le long des côtes italiennes (Giorgetti et Ceschia, 1994), en France (Baudin-Laurencin et coll., 1991) et en Espagne (Toranzo et coll., 1991) au cours de l'été 1990.

Symptômes et lésions

Les poissons malades présentaient des lésions nodulaires blanchâtres au niveau des organes lymphoïdes (rein et rate principalement) caractéristiques de la pseudotuberculose (Richards et Roberts, 1979).

Etiologie

La bactérie (*Pasteurella piscicida*) a été isolée chez la perche (*Roccus americanus*) lors d'une forte mortalité de poisson observée dans la baie de Chesapeake (Snieszko et coll., 1964) et chez le thon jaune élevé au Japon (Egusa, 1980). La position taxonomique de cette bactérie a été revue récemment sur la base de caractéristiques du génome (sondes) et ce germe est maintenant décrit comme *Photobacterium damsela* sous espèce *piscicida* (Gauthier et coll., 1995).

Epidémiologie

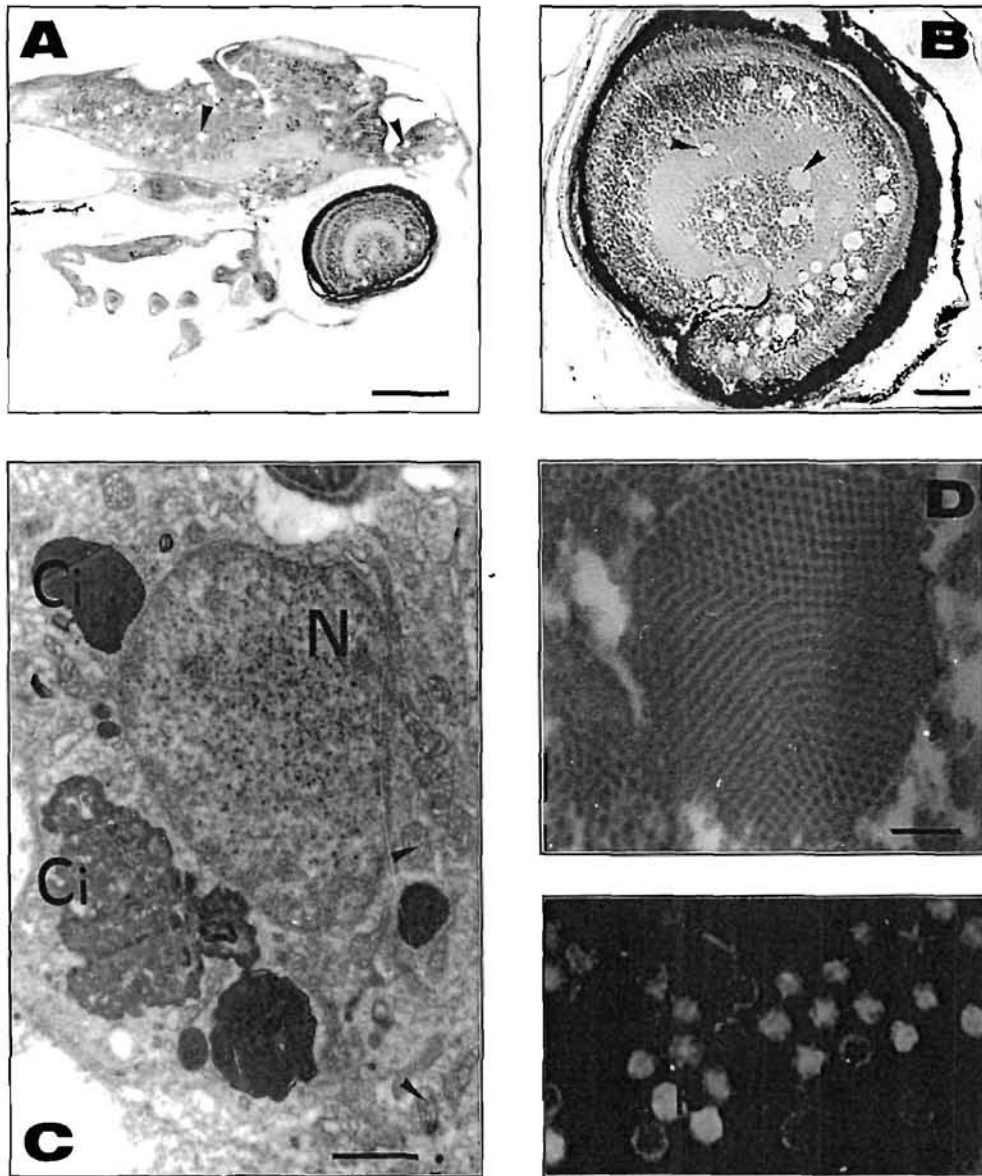
De nombreuses espèces de poissons marins sont atteintes par cette pathologie : le bar, le mullet, la daurade et les poissons plats (sole et turbot). Cette pathologie est maintenant endémique de toute la partie orientale du bassin méditerranéen (Grèce et Turquie). Quelques foyers sporadiques peuvent se déclarer dans la partie occidentale du bassin : Espagne (Balebona et coll., 1992) et France (Raymond comm.pers.).

Prophylaxie et traitement

La bactérie est souvent résistante aux antibiotiques Gram négatifs usuels (tétracycline, fluméquine) aussi il faut avoir recours aux ampicillines ou à leurs dérivés

Un vaccin bivalent (Vibriose et pasteurellose) est commercialisé en Grèce.

Planche III: encéphalite virale (nodavirus) du bar



A: et B : Coupes d'une larve âgée de 45 jours au niveau de l'encéphale (Obj. x10)) et de l'oeil (Obj. x40). Noter la spongieuse du tissu nerveux avec la présence de vacuoles (flèches) . A: Barre = 0,5 mm. B: Barre = 0,1 mm

C: Inclusions virales (Ci) dans le cytoplasme d'une cellule nerveuse de l'encéphale. Noyau (N) et mitochondries (flèches). Barre = 1,5 μ m

D: Corps d'inclusion avec des particules virales. Noter la disposition des particules . Barre = 170 nm.

E: Suspension de particules virales observées en contraste négatif. Particules pleines (p) et creuses (c). Barre = 40 nm.

1.2.2. Les pathologies virales: nodavirus (Planche III).

Définition-historique

Les premiers cas de mortalités chez le poisson associés à la présence de particules virales dans le cerveau de larves et d'alevins sont décrits chez le bar élevé en Martinique (Bellance et Gallet de Saint Aurin, 1988). La maladie est alors décrite comme une maladie estivale survenant lorsque la température dépasse 29 à 30°C (Picollier, 1983 comm. pers.).

Symptômes et lésions (Planche III)

Les lésions consistent en une vacuolisation de la rétine et du cerveau (Bellance et Gallet de Saint Aurin, 1988; Breuil et coll., 1991). Des symptômes avec des lésions similaires du système nerveux sont décrits chez de nombreuses espèces de poissons. Le « striped Jack » (Mori et coll., 1992; Arimoto et coll., 1993), le poisson perroquet (Yoshikoshi et Inoue, 1990), le lates élevé en Australie (Glazebrook et coll., 1990; Glazebrook et Heasman, 1992; Munday et coll., 1992) et en Polynésie (Renault et coll., 1991), le mérrou (Mori et coll., 1991), le turbot (Bloch et coll., 1991) et bien sûr le bar (Breuil et coll., 1991). La liste des espèces sensibles à ce virus ne cesse de s'allonger (tableau I).

Etiologie (Planche III)

Le virus a été caractérisé chez le « striped jack » (*Pseudocarenx dentex*) par Mori et coll. (1992) et dénommé SJNNV (Striped Jack Nervous Necrosis Virus). Ce virus est un virus de la famille des nodaviridae à double brin d'ARN monocaténaire. L'ARN1 coderait pour la synthèse d'une protéine structurale d'environ 100 kD alors que l'ARN2 coderait pour la synthèse de deux protéines (40 et 42 kD) constituant l'enveloppe du virus. Les caractéristiques biochimiques du virus isolé chez le bar (*D. labrax*) et chez le lates (*Lates calcarifer*) sont très proches de celles du SJNNV (Comps et coll., 1994).

1.3. Importance des pathologies sur les stades de l'élevage.

1.3.1. Reproducteurs

Les reproducteurs étant prélevés dans le milieu naturel sont susceptibles d'héberger de nombreux agents pathogènes. Le développement d'épizooties est cependant peu fréquent car les reproducteurs sont le plus souvent placés à faible densité dans des enceintes réfrigérées où la température est maintenue entre 16 et 18 °C. Bien que des précautions sanitaires soient appliquées (bains antiseptiques et antiparasitaires), certains agents pathogènes peuvent être présents dans des pontes contaminées et sont susceptibles d'entraîner des mortalités chez les larves. Une attention particulière est portée sur la prévention de la vibriose, de la pasteurellose et de l'encéphalite à nodavirus.

1.3.2. Elevage larvaire

Le taux de survie en fin d'élevage larvaire est souvent supérieur à 70% car les pathologies sont peu fréquentes au cours de cette phase d'élevage. En effet, les écloséries sont équipées de systèmes de traitement de l'eau de mer par filtration et stérilisation (UV) qui permettent d'éliminer la majorité des parasites et des bactéries pathogènes. Dans ce type de structure, les risques pathologiques majeurs sont alors liés à l'introduction d'agents pathogènes *via* les œufs. Certaines écloséries sont ainsi régulièrement atteintes par des mortalités virales (nodavirus) ou bactériennes (quelques cas de pasteurellose auraient été observés en Grèce). Les larves sont exceptionnellement atteintes par la vibriose.

1.3.3. Sevrage

Cette étape est l'une des plus critiques de l'élevage du bar car elle présente des conditions très favorables (forte densité, stress et mortalité liée à

l'adaptation au nouveau type d'aliment, mise en place du système immunitaire) au développement des pathologies virales (nodavirus) et surtout bactériennes (vibriose, pasteurellose, cytophagales). Le taux de survie en fin de phase de sevrage est souvent inférieur à 50 %.

1.3.4. Grossissement

La survie moyenne au cours de la première année est supérieure à 70%. Les pathologies sont surtout d'origine bactérienne (vibriose, pasteurellose) en été et parasitaire en hiver. Les principaux parasites sont des monogènes (*Diplectanum aequens*), des copépodes (*Lernanthropus kroyeri*), des isopodes (*Nerocila orbignii*). Depuis 1995, l'encéphalite virale est responsable de très fortes mortalités estivales chez le bar.

1-4. Conclusion

Pour répondre aux préoccupations essentielles des professionnels concernant le développement des pathologies en éclosion, il nous paraît opportun de mettre l'accent sur l'importance des mesures prophylactiques et sur l'étude des mécanismes impliqués dans la transmission des maladies, surtout pour celles qui présentent une transmission verticale, comme la pathologie à nodavirus.

CHAPITRE II: LES IMMUNOGLOBULINES

CHAPITRE II : Les immunoglobulines

Dans ce chapitre, nous avons cherché par utilisation de réactifs immunologiques tels que les sondes monoclonales et polyclonales à doser les immunoglobulines dans le sérum, les œufs et les larves du bar

2.1. Etat des connaissances

Seule la forme M (chaîne μ) des immunoglobulines est présente chez les poissons téléostéens et ces dernières (IgM) sont toutes organisées en structures tétramériques à la différence des structures pentamériques des IgM des mammifères.

L'étude des immunoglobulines sériques du bar a été réalisée dans le cadre d'une thèse de doctorat (Bourmaud, 1994). Il s'agit de molécules de haut poids moléculaire (840 kD) présentant la structure tétramérique classique des IgM de poisson. Chaque monomère (210 kD) serait ainsi constitué de deux chaînes lourdes (chaînes H) de 77 kD et de deux chaînes légères (chaînes L) de 28 kD. La production d'anticorps monoclonaux (Acm) dirigés contre la chaîne H des IgM du bar a été également effectuée et nous permet de disposer d'Acm spécifiques (Romestand et coll., 1995).

Dans la présentation des travaux entrepris au cours de la thèse de Mlle Bourmaud, les IgM sériques du bar étaient isolées par chromatographie à pression ambiante sur gel de sépharose CL6B suivi d'une seconde chromatographie sur gel superose 6PG (Bourmaud et coll., 1995).

Dans l'optique d'améliorer cette technique d'isolement longue et fastidieuse, nous avons mis au point une technique plus rapide en optant pour un système de chromatographie fonctionnant en semi-haute pression. Cette technique a alors été transposée à la recherche et au dosage d'immunoglobulines (Ig-like) dans les œufs.

2.2. Les immunoglobulines sériques.

2.2.1. Matériel et méthodes

Les immunoglobulines sériques: aspects biochimiques

Isolement et purification par chromatographie (Planche IV).

Les échantillons (sérum de poisson) sont dilués au 1/5 dans du tampon de chromatographie (KH_2PO_4 100 mM, Na_2SO_4 100 mM pH 7,4) et introduits sous pression (7 bars) dans une colonne Ultraspherogel SEC-4000 équipée d'une précolonne sec Guard. Chaque substance éluée est analysée à 280 nm par une cellule de détection (ISCO UV 11) et récoltée avec un collecteur de fractions. Chaque chromatographie est réalisée en conditions standardisées dont le détail du protocole d'analyse chromatographique est présenté dans l'annexe I.

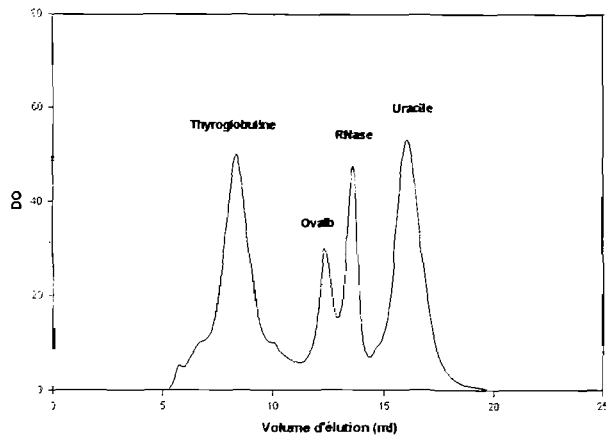
Dans un premier temps, une calibration de la colonne est effectuée avec une solution de contrôle contenant différents échantillons de poids moléculaires connus (Planche IV, Figure A).

Une première analyse du sérum de bar (Planche IV, Figure B) permet d'identifier 6 pics (A à F). L'étude comparée du chromatogramme obtenu avec un échantillon purifié d'IgM bovine (Planche IV, Figure C) indique que le pic B du sérum correspond au pic d'éluion de l'immunoglobuline M bovine dont le poids moléculaire est voisin de 900 kD.

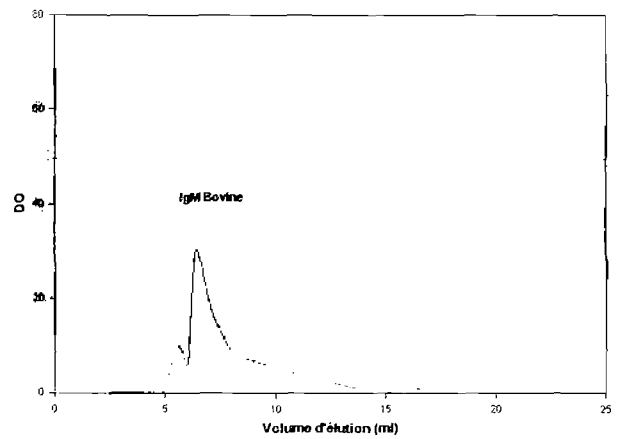
Les fractions correspondant au pic B ont été récupérées après éluion et concentrées sur filtres NOVACELL 100 kD, afin d'effectuer une seconde chromatographie de contrôle. Le chromatogramme obtenu (Planche IV, Figure D) est similaire à celui de l'IgM bovine (Planche IV, Figure C).

Planche IV : Chromatogramme des standards de poids moléculaires (PM), du sérum de bar , de l'IgM bovine et de l'IgM de bar.

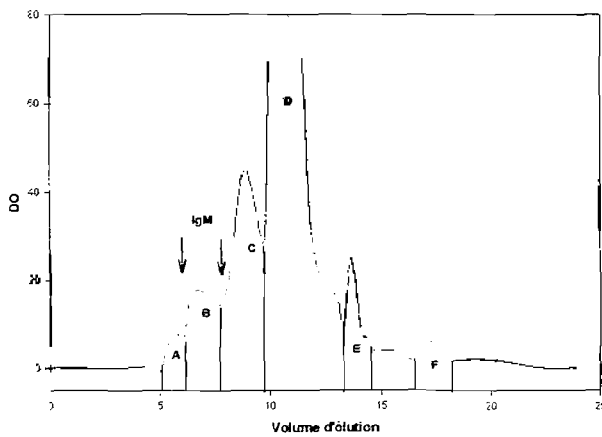
A: Standards de poids moléculaires



C : IgM bovine purifiée



B : Sérum de bar



D: IgM purifiée de bar

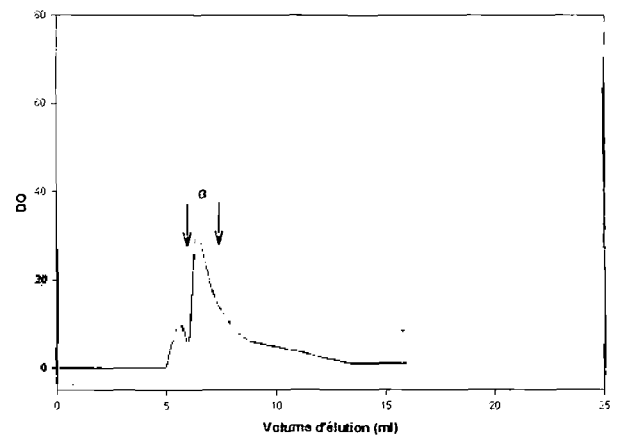
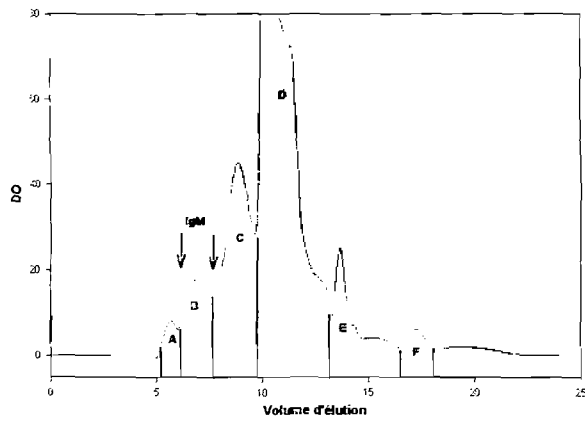
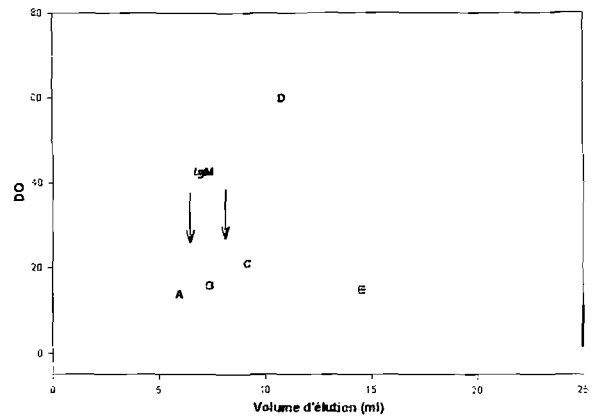


Planche V : Chromatogrammes de quelques sérums de poissons

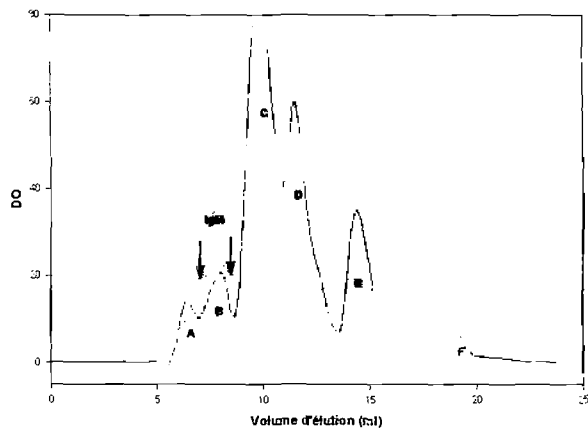
A : Sérum de bar



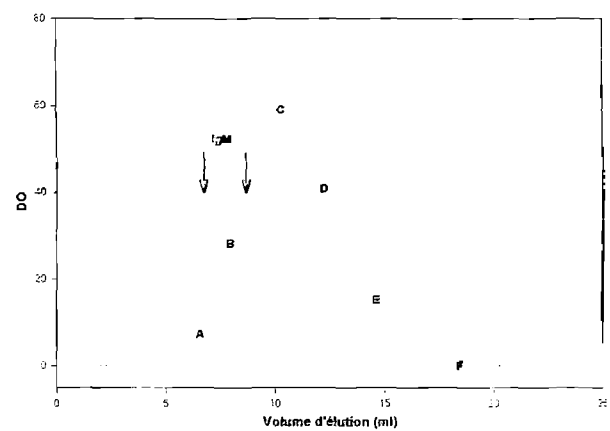
C : Sérum de turbot



B : Sérum de truite



D : Sérum de daurade



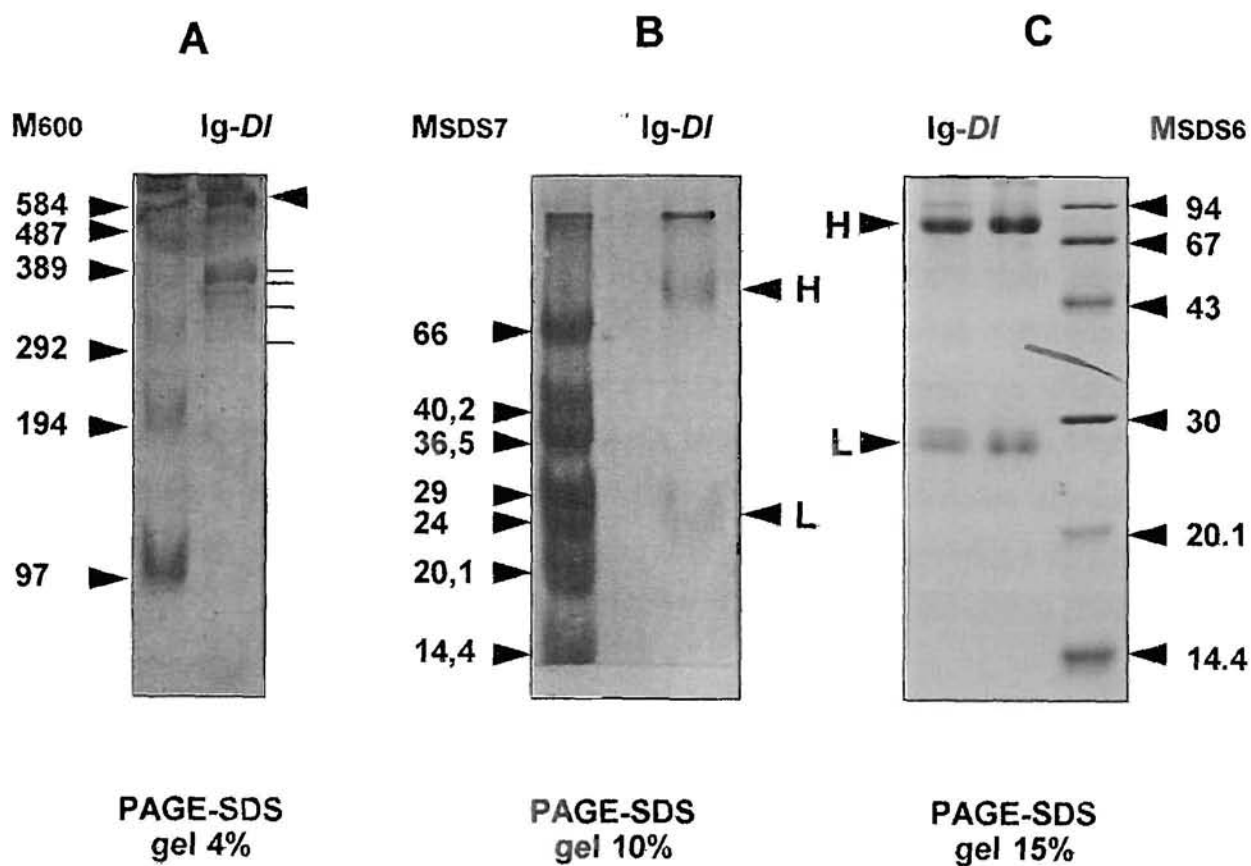
Le pic A correspondrait à des agrégats d'immunoglobulines car il est, en effet, retrouvé dans le chromatogramme de l'IgM bovine purifiée (Planche IV, Figure C) et des différentes IgM étudiées (IgM humaine, IgM de souris, IgM de poisson).

Le pic B représente le pic d'éluion de molécules d'un poids moléculaire égal ou supérieur à celui de la Thyroglobuline (660 kD) et voisin de celui de l'IgM bovine (900 kD) et pourrait correspondre à l'éluion des IgM présentes dans le sérum du bar. Ce pic est présent dans les chromatogrammes des sérums de bar, de turbot, de daurade, de truite et d'anguille (Planche V, Figures: A, B, C et D). L'analyse plus précise de ces différents chromatogrammes montre ainsi que les IgM de truite et de la daurade ont un poids moléculaire plus faibles que les IgM de bar ou de turbot. Cette observation est en accord avec les données de la littérature puisque les IgM de truite et de daurade ont un poids moléculaire inférieur à 800 kD (670 kD pour l'IgM de truite selon Ingram et Alexander, 1979 et 760 kD pour l'IgM de la daurade selon Navarro et coll., 1993) alors que celles du bar et du turbot ont un PM supérieur à 800 kD : 890 kD pour l'IgM de bar (Romestand et coll., 1995) et 835 kD pour l'IgM de turbot (Eztevez et coll., 1994).

Le pic C correspond à l'éluion de molécules dont le poids moléculaire est compris entre 70 kD (albumine bovine) et 660 kD (Thyroglobuline). Différentes fractions d'IgM (fractions monomériques et dimériques) présentes dans le sérum sont également éluées dans ce pic puisque une réponse positive est donnée lorsque cette fraction est dosée par un ELISA spécifique des Immunoglobulines du bar (Acm anti chaînes lourdes).

Le pic D correspond à l'éluion de différentes albumines dont le poids moléculaire est compris entre 46 kD (ovalbumine) et 70 kD (albumine bovine). En fonction de la concentration respective des fractions protéiques, les pics C et D sont parfois regroupés dans le chromatogramme de quelques sérums (sérum de daurade).

Planche VI : Caractérisation des IgM du bar par PAGE-SDS en conditions réduites et non réduites



Ig-DI : immunoglobuline de bar

M600, MSDS7 et MSDS6:
marqueurs de poids moléculaires.

Le pic E correspond à celui de la ribonucléase (15 kD) sur le chromatogramme de contrôle (Planche IV, Figure A) et correspond au pic d'éluion de l'hémoglobine sérique sous sa forme monomérique de 16 kD. Ce pic est d'ailleurs fortement augmenté dans le chromatogramme lorsque le sang de bar est hémolysé.

Enfin, le pic F correspond à des molécules de poids moléculaire inférieur à 100 Dalton correspondant à des produits de dégradation des protéines sériques (acides aminés).

Caractérisation des IgM du bar par PAGE SDS en conditions réduites et non réduites (Planche VI).

La caractérisation de l'immunoglobuline sérique du bar a été effectuée par électrophorèses PAGE-SDS en présence ou non de β -mercaptoéthanol (β ME). Les protocoles des différentes électrophorèses sont présentés dans l'annexe II.

Une électrophorèse réalisée en PAGE-native indique que les immunoglobulines du bar sont des molécules de haut poids moléculaire voisin de 850 kD (Romestand et coll., 1995) proche des 855 kD déterminés par Palenzuela et coll. (1996) et inférieur aux premières estimations (883 kD) effectuées par Bourmaud et coll. (1995).

L'électrophorèse en PAGE-SDS sur gel de 4% (Planche VI, Figure A) permet d'identifier une fraction de 850 kD, associée à différentes sous bandes (flèches) qui pourraient correspondre à des sous unités de poids moléculaires compris entre 290 kD et 590 kD.

En conditions réductrices (Planche VI, Figures B et C), les électrophorèses mettent en évidence des fractions de 80 kD et de 26 kD correspondant, respectivement à des chaînes lourdes (H) et légères (L). Ces valeurs permettent de calculer le poids moléculaire d'une structure quaternaire

de l'immunoglobuline qui serait de 848 kD (4 monomères de 206 kD: 2x26 kD + 2x80kD) soit une valeur très proche de la valeur obtenue après électrophorèse (850 kD) et de ses différents isomorphes: monomères de 206 kD, dimères de 412 kD et trimères de 618 kD.

Ces résultats, viennent compléter ceux obtenus par Romestand et coll. (1995), Scapigliati et coll. (1996) et Palenzuela et coll. (1996), qui trouvent des PM pour les chaînes H de 75-78 kD et 27-29 kD pour les chaînes L., et confirment que les immunoglobulines sériques du bar sont des molécules de haut poids moléculaire (850 kD) qui présentent la structure tétramérique classique des IgM de poissons. Chaque monomère (210 kD) serait ainsi constitué de deux chaînes lourdes (chaînes H) de 77 kD et de deux chaînes légères (chaînes L) de 28 kD.

Les électrophorèses peuvent être transférées sur une membrane de nitrocellulose (Annexe II) et être marquées par l'anticorps monoclonal (Ac 6E11). Ce marquage permet de révéler une bande d'environ 90 kD et précise ainsi la spécificité de cet anticorps pour la chaîne H des immunoglobulines (Romestand et coll., 1995).

Les immunoglobulines sériques: dosages immunologiques (Planche VII).

Les réactifs de dosages (Acm, Acp).

Différents types d'anticorps, anticorps monoclonaux de souris (Acm) et anticorps polyclonaux de lapin (Acp), ont été utilisés dans les dosages immunologiques

- Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux (Acm 6E11 spécifique de la chaîne H des IgM du bar) contenus dans les liquides d'ascites de souris sont purifiés (IgG de souris) par chromatographie d'affinité sur protéine A-sépharose (Annexe III). Après purification, les anticorps sont utilisés dans nos différentes analyses, soit

directement, soit après couplage avec de la biotine (anticorps biotinylé 6E11-B) ou avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (anticorps 6E11-FITC).

La biotinylation des anticorps (Acm 6E11) est réalisée selon la méthode décrite par Romestand et coll., (1995). Le protocole de biotinylation est présenté dans l'annexe IV.

Le couplage des anticorps à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) est réalisé en incubant pendant 2 heures l'anticorps choisi (Acm 6E11 ou IgG de lapin anti IgM ou anti T) avec une solution d'isothiocyanate dans du tampon phosphate 20 mM, pH 7,4 contenant 0,1 % d'azide de sodium. L'anticorps marqué est récupéré après élution sur une colonne PD10 Séphadex (Pharmacia) équilibrée avec le même tampon phosphate 20 mM, pH 7,4 contenant 0,1 % d'azide de sodium (annexe IV).

- Les anticorps polyclonaux de Lapin

- **Sérum anti-IgM:** Un lapin adulte néo-zélandais (Charles-River. France) reçoit trois inoculations à 15 jours d'intervalle (J0, J15 et J30) de 2 ml d'une solution d'IgM de bar (1 mg.ml^{-1}) dans du tampon PBS pH 7,4 additionné d'adjuvant complet de Freund (ACF) pour la première injection et d'adjuvant incomplet de Freund (AIF) pour les deux injections suivantes. Le sang est prélevé sur héparine au niveau de l'artère de l'oreille 15 jours après la dernière immunisation et le plasma est décanté puis conservé à -20°C .

- **Sérum anti cellules T :** un lapin est immunisé selon le même protocole que celui décrit pour la préparation du sérum anti-IgM. L'antigène utilisé ici est une suspension de lymphocytes provenant du thymus à raison de 2.10^6 cellules. ml^{-1} dans du PBS. Les lymphocytes sont obtenus par une technique de séparation sur Ficoll décrite dans la troisième partie relative à l'étude des cellules. Le sérum hyperimmun obtenu est alors épuré de ses anticorps anti-IgM par une mise en contact avec une solution concentrée d'IgM de bar, puis épuré de ses anticorps anti-érythrocytes par ajout d'une poudre acétonique d'hématies de bar. A l'issue de ces deux étapes d'épuration, le sérum est

centrifugé pendant 10 minutes à 1000g puis le surnageant (sérum anti-T) est conservé à -20°C.

Les IgG du sérum anti IgM et anti cellules T ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur protéine A-sépharose puis conjugués à la fluorescéine (FITC) selon le protocole décrit précédemment (Annexes III et IV).

Les différents dosages ELISA des IgM (Planche VII).

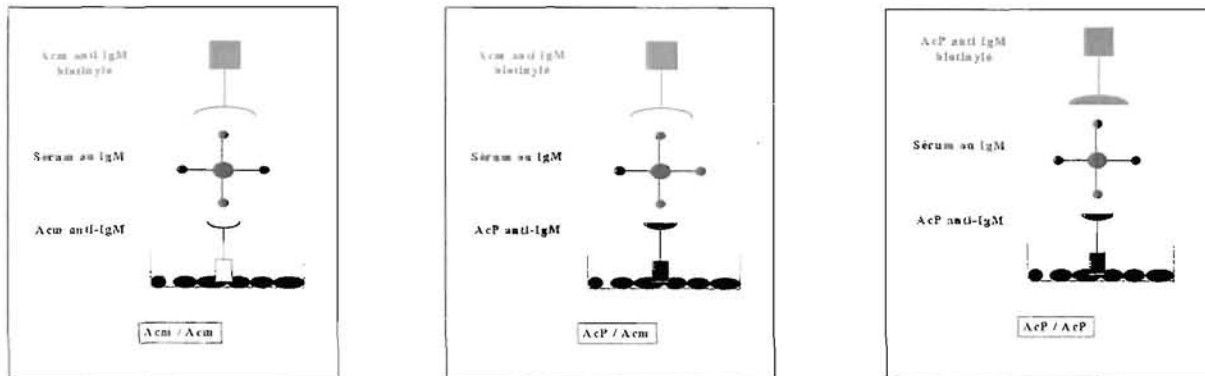
Les IgM présentes dans le sérum sont dosées par ELISA de type sandwich (Planche VII, Figure B) selon une technique indirecte au moyen d'un anticorps capteur monoclonal (6E11) et d'un anticorps traceur également monoclonal (6E11) couplé à la biotine (Romestand et coll., 1995). Les IgM sont alors dosées par rapport à de l'IgM purifiée ou par rapport à un sérum de référence.

Une comparaison des techniques de dosages par ELISA sandwich et par ELISA compétition effectuée dans le cadre de la thèse de Mlle Bourmaud (1994) a montré la supériorité de la technique ELISA de type sandwich pour le dosage des IgM sériques.

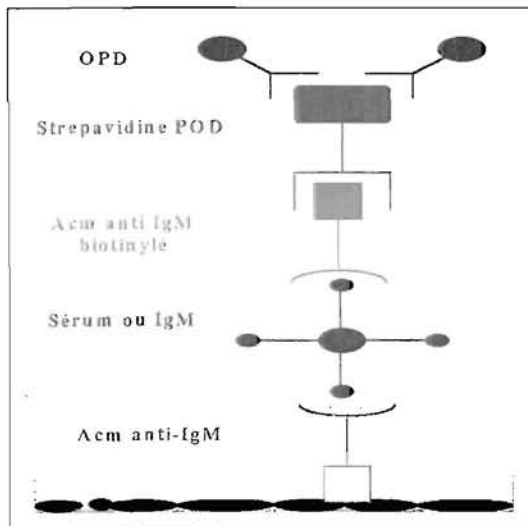
Afin d'optimiser la technique de dosage des immunoglobulines, nous avons comparé l'efficacité de l'Acm et de l'Acp anti-IgM quand ils sont utilisés comme anticorps capteurs (Planche VII, Figures A: configurations Acm/Acm et Acp/Acm). Les résultats du dosage d'un même sérum selon ces deux configurations sont présentés dans la figure 3.

Planche VII : Schémas des différents types de configurations du dosage des immunoglobulines selon un ELISA sandwich

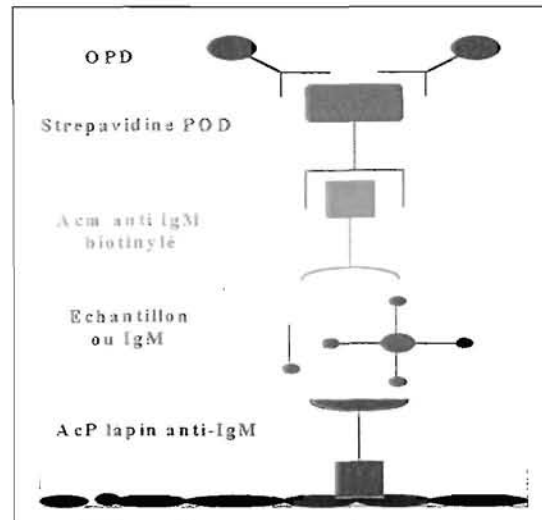
Figures A: Présentation des différentes configurations de l'ELISA sandwich



Figures B : Dosages des immunoglobulines sériques et vitellines par ELISA sandwich

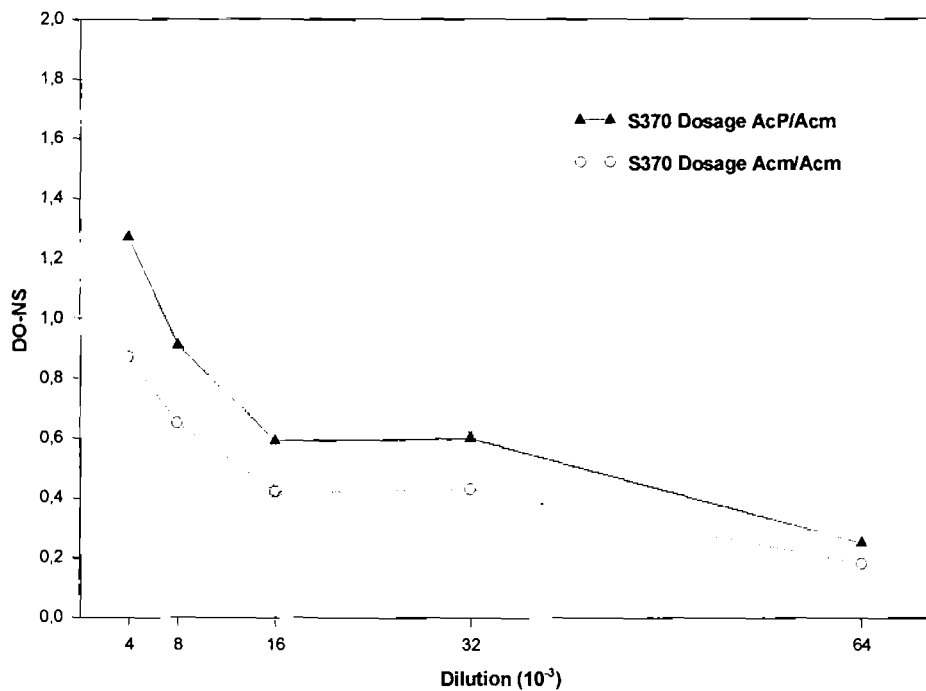


Dosage des Immunoglobulines sériques : configuration Acm / Acm



Dosage des immunoglobulines vitellines : configuration Acp / Acm

Figure 3 : Test en dilution des IgM contenues dans le sérum S370 de bar par utilisation de deux configurations différentes Acm/Acm et AcP/Acm



Les résultats obtenus par l'utilisation des deux configurations dans les tests ELISA de type sandwich montrent que la configuration mixte (AcP/Acm) n'apporte pas de différence significative par rapport à la configuration utilisant deux anticorps monoclonaux. Celle-ci a donc été retenue pour le dosage des IgM sériques car les différences de dosage obtenues avec les deux configurations ne sont pas significatives.

Il est intéressant de noter que pour le même sérum (S370 sérum de référence) les résultats obtenus avec les deux configurations semblent presque identiques. En effet, le sérum de référence est dosé à $6,05 \text{ mg.ml}^{-1}$ d'IgM selon la configuration mixte AcP/Acm et à $5,4 \text{ mg.ml}^{-1}$ par la configuration standard Acm/Acm.

2.2.2. Modulation de la réponse immunitaire humorale

Etat des connaissances

La réponse immunitaire humorale des poissons peut être modulée selon différents paramètres (température, âge et taille, immunisation du poisson, facteurs toxiques, stress), et se traduire par une modification de la teneur en IgM sérique. Parmi ceux-ci, la **température** d'élevage des individus a été le paramètre le plus étudié (Bly et Clem, 1992) car les poissons sont des poïkilothermes.

Une **température** basse peut inhiber la synthèse d'anticorps tant *in vivo* (Avtalion et coll., 1973; Weiss et coll., 1977) qu'*in vitro* chez le poisson chat (Miller et Clem, 1984) et chez le « bluegill » (Cuchens et Clem, 1977). Bien que le mécanisme d'une telle inhibition ne soit pas totalement éclairci, il est possible que cet effet soit dû en grande partie à l'inhibition des cellules T helper participant à la réponse anticorps (Avtalion 1981). Cette hypothèse est confirmée par les études de stimulation *in vitro* de lymphocytes avec un antigène T-dépendant (Miller et Clem, 1984). Cependant, la température étant l'un des paramètres les mieux contrôlés en éclosion, son influence sur le système immunitaire (IgM) du bar peut être considérée comme négligeable dans nos élevages.

L'étude de **l'influence de l'âge et de la taille** a été effectuée et quelques observations indiquent que la teneur en IgM sérique augmente au fur et à mesure de la croissance des poissons (Lobb et Clem, 1983; Matsubara, 1985; Klesius, 1990 et 1992; Ourth et coll., 1991; Sanchez et coll., 1993). Une telle étude devait également être effectuée chez le bar, car la jeune larve voit son poids multiplié par plusieurs milliers au cours du premier semestre correspondant à la phase d'élevage en éclosion et en prégrossissement.

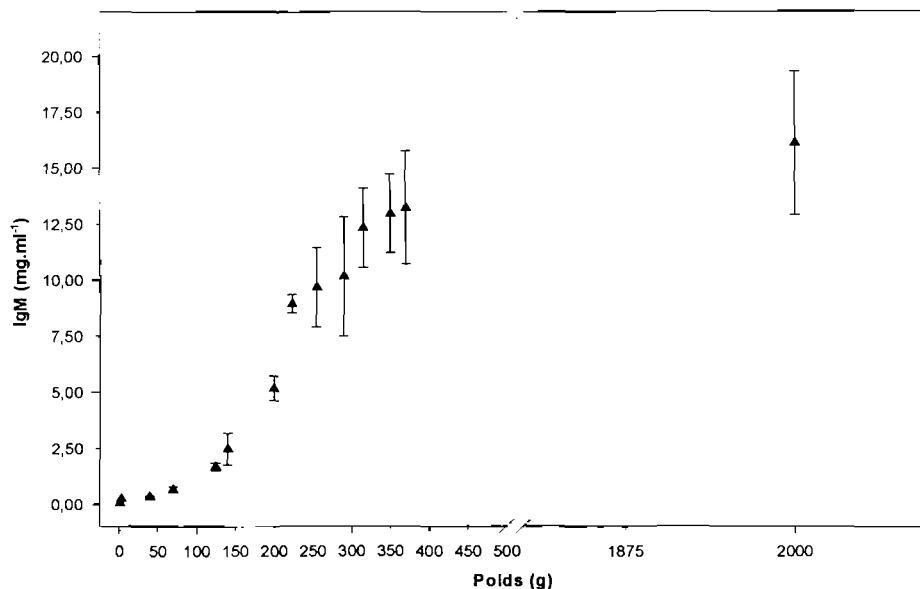
Une **stimulation** du système immunitaire peut également moduler la réponse immunitaire et l'apparition d'anticorps spécifiques après une immunisation avec différents types d'antigènes, que ce soit des antigènes T-indépendants (LPS) ou T-dépendants (KLH ou BSA) a fait l'objet de nombreuses publications (Ortiz Muniz et Sigel, 1971; Faulmann et coll., 1983;

Miller et coll., 1985; Luft et coll., 1991; Marsden et coll., 1995). Paradoxalement, l'immunisation ne semble pas entraîner de modification importante de la teneur en IgM sérique chez les poissons. De telles modifications ont été observées soit précocement c'est à dire, dans les jours suivant l'immunisation (Evenberg et coll., 1986) soit tardivement dans les 2 à 3 mois suivants l'immunisation (Coourdacier et coll., 1997 sous presse).

Evolution de la teneur en IgM sérique au cours de la croissance

Par utilisation d'un dosage ELISA indirect de type sandwich, nous avons pu étudier l'évolution du taux d'IgM sérique en fonction de la croissance chez des poissons dont le poids moyen est compris entre 2 et 375 g. Pour chaque poisson (8 à 16 poissons par lot) les dosages ont été effectués en triplicat. La moyenne, et l'intervalle de confiance correspondant à chaque lot sont représentés sur la figure 4.

Figure 4 : Evolution de la teneur en IgM sérique chez le bar en fonction de la croissance



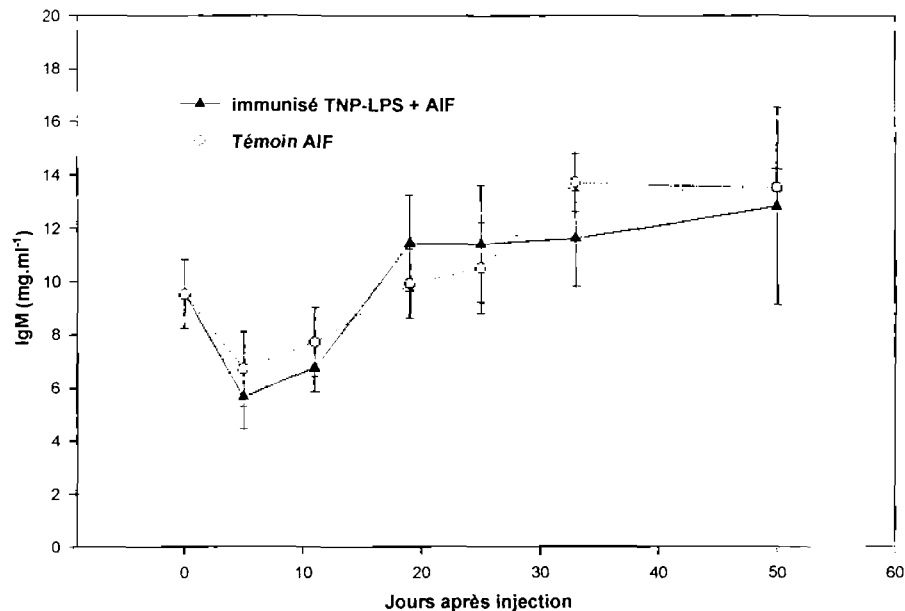
Le taux d'IgM sérique décuple lorsque le poids moyen passe de 5 à 200 g, et semble se stabiliser chez l'adulte où cette teneur est comprise entre 12 et 20 mg.ml⁻¹ (bars de plus de 2 kg). Cette augmentation est donc considérable. Ce type d'observation, à savoir un décuplement de la teneur en IgM sérique de

1 à 10 mg.ml⁻¹ est également rapportée chez le poisson chat (Lobb et Clem, 1983). Chez cette espèce, le taux d'IgM sérique passe de 4.4 mg.ml⁻¹ chez des poissons de 7,5 cm à 65 mg.ml⁻¹ chez des poissons de 45 cm de longueur (Klesius, 1992).

Evolution de la teneur en IgM sérique après immunisation

Nous avons effectué une immunisation expérimentale de 16 bar adultes (100 à 300 g de poids moyen avec une solution (260 mg.ml⁻¹) de lipopolysaccharides (LPS) de *Escherichia coli* couplés au trinitophénol (TNP-LPS Sigma F5506). Pour l'immunisation, la solution de TNP-LPS est émulsionnée avec une quantité égale d'adjuvant incomplet de Freund (AIF Sigma) puis injectée en sous-cutanée (deux inoculations de 0,1 ml contenant 26 mg de LPS) à chaque poisson. Les poissons du lot témoin (16 poissons) reçoivent une préparation contenant de l'adjuvant incomplet (AIF) émulsionné dans du PBS seul (Témoin AIF).

Figure 5 : Evolution des IgM sériques après immunisation



L'immunisation expérimentale avec du TNP-LPS n'entraîne pas de modification de la teneur en IgM sérique significative par rapport à celle du lot

témoin. Chez les deux lots, les taux d'IgM sériques augmentent au cours de la croissance pour se stabiliser à 12 mg.ml^{-1} 50 jours après l'injection. Une diminution de la teneur en IgM sérique est observée entre le 5^{ème} et le 10^{ème} jour suivant l'injection.

2.2.3. Evolution de la teneur en anticorps chez le bar après immunisation

Principe du dosage des anticorps (Planche VIII, Annexe VI)

Le dosage consiste à rechercher dans le sérum du bar les anticorps dirigés soit contre les LPS (protéine porteuse) soit contre l'haptène (en l'occurrence les nitrophénols). Nous avons choisi cette dernière méthode de dosage car elle présente l'avantage de pouvoir disposer d'une population de poisson témoin dont la séronégativité est garantie puisque l'antigène utilisé (nitrophénol) n'est pas présent dans l'environnement naturel du poisson..

Les sérums provenant de bars immunisés avec la solution de TNP-LPS (*Escherichia coli*) ont été titrés selon un dosage ELISA de type sandwich dont le schéma est représenté dans la figure A de la planche VIII et dont le protocole est décrit dans l'annexe VI

Un sérum positif de référence a préalablement été obtenu en mélangeant les différents sérums prélevés 50 jours après l'immunisation chez le lot de poissons immunisés (16 poissons). La titration de ce sérum de référence a alors été effectuée selon la méthode de dilution en prenant pour base de calcul la dilution du sérum correspondant à 50 % de la densité optique maximale (Harlow et Lane, 1988; Arkoosh et coll., 1990).

Le titre en anticorps du sérum de référence est calculé en prenant la densité optique (DO) correspondant à 50% de la DO maximale. Pour le sérum de référence S_{Ips} , La $DO_{50\%}$ est obtenue pour une dilution de 1/150 (Dilution = 150), et le titre de ce sérum est donné par la formule:

$$\text{Titre (UI.ml}^{-1}\text{)} = \text{Dilution} \cdot 10^3 / 50^* \text{ (* prise d'essai).}$$

Planche VIII : Principes des différents types de dosages des anticorps sériques anti-nitrophénols (NP) et anti-nodavirus

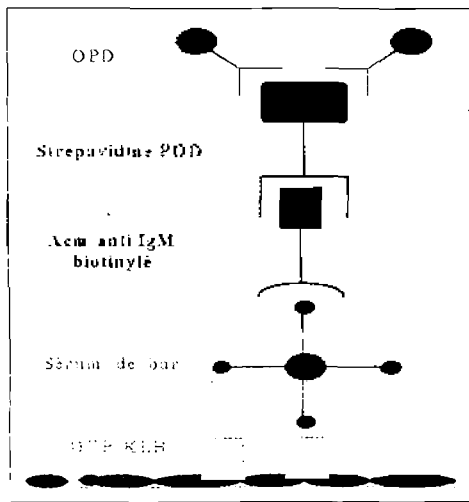


Figure A : Dosage des anticorps anti-nitrophénols

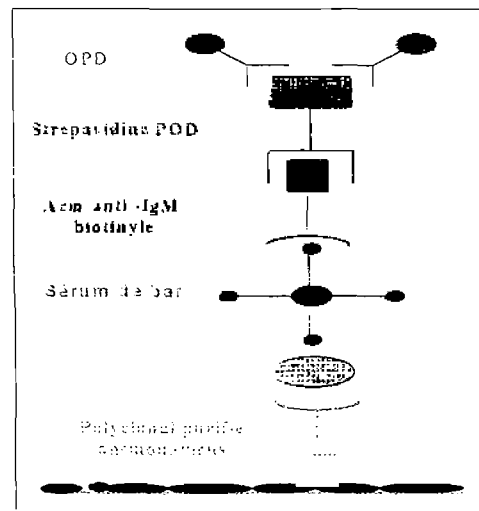
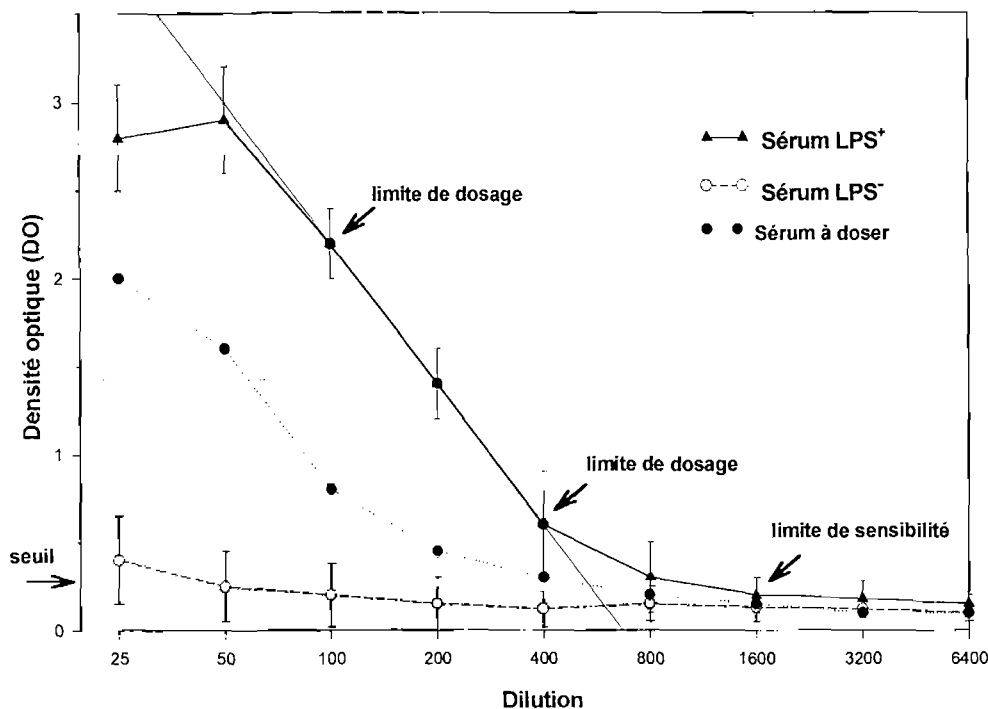


Figure B : Dosage des anticorps anti-nodavirus

Figure 6: Détermination du titre d'anticorps anti-nitrophénol dans le sérum de référence



Chaque sérum est titré par rapport au sérum de référence pour une DO comprise entre les deux limites de dosage. Ces limites de dosage correspondent aux densités optiques minimales et maximales relevées sur la portion linéaire ($r^2 > 0,95$) de la courbe de titration du sérum de référence. Dans l'exemple de la figure 6, l'échantillon doit avoir une DO comprise entre 0,5 et 2,5 pour pouvoir être dosé.

(i) Un titre nul est donné pour les sérums dont la DO est inférieure au seuil de sensibilité du test ELISA. Ce seuil correspond à la densité optique (DO) relevée pour la dernière dilution du sérum de référence (dans notre exemple pour la dilution 1/1600) ayant une DO significativement différente de celle observée pour la dilution suivante (limite de sensibilité). Le seuil de sensibilité du dosage des anticorps anti-nitrophénol correspond à une DO inférieure à 0,3.

(ii) les sérums dont la DO est comprise entre le seuil de sensibilité et la limite de dosage (DO=0,5) sont considérés comme « douteux ».

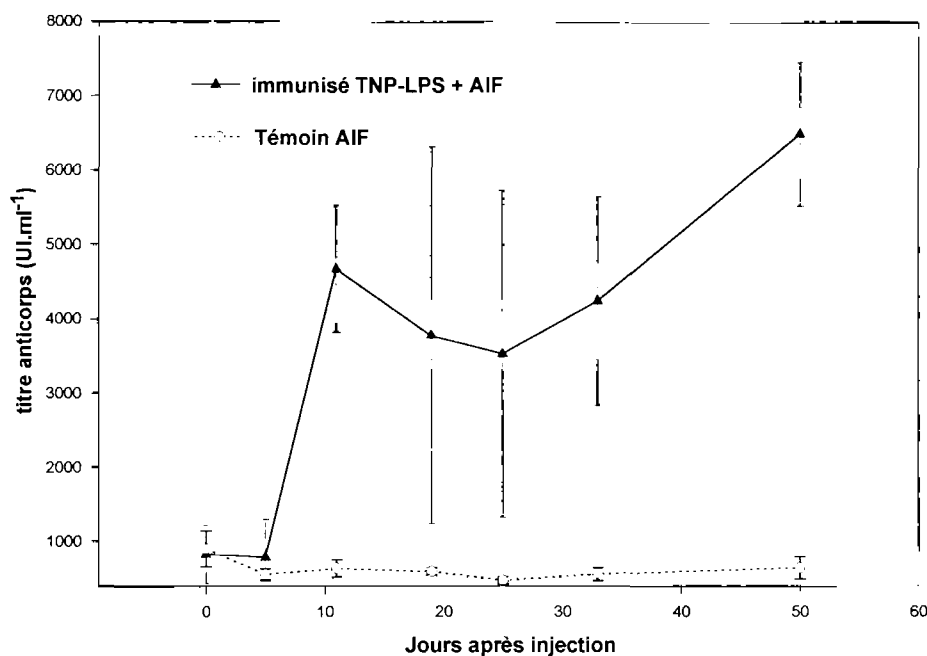
(iii) Les sérums dont la DO est comprise dans les limites du dosage sont titrés et considérés comme positifs.

(iii) Enfin, les sérums très positifs dont la DO est supérieure à la limite maximale de dosage ont été analysés avec une dilution supérieure.

Dosage des anticorps sériques après immunisation expérimentale

Les sérums provenant des lots de poissons témoins et immunisés (16 poissons) ont été prélevés à plusieurs jours d'intervalle suivant l'immunisation et titrés. Les résultats sont présentés dans la figure 7.

Figure 7 : Evolution du titre d'anticorps anti-nitrophénol après immunisation du bar



Les anticorps sériques sont détectés à partir du 10^{ème} et jusqu'au 50^{ème} jour suivant l'injection de TNP-LPS. Chez les poissons immunisés, une grande variabilité individuelle est constatée correspondant à l'identification d'individus *bon* ou *mauvais répondeurs* dans ce lot, même si les titres en anticorps restent élevés et supérieurs à 4000 UI.ml⁻¹.

Chez les poissons témoins, le titre en anticorps est toujours inférieur à 1000 UI.ml⁻¹, et pourrait être considéré comme nul puisqu'il n'est pas consécutif à une immunisation. Cependant, ce titre même s'il est extrêmement faible, pourrait traduire l'existence d'anticorps anti-NP naturels présents

spontanément chez les poissons comme cela été décrit chez la carpe (Vilain et coll., 1984).

2.3. Les immunoglobulines « vitellines »

L'étude biochimique des immunoglobulines implique la recherche de formes d'immunoglobulines organisées en structures simples (formes monomérique ou dimérique d'IgM) car de telles structures (surtout des formes monomériques) ont été mises en évidence dans des extraits solubles d'œufs de tilapia (Avtalion et Mor, 1992).

Des immunoglobulines ont également été détectées dans les œufs et les ovocytes de différentes espèces de poissons marins ; la plie (Bly et coll. 1986, le poisson chat (Hayman et Lobb, 1993), le saumon chum (Fuda et coll., 1992) et le saumon coho (Yousif et coll., 1995). Ces immunoglobulines sont localisées préférentiellement dans la membrane de l'œuf fécondé chez le poisson chat (Hayman et Lobb, 1993; Olsen et Press, 1997).

Après avoir mis en évidence les immunoglobulines présentes dans les œufs du bar, nous essaierons de les localiser *in situ* par marquage de coupes en congélation avec un anticorps monoclonal anti-IgM de bar. Deux observations, l'une chez *Ictalurus punctatus* (Haymann et Lobb, 1992), l'autre chez *Salmo salar* (Olsen et Press, 1997) indiquent que ces immunoglobulines « vitellines » sont localisées sous le chorion de l'œuf.

Nous envisageons de démontrer, comme cela a été vérifié chez des larves de Tilapia âgées de 0 à 9 jours (Mor et Avtalion 1990), que ces IgM « vitellines » possèdent une activité spécifique (activité anticorps)

Enfin, nous essaierons de démontrer que ces immunoglobulines ont un rôle fonctionnel protecteur contre divers agents pathogènes comme l'ont démontré Shors et Winston (1989) pour le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse chez la truite et contre divers copépodes (*Caligus elongatus* et *Lepeophtherius salmonis*) parasites du saumon (Reily et Mulcahy, 1993).

2.3.1. Matériel et méthodes

Les immunoglobulines « vitellines » : aspects biochimiques

Extraction, isolement, purification. (Annexe I)

Les immunoglobulines « vitellines » ont été isolées par chromatographie d'exclusion sur colonne 4000 selon le même protocole que celui mis au point pour l'isolement des IgM sériques (Annexe I). Dans l'optique d'améliorer l'isolement, nous avons effectué une double chromatographie pour certains échantillons. Une première chromatographie est effectuée sur une colonne échangeuse d'ions et le pic élué donnant une réponse positive selon un dosage ELISA des immunoglobulines est alors récupéré, concentré et à nouveau élué sur une colonne d'exclusion (SEC 4000).

- Chromatographie sur colonne SEC 4000 (Planche IX).

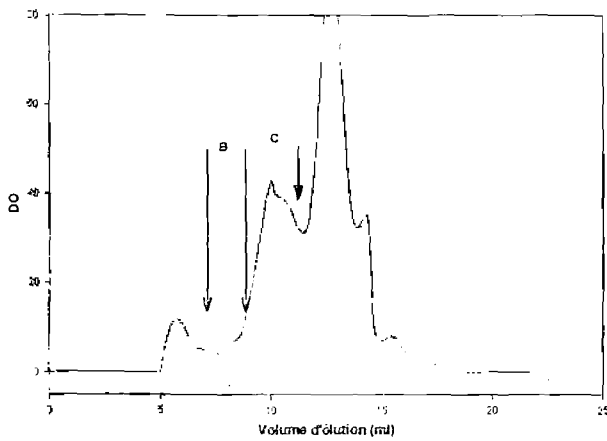
Nous n'observons pas de pic correspondant à l'élution de l'IgM de bar sous la forme tétramérique de 850 kD (Planche IX, Figure A). A titre d'exemple, le profil d'élution de l'IgM (forme tétramérique) est reporté Planche IX Figure D. De plus, aucune IgM n'est détectée dans la fraction correspondante. Par contre, le même dosage ELISA indique la présence d'IgM dans la fraction du pic C correspondant à l'élution de molécules dont le poids moléculaire est compris entre 100 et 660 kD (Planche IX, Figure B).

- Chromatographie sur résine échangeuse d'ions (Annexe I).

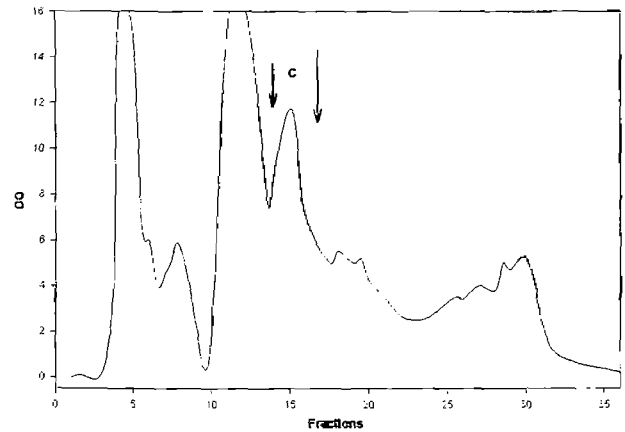
Nous avons utilisé une colonne Q sépharose équilibrée avec un tampon Tris, pH 9,2. L'échantillon (4 ml d'extrait d'œuf) est élué par un tampon Tris/NaCl, pH 9,2 avec une concentration croissante en NaCl de 5% à 100%.

Planche IX: Chromatogrammes des œufs de bar obtenus après chromatographies sur colonne SEC 4000 et sur résines échangeuses d'ions.

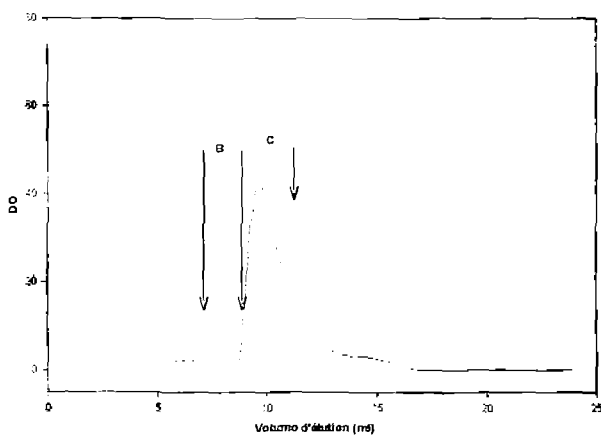
A : colonne SEC 4000



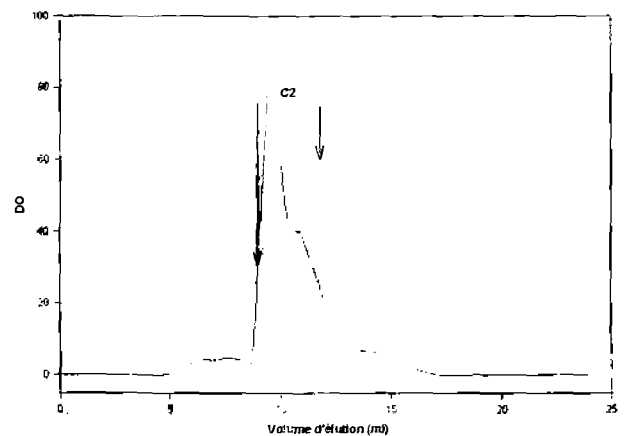
C : colonne échangeuse d'ions



B : fraction C colonne SEC 4000



D : fraction C2 colonne SEC 4000 D :



La présence d'IgM est décelée dans un seul pic (Planche IX, Figure A). L'homogénéité de taille (PM) des molécules de la fraction ainsi éluée est estimée en effectuant une seconde chromatographie sur colonne SEC 4000 de cette fraction (Planche IX, Figure B).

Dans le cas d'une chromatographie effectuée sur une colonne échangeuse d'ions, la fraction donnant une réponse positive selon un dosage ELISA est éluée dans le pic C2 (Planche IX, Figure C).

Une seconde chromatographie sur colonne SEC 4000 de cette fraction C2 (Planche IX, Figure D), montre que la taille des molécules éluées sur colonne échangeuse d'ions correspond à celle des molécules éluées sur colonne d'exclusion.

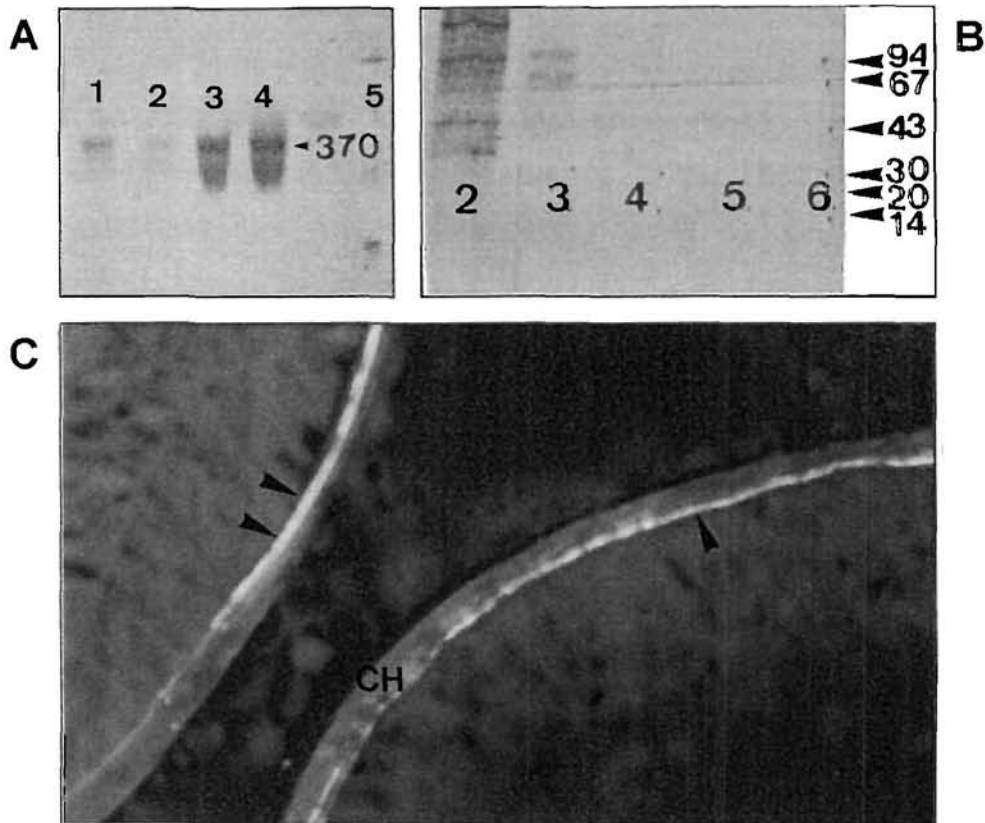
Les chromatogrammes des fractions ainsi isolées, reconcentrées sur membrane Filtron 100 kD, permettent de préciser le poids de la molécule qui est voisin de 200 kD.

*Caractérisation des immunoglobulines « vitellines » par PAGE native ,
PAGE SDS et immunotransfert (Planche X, Annexe II)*

Le poids moléculaire des immunoglobulines vitellines a été déterminé par électrophorèses PAGE native et PAGE-SDS de broyats d'œufs (Annexe II).

L'électrophorèse PAGE Native (Planche X, Figure A) permet de mettre en évidence une fraction protéique d'environ 370 kD dont le poids moléculaire est plus faible que celui de la vitellogenine (445 kD: Mananos et coll., 1994). Après une électrophorèse PAGE-SDS, les fractions correspondants aux immunoglobulines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose et marquées avec l'anticorps monoclonal (Acm 6E11) et le sérum de lapin apin anti-IgM. Les résultats de l'immunotransfert (Planche X, Figure B) mettent en évidence des chaînes H d'immunoglobulines dans les broyats d'œufs du bar.

**Planche X: immunoglobulines vitellines du bar. Electrophorèses , immuno-
-empreintes et localisation dans les oeufs.**



A: Electrophorèse PAGE native, gel 4-15%.

- 1 et 2: sérum de bar.
- 2 et 3: extrait soluble d'oeuf de bar.
- 4: marqueur de poids moléculaires.

B: Immuno-empreinte après électrophorèse en conditions réductrices et marquage avec l'Acm 6E11 anti-IgM de bar.

- 2: sérum de bar
- 3 et 4: extraits solubles d'oeuf de bar. Mise en évidence de fractions protéiques contenant des chaînes H d'immunoglobulines (flèches).
- 5: extrait soluble d'oeuf de daurade.
- 6: marqueur de poids moléculaires.

C: Coupe en congélation d'oeuf de bar observée en épifluorescence après marquage FITC indirect avec l'Acm 6E11 anti-IgM de bar.

- les immunoglobulines (flèches) sont localisées sous la membrane chorionique (CH). Barre= 50 µm.

La taille des immunoglobulines « vitellines », même si elle n'a pas été déterminée précisément, est cependant inférieure à 370 kD et pourrait correspondre à une forme monomérique (210 kD) puisque seules des formes monomériques ont été mises en évidence dans les œufs de différentes espèces de poissons comme le tilapia (Avtalion et Mor, 1992; Mor et Avtalion, 1988 et 1990), le poisson chat (Hayman et Lobb, 1993), le saumon chum (Fuda *et coll.*, 1992) et le saumon coho (Yousif *et coll.*, 1995).

Localisation des immunoglobulines « vitellines » dans les œufs par marquage FITC indirect avec un Acm anti-IgM de bar. (Planche X, Annexes IX et XI)

Des œufs de bar et de daurade ont été prélevés au premier jour d'incubation, inclus dans une solution d'agarose à 2,5 % (Annexe IX) et congelés à -20 °C. Les blocs congelés ont été découpés à l'aide d'un cryotome (Microm HM505E) et les coupes en congélation (10 µm d'épaisseur), déposées sur des lames histologiques, ont été conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Après décongélation des coupes, un marquage indirect des tissus est effectué avec l'Acm 6E11 anti-IgM de bar ou avec du sérum normal de souris (sigma) dans le cas du témoin autologue (œuf de bar). La présence de l'Acm 6E11 est alors révélée par un anticorps anti-IgG de souris conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Les coupes ainsi marquées sont observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Annexe XI).

L'observation en épifluorescence des coupes d'œufs de bar (Planche X, Figure C) permet de mettre en évidence une fluorescence (flèches) dans la membrane chorionique (CH) des œufs. Cette fluorescence est particulièrement intense au niveau de la partie située juste sous la membrane interne du chorion. Aucune fluorescence n'est détectée sur les coupes d'œufs de daurade marquées avec l'Acm 6E11 (témoin négatif hétérologue), ni sur les œufs de bars marqués avec un sérum négatif de souris (témoin négatif autologue).

Cette fluorescence révèle la présence d'immunoglobulines « vitellines »

dans les œufs de bar. Ces immunoglobulines sont particulièrement abondantes sous la membrane du chorion.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Hayman et Loob (1993) qui détectent, avec un anticorps polyclonal, des immunoglobulines dans la membrane chorionique de l'œuf de poisson chat. Plus précisément, et à l'aide d'un anticorps monoclonal, Olsen et Press (1997) ont localisé les immunoglobulines « vitellines » sous la membrane chorionique de l'œuf de saumon.

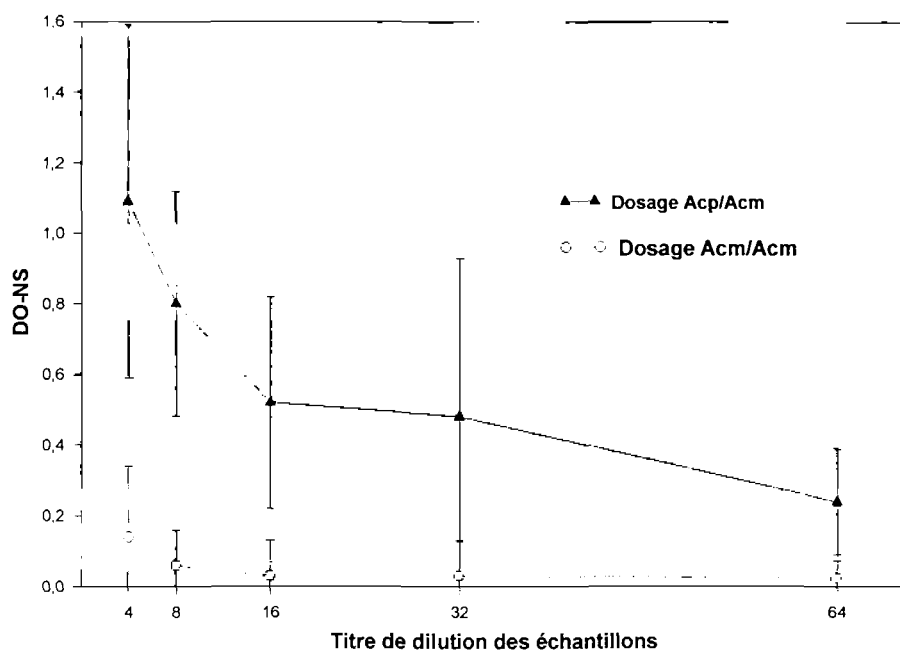
Les immunoglobulines « vitellines : dosages immunologiques (Planche VII, Figures B p 36)

Deux configurations de dosage ELISA ont été testées. La première configuration est similaire à celle utilisée pour le dosage des IgM sériques et utilise deux anticorps monoclonaux (Acm/Acm), la seconde configuration utilise une immunoglobuline polyclonale purifiée (IgG) de lapin comme anticorps capteur (Acp/Acm). La spécificité de la réaction n'est pas modifiée puisque le même anticorps monoclonal biotinylé est utilisé comme anticorps traceur au cours de l'étape ultérieure.

Dans les deux configurations testées, l'anticorps capteur est soit un anticorps monoclonal Acm ($2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) soit une IgG polyclonale de lapin Acp ($10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), l'anticorps traceur est un anticorps monoclonal Acm (6E11) biotinylé utilisé à la dilution 1/8000 ($0.17 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) comme indiqué dans l'annexe V. Pour chaque dosage, les échantillons (œuf et sérum S370) sont déposés en triplicats (Figure 9).

Dans le cas du dosage des immunoglobulines « vitellines », le signal obtenu avec une configuration mixte Acp/Acm est bien supérieur (et significativement différent) de celui obtenu avec une configuration standard Acm/Acm (Figure 9), alors qu'une telle différence n'était pas apparue dans le dosage des IgM sériques. La configuration AcP/Acm a donc été retenue pour effectuer le dosage des immunoglobulines présentes dans les œufs et dans les broyats totaux de larves.

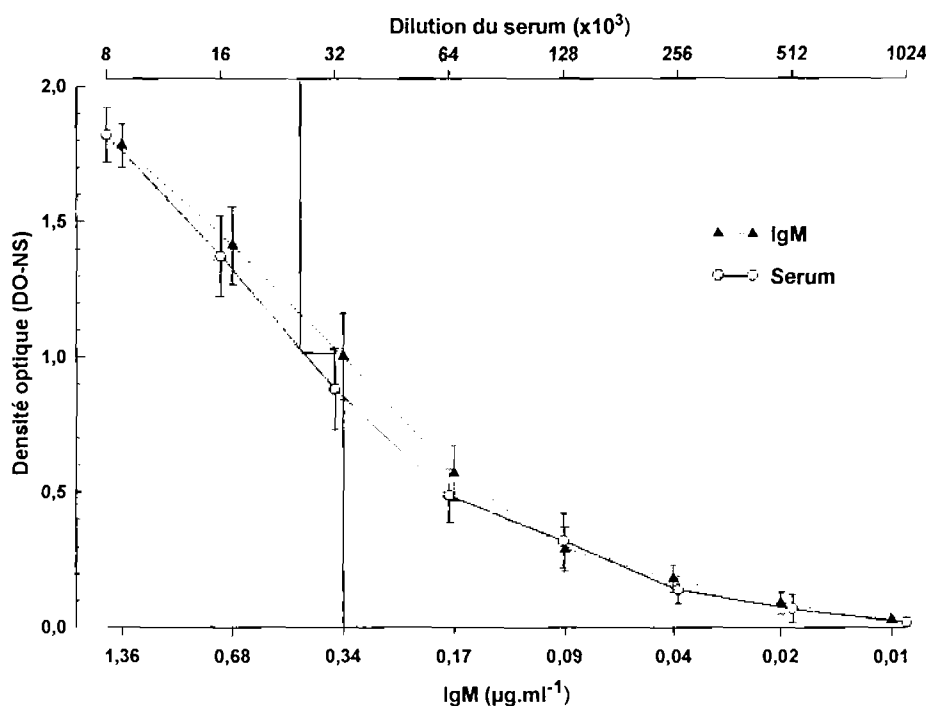
Figure 9 : Comparaison du dosage des Immunoglobulines « vitellines » selon deux configurations ELISA : anticorps capteur monoclonal (Acm/Acm) ou polyclonal (Acp/Acm).



Une première étape du dosage consiste à disposer d'un standard positif de référence qui est souvent représenté par de l'IgM purifiée de bar. Cependant, une grande variabilité de réactivité a été observée entre les différents lots d'IgM purifiée que nous avons testés. Différents paramètres permettant d'expliquer cette variabilité ont été incriminés, parmi lesquels : le type de colonne utilisée (colonne Beckman ou colonne Pharmacia Sanofi), la technique de concentration (centrifugation sur membranes Filtron de 100 kD) et de filtration (filtres 0,22 μm) et la méthode de conservation (-20°C , -80°C , -180°C). Un sérum (IgM sérique) non dilué et congelé à -20°C , s'est avéré plus stable que de l'IgM purifiée et donc mieux adapté pour être utilisé comme standard dans les dosages.

La concentration en IgM d'un sérum de référence (S370 pool de différents sérums) a donc été déterminée par rapport à de l'IgM de bar purifiée (Figure 10).

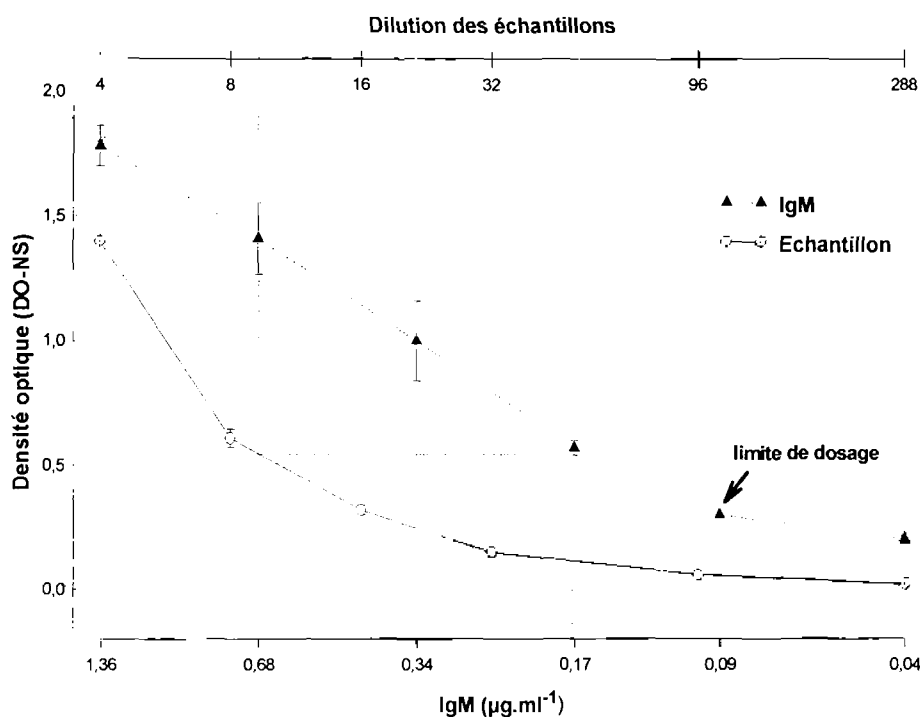
Figure 10 : Exemple de dosage (Acp/Acm) du sérum de référence S370 par rapport à de l'IgM de bar purifiée



Le dosage est effectué graphiquement en déterminant la dilution du sérum qui donne une DO identique à celle du standard. Dans l'exemple de la Figure 10, une DO de 1 est obtenue avec la dilution 1/28000 du sérum et une DO identique correspond à une concentration de $0,34 \mu\text{g.ml}^{-1}$ d'IgM. La détermination de la teneur en IgM du sérum est $0,34 \times 28000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ soit $9,52 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Dans un second temps (Figure 11), chaque extrait d'œuf ou de larve est dosé par rapport à ce standard (IgM du sérum S370 de référence). La teneur en IgM de l'échantillon est calculé de la même façon que celle du sérum de référence. Dans l'exemple de la Figure 11, une DO de référence ($\text{DO}=0,6$) est choisie pour une concentration d'IgM du sérum de $0,17 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Cette concentration correspond à une partie rectiligne de la courbe de dilution du sérum standard dont le coefficient de régression est calculé pour 4 points ($r^2 > 0,95$).

Figure 11 : Exemple de calcul des Immunoglobulines présentes dans les extraits totaux d'œufs et de larves. ELISA sandwich mixte Acp/Acm



La teneur en IgM ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) de l'échantillon est donné par la formule:

$$I_{g_{ech}} = 0,17 \times Dil_{ech} \text{ soit dans l'exemple de la Figure 11, } I_{g_{ech}} = 1,7 \mu\text{g.ml}^{-1}.$$

La limite de dosage des immunoglobulines dans les échantillons est calculée à partir de la plus faible concentration en IgM utilisée pour le calcul de la droite de régression. Dans notre dosage des immunoglobulines cette limite est $0,09 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et correspond à celle définie dans le cadre d'un dosage ELISA ($0.2 \mu\text{g.ml}^{-1}$) basé sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal (Castillo et coll., 1993).

La sensibilité du dosage correspond à la concentration en IgM de l'échantillon obtenue pour une densité optique (DO_{ech}) supérieure et significativement différente de celle du non-spécifique (DO_{NS}).

$$DO_{ech} > DO_{NS} \pm t \cdot \sigma_{NS} / \sqrt{n}$$

Lorsque les échantillons sont déposés en triplicats ($n=3$) la formule de calcul est simplifiée (avec $t=4,3$ donné par la table de Fisher et Yates pour 2 degrés de liberté et $P>0,005$) et devient: $DO > DO_{NS} \pm 3\sigma_{NS}$.

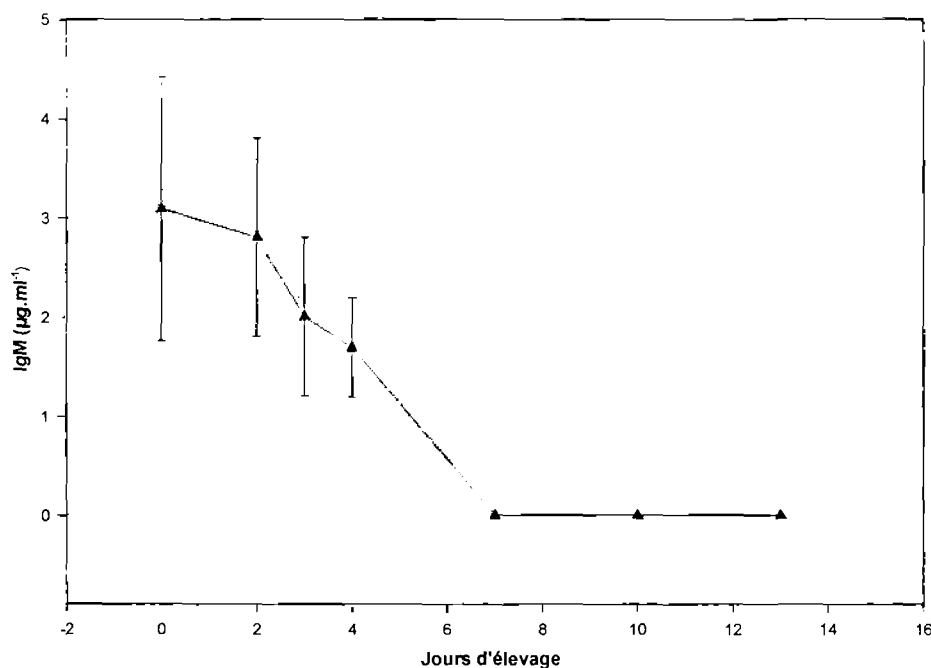
Ce type de dosage ELISA permet ainsi de détecter de faibles quantités d'immunoglobulines dans le sérum ($1,2 \text{ ng.ml}^{-1}$). Une sensibilité voisine (5 ng.ml^{-1}) a également été obtenue pour le dosage des immunoglobulines dans le sérum avec un test ELISA basé sur l'utilisation d'un anticorps polyclonal (Nagae et coll., 1993).

2.3.2. Etude du transfert des Immunoglobulines dans le vitellus

A partir de quatre élevages expérimentaux effectués à partir d'œufs issus de pontes différentes, nous avons dosé par ELISA les immunoglobulines présentes dans les œufs et dans les larves au cours des 13 premiers jours d'élevage.

Les moyennes observées sur ces quatre élevages différents sont regroupées dans la figure 12. Pour chaque moyenne l'intervalle de confiance au seuil de 95% a été calculé.

Figure 12 : Variation du taux d'immunoglobulines dans les œufs et les larves du bar observées dans quatre élevage différents



Des immunoglobulines sont détectées ($3.09 \pm 1.33 \mu\text{g.ml}^{-1}$) dans les œufs fécondés juste avant l'éclosion, c'est à dire au jour 0. Cette teneur diminue progressivement jusqu'au 4^{ème} jour d'élevage et aucune IgM ne peut être détectée entre le 6^{ème} et le 12^{ème} jour d'élevage.

La diminution progressive de la teneur en immunoglobuline pourrait correspondre à l'utilisation et au catabolisme naturel de cette protéine. En effet, la demi-vie des immunoglobulines chez les poissons est de 4 à 7 jours (Klesius, 1992). Cette diminution pourrait également être liée à l'utilisation des réserves vitellines par la larve (Takemura, 1993). Chez le bar, les immunoglobulines ne sont plus détectées dans les larves lorsque la vésicule vitelline est totalement résorbée ce qui se produit entre le 8^{ème} et le 10^{ème} jour d'élevage.

2.3.3. Rôle biologique des anticorps

Une activité anticorps a été mise en évidence dans les œufs de différentes espèces de poissons après immunisation ou vaccination des géniteurs: anticorps anti globules rouges de mouton chez la plie (Bly et coll., 1986); anticorps anti *Ichtyophthirius* chez le tilapia (Sin et coll., 1994); anticorps anti copépodes (*Caligus elongatus*) chez le saumon de l'Atlantique (Reily et Mulcahy 1993); anticorps anti IPN chez la truite (Shors et Winston, 1989), anticorps anti *Yersinia ruckerii* chez le saumon de l'Atlantique (Lillehaug et coll., 1996), anticorps anti *Aeromonas salmonicida* chez le « spotted char » (Kawahara et coll., 1993).

Ces anticorps sont également détectés dans les larves issues de géniteurs immunisés comme cela a été démontré chez le tilapia (Mor et Avtalion, 1990). En effet, des anticorps transmis par la mère préalablement immunisée avec différents antigènes (gamma globuline bovine, albumine porcine, albumine de chien) sont détectables chez les larves âgées de 0 à 9 jours

Cependant la possibilité, par l'intermédiaire de l'immunisation d'un reproducteur, de transmettre aux œufs et aux larves une protection contre un agent pathogène est encore controversée. Dans le cas de la Nécrose

hémorragique infectieuse (NHI) des Salmonidés, la présence d'anticorps neutralisants est corrélée avec la protection des larves soumises à une épreuve virulente (Shors et Winston, 1989). Par contre la vaccination de reproducteurs de saumons (*Salmo salar*) contre la yersiniose n'entraîne pas de protection contre cette maladie dans la descendance (Lillehaug et coll., 1996).

Les résultats de nos recherches, relatifs à la détection d'anticorps anti-nodavirus dans les œufs et les larves du bar après une vaccination expérimentale des reproducteurs femelles et la mise en évidence d'une protection chez les larves soumises à une épreuve virulente seront présentés dans le quatrième chapitre.

2.4. Isotypie et Allotypie

Différentes études indiquent que les Acm dirigés contre les IgM de poissons ont une très grande spécificité et ne reconnaissent qu'une faible proportion des immunoglobulines sériques. Ainsi, un Acm dirigé contre les IgM du poisson chat reconnaît 40 % des IgM sériques (Lobb et Clem, 1982). Différents Acm dirigés contre les IgM de la truite arc en ciel ont également des pourcentages de reconnaissance variables de 14,3 à 30.6 % (Sanchez et coll., 1989).

Ce pourcentage de reconnaissance est obtenu en comparant les résultats du dosage des IgM obtenus dans différentes configurations d'ELISA de type sandwich utilisant l'anticorps monoclonal (Acm) avec ceux obtenus avec un anticorps polyclonal (Acp) dont le pourcentage de reconnaissance est estimé à 100% (Lobb et Clem, 1982). Le schéma des différentes configurations des tests ELISA est présenté dans la Planche VII.

Pourcentage de reconnaissance des IgM sériques par l'Acm 6E11

Un même sérum (S370: sérum de contrôle utilisé comme standard de référence dans le dosage des IgM) provenant d'un bar de 300 g sain et non

immunisé a été dosé 14 fois selon les deux configurations retenues (Acp/Acp et Acp/Acm). Parallèlement, les IgM sériques et « vitellines » (présentes dans les œufs) de deux femelles de bars (A et B) ont été dosées (tableau II).

Tableau II : Pourcentages de reconnaissance de l'Acm (6E11) après dosage de différents sérums et d'extraits d'œufs de bar selon deux configurations.

Configuration de l'ELISA	Acp/Acp	Acp/Acm	Pourcentage de reconnaissance de l'Acm (%)
S370	19,6±3,9	11,07±1,8	56,4± 1,9
Sérum A	20,6± 5,3	13,6± 0,9	66,6±15,9
œuf A	22,2± 2,7	3,4± 1,5	15,3±7,1
Sérum B	18,8± 4,1	11,9± 0,2	63,3± 11,1
œuf B	13,5± 1,8	1,1± 0,7	8,1± 1,1

Pour chaque dosage (Acp/Acp et Acp/Acm), les résultats donnés par les deux configurations sont significativement différents ($P < 0,05$ selon le test t de Fisher et Yates) et permettent le calcul du pourcentage de reconnaissance des immunoglobulines par l'Acm 6E11.

Dans le cas des IgM du sérum de référence, ce pourcentage est proche de 57 % ($56,4 \pm 1,9$).

Dans le cas des immunoglobulines « vitellines », ce pourcentage est significativement différent de celui du sérum de la femelle correspondante (15,3 % pour les œufs de la femelle A et 8,1 % pour ceux de la femelle B). Chaque femelle ayant les deux types d'immunoglobulines, sériques et « vitellines », la variation importante du pourcentage de reconnaissance correspond à la mise en évidence d'une isotypie des immunoglobulines (*terme utilisé pour définir la variation génétique d'une famille de protéine; chaque membre de l'espèce possède chaque isotype de la famille représenté dans son génome: Roitt et coll., 1989*)

2.4. Conclusion

2.4.1. Les immunoglobulines et leur activité anticorps

Des immunoglobulines de forme tétramériques de 850 kD ont été isolées dans le sérum de bar par chromatographie et contrôlées par électrophorèses. Les sous bandes apparues après électrophorèse en PAGE-SDS de l'IgM pourraient correspondre à des demi monomères (associations d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère liées entre elles par des pont di-sulfures) associés à d'autre fragments par des liaisons non covalentes. La rupture, par le SDS, de ces liaisons non covalentes aboutirait à la formation de sous unités de type (μ -L). Un certain nombre d'associations de types non covalentes ont également été décrite dans le cas des IgM d'autres poissons: le «sheepshead» *Archosargus probatocephalus* (Lobb et Clem, 1981); le « chum salmon» *Onchorhynchus keta* (Kobayashi et coll., 1982), le « toad fish» *Spheroides glaber* (Warr, 1983) et le poisson chat *Ictalurus punctatus* (Lobb et Clem, 1983). Ce mode d'association ne serait, cependant, pas caractéristique des IgM de Téléostéens. En effet une à deux liaisons di-sulfures (covalentes) étant généralement mises en évidence entre les deux chaînes lourdes composant un monomère, les IgM sont alors résistantes à la dissociation en absence de conditions réductrices (Warr, 1982; Vilain et coll., 1984; Pilström et Petersson, 1991).

Des chaînes H d'immunoglobulines sont mises en évidence dans les œufs du bar par dosage ELISA et immunotransfert. L'analyse des chromatogrammes d'extraits d'œufs indique qu'il n'y a pas de forme tétramérique d'immunoglobulines dans les extraits; mais que des formes plus simples (probablement monomériques) de poids moléculaire voisin de 200 à 300 kD sont présentes. L'électrophorèse en PAGE-SDS révèle en outre l'existence d'une fraction d'environ 370 kD dans les extraits d'œufs.

Ces immunoglobulines sont localisées à la périphérie de l'œuf, dans la partie interne située sous la membrane du chorion comme l'indiquent les observations de coupes œufs marquées avec l'Acm 6E11 et observées en épifluorescence. Une localisation identique des immunoglobulines « vitellines » a également été mise en évidence chez le poisson chat (Hayman et Loob, 1993) et le saumon (Olsen et Press, 1997). Un test ELISA de type sandwich permet la détection d'une faible quantité ($3,09 \mu\text{g.ml}^{-1}$) d'immunoglobuline dans les extraits solubles d'œufs de bar. Il est probable qu'une partie relativement importante de ces immunoglobulines soit restée adhérente au chorion lors du broyage des œufs et que cette partie ait donc été éliminée de la préparation des extraits solubles d'œufs.

Les immunoglobulines sériques (IgM) ont un rôle biologique de type anticorps comme cela est démontré après immunisation expérimentale des bars avec un antigène (TNP-LPS). Il en serait de même pour les immunoglobulines « vitellines » car une activité anticorps anti-nitrophénol a également été détectée dans les œufs issus d'un reproducteur immunisé (Pépin, comm. pers.).

Ces résultats préliminaires permettent d'envisager l'existence d'une transmission passive de l'immunité spécifique sous la forme d'anticorps présents dans les œufs issus d'une femelle préalablement immunisée, avec la possibilité d'une protection des premiers stades larvaires contre un agent pathogène. Dans le cas de la pathologie à nodavirus, l'étude de cette transmission passive sera abordée dans la quatrième partie de notre étude.

2.4.2. Evolution de la teneur en immunoglobuline au cours de la croissance

Une augmentation considérable du taux d'IgM sérique est constatée au cours de la croissance du bar lorsque le poids moyen passe de 5 à 200 g. Cet accroissement semble de nature physiologique chez le poisson et lié à son développement. En l'absence de preuves scientifiques permettant d'expliquer

la nature de ce phénomène biologique, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses:

Une première tentative d'explication pourrait directement être liée à l'ontogénèse du système immunitaire, chez le bar, si l'on considère que ce système se met progressivement en place au cours des 2 à 3 premières années. Une telle explication sera discutée plus longuement dans la partie consacrée à l'ontogénèse du système immunitaire (Chapitre III, p 111).

Une seconde explication pourrait être liée à la structure et au rôle que jouent les immunoglobulines M chez les poissons. En effet, la commutation de classe des immunoglobulines (IgM/IgG) permettant la mise en place d'une mémoire immunologique chez les vertébrés supérieurs n'existe pas chez les vertébrés inférieurs que sont les poissons. En conséquence, les poissons réagiraient à un contact antigénique par la prolifération des clones cellulaires sensibilisés à l'antigène, alors que les vertébrés supérieurs réagiraient en sélectionnant des clones capables de prolifération accrue et pouvant synthétiser des IgG (Kaattari, 1994).

Chez les poissons, une stimulation antigénique induirait donc un « pool » important de cellules réactives produisant des IgM. Compte tenu de la faible spécificité des IgM par rapport aux IgG, il est également envisageable que ces cellules (cellules productrices d'IgM) puissent poursuivre leur synthèse d'IgM même **après l'arrêt de la stimulation antigénique initiale** en étant stimulées par des antigènes voisins. Le poisson, « immergé » dans un milieu liquide riche en antigènes variés, aurait donc un système stimulé en permanence permettant ainsi une synthèse continue d'IgM et une accumulation d'immunoglobulines sériques.

2.4.3. Les immunoglobulines et leurs dosages

Les immunoglobulines sériques sont dosées par ELISA sandwich au moyen de deux anticorps monoclonaux, cependant cette configuration ne donnant pas de bons résultats pour le dosage des immunoglobulines « vitellines », nous avons dû recourir à une configuration mixte (Acp/Acm) au

moyen d'un anticorps capteur polyclonal de lapin et d'un anticorps traceur monoclonal de souris .

Selon Harlow et Lane (1988), plusieurs explications seraient envisageables pour expliquer ce résultat car l'ELISA de type sandwich (IEMA) permet d'étudier parfois la structure protéique de l'antigène.

Une première explication serait liée à la **forme multivalente** de l'antigène. La configuration Acm/Acm utilisant le même anticorps (Acm) comme capteur et comme traceur, ne permet pas la détection des antigènes monovalents et cette configuration est donc réservée aux antigènes multivalents. Ce type d'ELISA peut donc être employé sans restriction pour le dosage des IgM tétramériques présentes dans le sérum du bar et plus difficilement pour les formes monomériques (et donc divalentes) présentes dans les œufs.

Dans ce dernier cas, la mauvaise détection selon une configuration Acm/Acm ne permet pas d'affirmer la présence d'une forme monovalente de l'antigène mais peut être liée à un positionnement défavorable des épitopes, ou à un masquage des épitopes par encombrement stérique. L'utilisation d'un test ELISA mixte Acp/Acm est donc parfaitement indiqué pour la recherche des formes divalentes monomériques d'immunoglobulines (immunoglobulines « vitellines »).

Une seconde explication résiderait dans l'**affinité** de l'anticorps monoclonal utilisé comme traceur dans un test ELISA sandwich. Nous savons ainsi, que l'Acm 6E11 utilisé présente une faible affinité. Celle ci, étudiée par Biacore (Thèse Bourmaud, 1994), révèle une valeur faible de la constante d'association inférieure à $10^7.M^{-1}$ pour l'IgM. Ce paramètre est directement lié à l'Acm utilisé et ne peut être modifié qu'en utilisant des anticorps polyclonaux (Acp).

Enfin, une troisième explication prendrait en compte la spécificité de l'anticorps utilisé comme traceur (Acm 6E11). Nous avons signalé (Chapitre II, p 54) que le pourcentage de reconnaissance des immunoglobulines sériques

et « vitellines » par l'Acm était différent et permettait d'envisager l'existence d'une isotypie des immunoglobulines chez le bar.

Indépendamment de cette observation, une isotypie pourrait également rendre délicat l'interprétation de certains dosages totaux d'IgM sériques chez cette espèce. Nous essaierons de discuter l'existence de cette possibilité dans le chapitre IV relatif à l'étude de la pathologie à nodavirus.

**CHAPITRE III: LES ORGANES ET LES CELLULES
PRODUCTRICES D'IMMUNOGLOBULINES.
ONTOGENÈSE.**

CHAPITRE III: LES ORGANES ET LES CELLULES PRODUCTRICES D'IMMUNOGLOBULINES. ONTOGENÈSE.

3.1. Les Organes lymphoïdes

3.1.1. Etat des connaissances

Une première étude en microscopie photonique des différents éléments figurés du sang du bar a mis en évidence la présence d'une population leucocytaire comprenant des cellules de type lymphoïde sous la forme de petites cellules rondes d'environ 4 à 10 μm de diamètre, dont le noyau arrondi occupe la presque totalité du cytoplasme (Romestand et Trilles, 1984). L'observation de frottis sanguins colorés au May-Grünwald Giemsa montre que le cytoplasme des cellules lymphoïdes est légèrement basophile et qu'il présente de nombreux pseudopodes. Les lymphocytes sanguins ont une morphologie voisine de celle des plaquettes sanguines (thrombocytes) avec lesquels ils peuvent parfois être confondus par un observateur peu attentif. L'étude quantitative des populations sanguines révèle que les leucocytes représentent 3% de la population sanguine totale (Quentel et Obach, 1990). L'étude ultrastructurale des lymphocytes sanguins n'a pas été effectuée chez le bar mais, chez la carpe (Cenini, 1984), la daurade (Lopez-Ruiz et coll., 1992; Meseguer et coll., 1994a) et le mulot (Lanfranchi et Fabiani, 1995).

Le support anatomique du système immunitaire des Téléostéens est représenté par les organes lymphoïdes que sont le thymus, le rein, et la rate, ainsi que par quelques cellules lymphoïdes éparses dans la paroi du tube digestif et dans les branchies, et qui ne constituent pas un organe à part entière (Richard et Roberts, 1979; Hart et coll., 1988; Charlemagne, 1990). Chez les poissons, le système lymphatique est aussi bien développé que chez les Vertébrés supérieurs mais présente une différence majeure représentée par l'absence de toute structure rappelant les nœuds lymphatiques.

Le rein des Téléostéens est un organe mixte à base d'éléments hématopoïétiques, réticulo-endothéliaux et excréteurs. Chez toutes les espèces de poisson, le rein présente une différence de structure et de fonction entre la partie antérieure (pronéphros) de type hématopoïétique et leucopoïétique (Meseguer et coll., 1991) et la partie plus postérieure (mésonéphros) assurant la fonction excrétrice (Richard et Roberts, 1989).

Le thymus est présent chez tous les vertébrés à l'exception des Agnathes représentés par les Cyclostomes actuels que sont les lamproies et myxines (Chilmonczyk, 1992; Du Pasquier, 1993). Chez les Chondrichthyens (poissons cartilagineux) et les Osteichthyens (poissons osseux), le thymus est bien développé et localisé dans la cavité branchiale (Grace et Manning, 1980; Zapata, 1981 et 1983; Fange, 1982; Chilmonczick, 1983 et 1992). Cette localisation « superficielle » du thymus des poissons diffère de celle des vertébrés supérieurs mammifères chez qui le thymus est intériorisé.

3.1.2. Matériels et méthodes.

Etude histologique

Les échantillons ont été fixés au liquide de Bouin, puis déshydratés par trois bains d'alcool successifs (50, 70 et alcool pur) avant d'être inclus dans la paraffine (Annexe VII). Des coupes d'organes (6 à 8 μm d'épaisseur) ont été réalisées avec un microtome (Leitz) et déposées sur lames avant d'être colorées par différentes colorations topographiques (Gabe, 1968). Le protocole des différentes colorations employées (trichrome de Masson, Eosinate d'Azur, Trichrome en un temps) est mentionné dans l'annexe VII.

Etude structurale

les échantillons après une double fixation avec une solution de glutaraldéhyde (2%) et au tétr oxyde d'osmium (OsO_4 1%) ont été déshydratés à l'alcool puis inclus dans de la résine époxy (annexe VII). Des coupes semi-fines réalisées avec un ultramicrotome sont déposées et colorées sur lame par

une solution de bleu de toluidine. L'observation des coupes semi-fines est réalisée avec un microscope photonique (Olympus).

Ultrastructure (Annexe VII)

Les échantillons sont préparés comme pour la réalisation de coupes semi-fines. Les coupes ultra-fines sont alors réalisées et étalées sur des grilles pour microscopie électronique. Les coupes déposées sur les grilles sont alors contrastées par une solution d'acétate d'uranyle en présence de citrate de plomb selon la technique décrite par Reynolds (Reynolds, 1963).

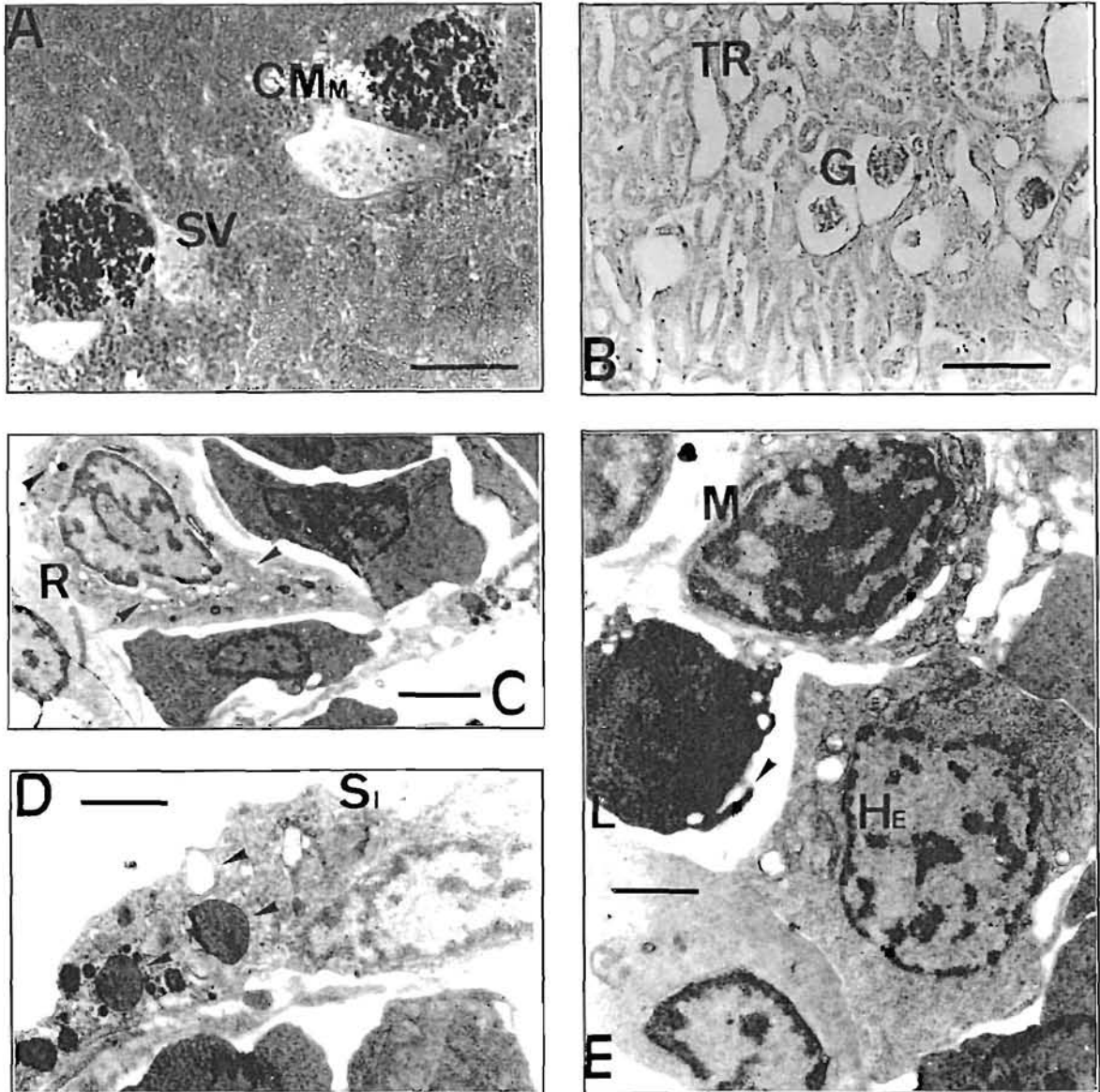
3.1.3. Topographie des organes lymphoïdes (Planches XI à XIII)

Pronéphros (Planche XI).

Le rein du loup est situé sous la face ventrale de la colonne vertébrale, et au dessus de la vessie natatoire. Bien qu'il soit constitué embryologiquement à partir d'une structure paire (Chapitre III, p.77), il se présente, chez l'adulte, sous la forme d'une masse unique rouge foncé, entourée d'une capsule conjonctive et doublée d'une couche de cellules pigmentaires.

L'**étude histologique** (Planche XI, Figures A et B) met en évidence deux zones d'organisation différentes. Une partie antérieure riche en tissu hématopoïétique, fortement vascularisé (Planche XI, Figure A); et une partie postérieure formée essentiellement de glomérules (G) et de tubules rénaux (Tr), (Planche XI, Figure B). Une particularité du rein des Téléostéens est la présence de cellules phagocytaires pigmentées appelées mélanomacrophages regroupées en centres mélanomacrophagiques (CMm). Ces CMm (Planche XI, Figure A) sont souvent associés à des formations vasculaires constituées de sinus veineux (Sv). Ces différentes structures sont soutenues par un réseau de fibres de collagène, qui s'entremêlent aux éléments réticulaires du stroma hématopoïétique.

Planche XI: structure et ultrastructure du rein du bar



A: Pronéphros. Centres mélanomacrophagiques (CMm) à proximité de sinus veineux (SV). (Barre=100µm).

B: Mésonéphros. Tubules rénaux (TR) et glomérules (G). Barre=100 µm..

C: Ultrastructure du pronéphros. Cellule réticulaire (R) avec de nombreuses vésicules intracytoplasmiques (flèches). Barre= 2µm.

D: cellule sinusoire (Si) de la paroi endothéliale. Noter les vésicules et les inclusions denses dans le cytoplasme (flèches). Barre = 2 µm.

E: Ultrastructure du pronéphros. Monocyte (M), hémoblaste (He) et lymphocyte (L). Noter la présence de pseudopodes cytoplasmiques (flèche). Barre = 1 µm.

L'observation au **microscope électronique** (Planche XI, Figures: C, D et E) du pronéphros du bar permet de distinguer les différentes populations cellulaires qui constituent le stroma hématopoïétique.

L'élément de base correspond à une **cellule réticulaire** (Re) dont le contour irrégulier est dû à la présence de prolongements cytoplasmiques (Planche XI, Figure C). Le noyau est peu dense aux électrons et ne contient qu'une faible quantité de chromatine condensée bordant principalement la membrane nucléaire interne. Des vésicules et des vacuoles claires sont visibles dans le cytoplasme.

En ce qui concerne la vascularisation (Planche XI, Figure D), un intérêt particulier doit être porté à la paroi des sinus veineux (Meseguer et coll., 1991; Imagawa et coll., 1990) qui est constituée d'un endothélium composé de **cellules sinusoides** (Si) ayant une activité phagocytaire (Planche XI, Figure D): le réticulum endoplasmique lisse est très développé et forme des petites des vésicules. Des petites structures tubulaires, des granules ainsi que des corps denses sont parfois observées dans le cytoplasme de ces cellules qui ont une organisation ultrastructurale comparable à celle des cellules réticulaires (Re) décrites précédemment (Planche XI, Figure C).

Au sein du tissu hématopoïétique (Planche XI, Figure E), différentes populations cellulaires caractéristiques de la lignée leucocytaire sont observées. Les **monocytes** (Mo) sont abondants, reconnaissables par un noyau ovale plus ou moins dense aux électrons et un cytoplasme riche en vésicules claires. Les **lymphocytes** (L) sont des petites cellules sombres d'environ 3 à 4 µm de diamètre, dont le contour cytoplasmique est irrégulier du fait de la présence de pseudopodes. Le noyau est de forme arrondie et occupe la presque totalité de la cellule; le cytoplasme est peu abondant et présente des mitochondries et des ribosomes. Ces cellules sont souvent isolées dans le tissu hématopoïétique ou associées en petits groupes.

La proportion des différentes sous-populations cellulaires appartenant à la lignée blanche a été étudiée dans le rein de la carpe (Cenéni, 1984; Temmink et Bayne, 1987; Imagawa et coll., 1990). Dans le pronéphros de la carpe, cette population est constituée en grande majorité de granulocytes neutrophiles et basophiles, alors que les lymphocytes ne représentent que

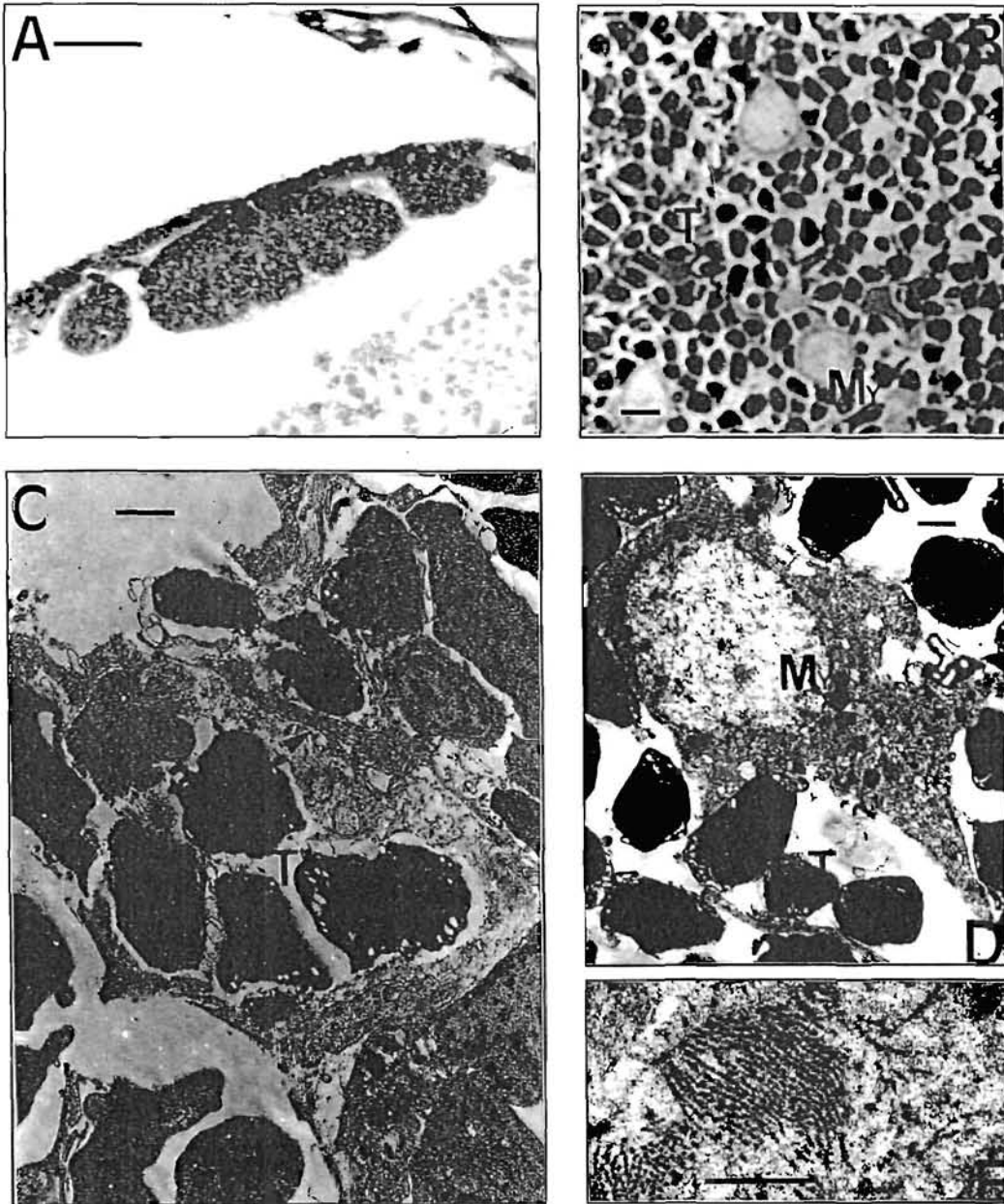
15 % de la population et que les autres types cellulaires, en particulier les plasmocytes, ne représentent qu'une proportion inférieure à 5%. Dans le pronéphros du bar, les granulocytes basophiles sont relativement peu abondants (Romestand et Trilles, 1984). **L'observation de ces sous-populations dans le pronéphros des poissons souligne le rôle leucopoïétique et immunologique majeur de cet organe.**

En ce qui concerne la fonction hématopoïétique du rein du bar, des cellules peu différenciées ou **hémoblastes** (He) sont souvent observées, caractérisées par un gros noyau central riche en euchromatine, montrant parfois un nucléole. Le cytoplasme est riche en ribosomes et contient quelques cisternes de réticulum endoplasmique rugueux et plusieurs mitochondries. Lors d'une étude cytologique, Romestand et Trilles (1984) rapportent que l'ensemble des cellules constituant la lignée érythrocytaire est observée dans le pronéphros du bar. Cette lignée est constituée de pro-érythroblastes, d'érythroblastes basophiles, polychromatophiles et acidophiles, de pro-érythrocytes et d'érythrocytes nucléés. Dans le pronéphros, ces cellules sont associées à un grand nombre de monocytes et de macrophages (Esteban et coll., 1989; Meseguer et coll., 1990) et noyées dans un stroma présentant un haut potentiel phagocytaire lié aux cellules réticulaires phagocytaires. **Une telle organisation, associée à une vascularisation importante de l'organe, permet la destruction des cellules hématopoïétiques sénescents.**

Thymus (Planche XII).

Le thymus du bar est un organe pair situé dans la région dorso-latérale de la cavité branchiale et visible sous le tégument en soulevant l'opercule et en réclinant les branchies. **L'aspect macroscopique** est celui d'une masse blanche légèrement nacréée souvent plurilobée (Planche XII, Figure A) qui présente un épaissement du tissu conjonctif chez les animaux âgés (géniteurs de 5 à 6 ans).

Planche XII : structure et ultrastructure du thymus du bar



A: lobules thymiques chez un alevin. Barre = 100 μ m.

B: Thymus d'un bar de 200 g. Nombreux thymocytes (T) avec quelques cellules myoïdes (My) à noyau clair. Barre = 5 μ m.

C: Ultrastructure du thymus. Thymocytes (T) et réseau de fibrilles (Flèches). Barre = 1 μ m.

D: cellules myoïdes (My) du thymus entourée de nombreux thymocytes (T). Barre = 1 μ m.

E: Réseau de fibrilles. Barre = 1 μ m.

Sur les **coupes histologiques** on observe que le thymus est en contact étroit avec l'épithélium de la cavité branchiale et qu'il est entouré d'une capsule de tissu conjonctif qui projette des trabécules fibreuses au sein du parenchyme thymique (Planche XII, Figures C et E). L'observation de coupes **semi-fines** révèle que le parenchyme thymique est constitué d'un grand nombre de cellules lymphoïdes sombres ou thymocytes (T) qui forment un ensemble homogène (Planche XII, Figures B, C et D) parsemé de quelques cellules à noyau plus clair (Planche XII, Figure B).

Le thymus du bar ne présente pas de régions bien organisées correspondant au cortex et à la médulla observées dans le thymus des vertébrés plus évolués comme le xénope (Du Pasquier et coll., 1990) ou chez les mammifères (Kendall, 1981). Bien que certains auteurs aient signalé l'existence d'une zone périphérique, d'apparence sombre, riche en amas de petits lymphocytes et, une zone interne plus claire, caractérisée par l'expansion de cellules épithéliales réticulaires chez la carpe adulte (Botham et Manning, 1981) et chez la baudroie (Fänge et Pulsford, 1985), il semble qu'une telle distinction ne soit pas observée dans le thymus de la plupart des poissons étudiés (Zapata, 1981 et 1983; Fänge, 1982; Fänge et Pulsford, 1985; Chilmonczick, 1992).

Une autre particularité du thymus des poissons est l'absence de corpuscule de Hassall. Des structures analogues observées lors d'études histologiques du thymus des poissons (Ellsaesser et coll., 1988; Sailendri et coll., 1975) correspondraient vraisemblablement à des coupes de trabécules conjonctifs qui rayonnent au sein du parenchyme thymique (Chilmonczik, 1992).

L'observation au **microscope électronique** (Planche XII, Figures C, D et E) indique que les thymocytes (T) sont des lymphocytes de 2 à 3 μm de diamètre, dont le noyau remplit presque toute la cellule. Des cellules à noyau très perméable aux électrons (correspondants aux cellules à noyau clair visibles sur la Figure B) et dont le cytoplasme est riche en myofibrilles (Planche XII, Figure E) sont souvent observées et correspondent à des cellules réticulaires épithélioïdes et à des cellules myoïdes (Planche XII, Figure D). Ces différentes populations cellulaires (lymphocytes, cellules réticulaires

épithéliales, cellules myoïdes, macrophages...) sont également observées dans le thymus de différentes espèces de poissons (Chilmonczyk, 1992).

Chez l'ensemble des poissons, dont le bar, le thymus n'est séparé de la cavité branchiale que par une seule couche de cellules épithéliales et la vascularisation de l'organe s'effectue par la pénétration des vaisseaux sanguins au niveau des travées conjonctives avec la formation d'un réseau de capillaires entourés de cellules épithéliales, ce qui suggère l'existence d'une barrière entre le thymus et le sang. Cette séparation ne semble pas absolue, puisque des lymphocytes capables de synthétiser des immunoglobulines (plasmocytes et cellules IgM⁺) ont été observés dans le thymus de différents poissons comme la baudroie (Fänge et Pulsford, 1985), le gardon (Zapata, 1981) ou même le bar (chapitre III, p. 85).

Rate (Planche XIII)

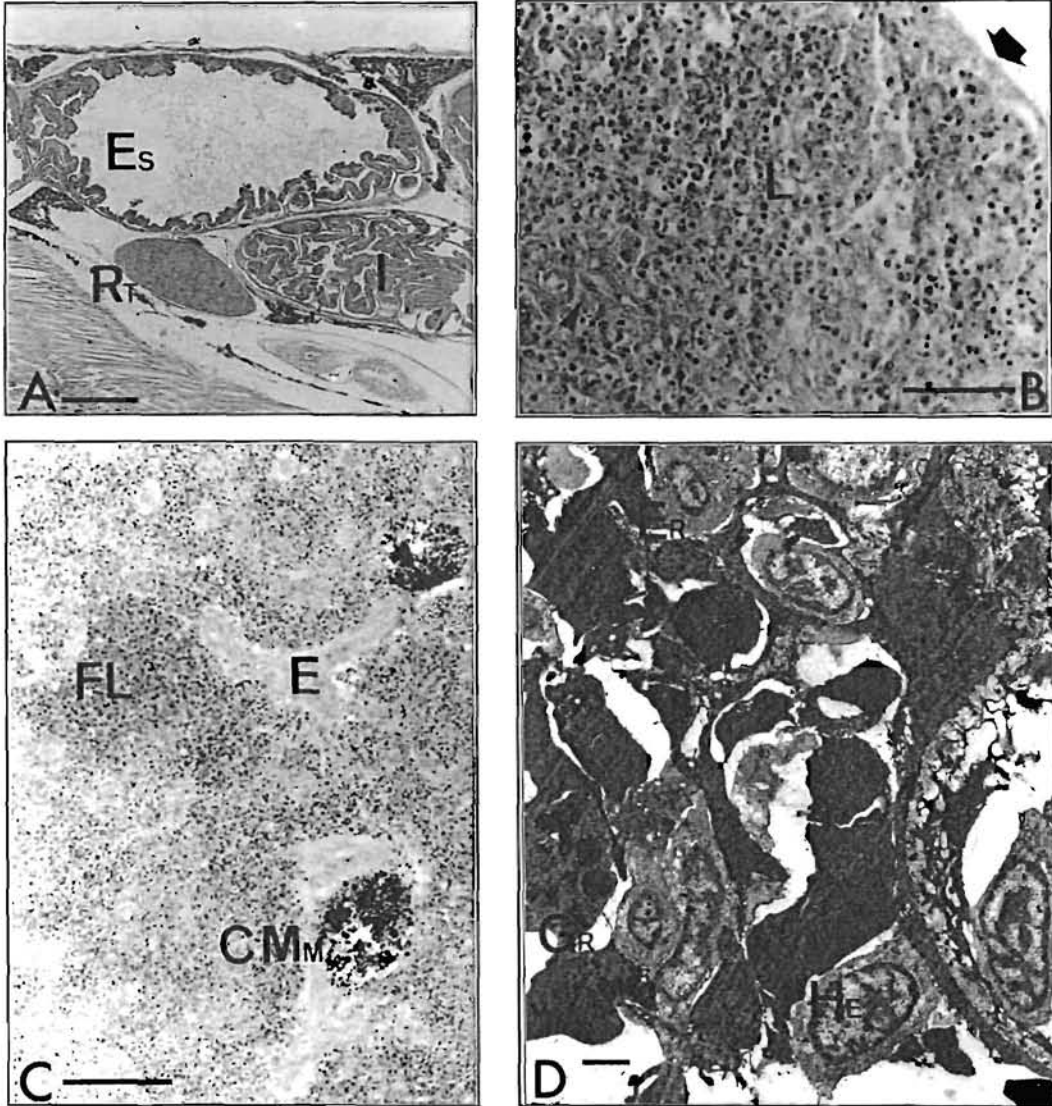
Chez le bar adulte, la rate (RT) est située dans la cavité générale, près de la grande courbure de l'estomac (Es) sous la flexion de l'intestin (I). Elle se présente sous la forme d'un organe simple rouge sombre aux bords bien définis (Planche XIII, Figure A).

Des coupes histologiques montrent que la rate est entourée d'une capsule fibreuse sans trabécules internes (Planche XIII, Figure C), et qu'elle est constituée de trois éléments majeurs (Planche XIII, Figure A): la pulpe, les ellipsoïdes et les centres mélano-macrophagiques (CMm).

- La pulpe présente un aspect hétérogène avec la présence de foyers lymphocytaires (Planche XIII, Figure B). Un grossissement supérieur permet d'observer de nombreuses fibres réticulaires entremêlées dans le tissu hématopoïétique (Planche XIII, Figure C). L'observation au microscope électronique (Planche XIII, Figure D) souligne l'hétérogénéité de structure de cet organe et permet d'observer différents types cellulaires : érythrocytes (Er), hémoblastes (He), granulocytes (Gr) et lymphocytes (L).

- Les ellipsoïdes (EI) sont des filtres capillaires qui correspondent à la fin de la division des artérioles spléniques (Planche XIII, Figure B).

Planche XIII : structure et ultrastructure de la rate du bar



A: Rate (RT) *in situ* logée près de l'estomac (Es) et de l'anse intestinale (I). Barre = 250 μm .

B: Rate montrant la capsule fibreuse (flèche), de nombreux lymphocytes (L) et des fibres réticulaires (flèches). Barre = 100 μm .

C: Coupe de rate. Centre mélanomacrophagique (CMm), foyer de cellules lymphocytaires (FL), ellipsoïde (E) entouré d'un manchon de fibres réticulaires. Barre = 100 μm .

D: Ultrastructure de la rate. Lymphocyte (L), érythrocyte (Er), hémoblaste (He) et granulocyte (Gr). Barre = 2 μm .

Ces formations facilitent la capture des antigènes en ralentissant le débit de la circulation sanguine (Ellis 1980, Secombes et Manning, 1980). L'endothélium de ces capillaires est fin, doublé d'un tissu réticulaire fibreux et de macrophages (Quesada et coll., 1994).

- Les centres mélano-macrophagiques (CMm) (Planche XIII, Figure A) sont comparables à ceux observés dans le pronéphros (Planche XI, Figure A) même s'ils sont moins nombreux dans la rate que dans le rein.

La rate des Téléostéens contient tous les éléments de base de la rate des vertébrés, avec toutefois l'absence de travées conjonctives. La distinction entre pulpe blanche lymphoïde et pulpe rouge myéloïde (Lamers et De Haas, 1985) n'est cependant pas possible chez le bar.

Élément lymphoïdes du tube digestif et des branchies

L'observation de lymphocytes dans la *lamina propria* et l'épithélium du tube digestif (Dorin et coll., 1993) associée à la description de cellules macrophagiques dans des exsudats péritonéaux (Meseguer et coll., 1993), conforte l'hypothèse de l'existence d'un tissu lymphoïde périphérique du tube digestif des poissons (Hart et coll., 1988), dénommé « Gut associated lymphoid tissue » (GALT), par analogie avec les observations réalisées chez les oiseaux (Bienenstock, 1975; Firth, 1977) ou chez l'homme (Gebbers et Laissue, 1989). L'existence, au niveau branchial (BALT: « Bronchus associated Lymphoid Tissue), d'un système similaire chez les poissons est encore controversée.

Conclusion

Les organes lymphoïdes du bar (thymus, pronéphros et rate) sont semblables à ceux de nombreux poissons Téléostéens et montrent ainsi qu'il existe une unité structurale, même si des différences mineures sont parfois constatées au niveau macroscopique.

Le thymus est le seul organe lymphoïde dont la structure permet d'isoler les lymphocytes du milieu extérieur ou du sang. Cette particularité structurale

implique *a priori* que le thymus joue un rôle comme organe lymphoïde primaire dans le développement de l'ontogénèse du système immunitaire.

Par opposition, le rein et la rate présentent une structure favorable aux échanges entre le lymphocyte et le milieu sanguin et ces deux organes représentent le site majeur de l'érythropoïèse chez les poissons.

- Dans le cas de la rate, c'est le seul organe lymphoïde des poissons qui présente une homologie de structure avec les nœuds lymphatiques des mammifères (Richard et Roberts, 1979). Cette homologie est basée sur la richesse en tissu lymphoïde et sur la présence de cellules sécrétrices d'immunoglobulines (Chapitre III, Planche XIX, p. 99).

Dans le cas du rein, cet organe n'est plus considéré comme un homologue des nœuds lymphatiques depuis que Zapata (1979) a émis l'hypothèse qu'il soit l'équivalent de la moelle osseuse des mammifères et des oiseaux. Cette hypothèse a été initialement basée sur l'importance de la vascularisation du pronéphros, sur l'absence de vaisseaux lymphatiques et sur l'observation de cellules réticulaires (Zapata, 1979; Press et coll., 1994) de même type que celles observées dans la bourse de Fabricius des oiseaux (Frazier, 1974). Depuis lors, la mise en évidence de cellules souches IgM⁺ dans le pronéphros au cours de l'ontogénèse (Chapitre III, p 137) est venu corroborer le rôle primordial de cet organe dans l'ontogénèse du système immunitaire.

Nous avons, par ailleurs, signalé la présence de mélanomacrophages libres ou organisés en centres mélanomacrophagiques (CMm) dans le rein et la rate du bar. Des cellules macrophagiques peuvent également être observées dans d'autres organes, comme le foie, de nombreux Téléostéens (Zapata, 1983). La forme libre (mélanomacrophage) est reconnue comme étant apparentée aux stades les plus primitifs des poissons tels que la lamproie ou les Elasmobranches tandis que les formes encapsulées et hautement organisés (CMm) correspondraient à un stade plus évolué tel que les Téléostéens (Meseguer et coll., 1993 et 1994). Les pigments de ces cellules phagocytaires sont constitués de mélanine, d'hémosidérine et de lipofuschine ainsi que de nombreux débris cellulaires. Ces caractéristiques tendraient à

prouver que les mélanomacrophages sont impliqués dans le métabolisme du fer et notamment dans celui de l'hémoglobine mais également dans le catabolisme tissulaire (Meseguer et coll., 1994).

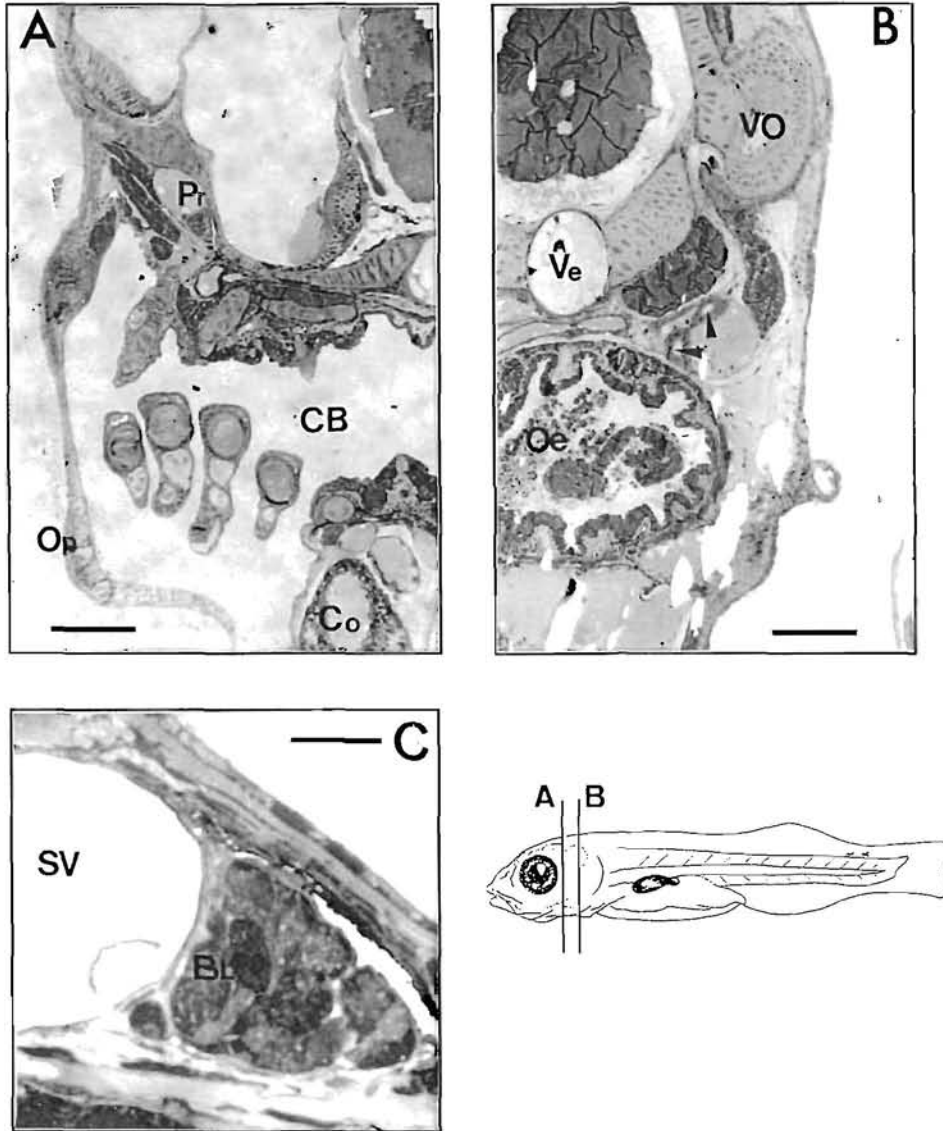
3.1.4. Organogenèse des organes lymphoïdes (Planches XIV à XVIII)

Etat des connaissances.

Chez la truite arc en ciel, les premières cellules lymphocytaires apparaissent très tôt au cours de la première semaine de développement embryonnaire et sont localisées dans le rein (Grace et Manning, 1980). La colonisation des autres organes lymphoïdes s'effectue plus ou moins rapidement, du 3^{ème} au 8^{ème} jour chez la carpe (Botham et Manning 1981; Secombes et coll., 1983) et jusqu'au 29^{ème} jour chez la daurade (Josefsson et Tatner 1993). **Le rein jouerait-il un rôle primordial dans la dissémination des cellules souches de la lignée lymphopoiétique ?**

Ces observations, étayées par la mise en évidence, dans le tissu rénal des poissons, de toute la lignée hématopoïétique (Ellis 1977) ont conduit certains auteurs (Zapata, 1979) à proposer que le rein des téléostéens soit l'homologue de la moelle osseuse des mammifères dans l'ontogenèse du système immunitaire. Ainsi, chez la daurade, les premières cellules lymphoïdes apparaissent dans le rein dès l'éclosion puis dans la rate entre le 5^{ème} et le 12^{ème} jour et enfin dans le thymus au 29^{ème} jour (Josefson et Tatner, 1993). Cependant, chez d'autres espèces (*Seriola quinqueradiata*, *Pagrus major*, *Paralichtys olivaceus*: Chantanachookhin et coll., 1991; *Scophthalmus maximus* : Padros et Crespo, 1996) le thymus est le premier organe qui présente une structure lymphoïde au cours de l'embryogenèse suivi par le rein et la rate. Ainsi, ces observations contradictoires ont pu alimenter une discussion portant sur l'origine rénale ou thymique des cellules souches. (Abelli et coll., 1996; Padros et Crespo, 1996).

Planche XIV : Coupes semi fines de larves de bar âgées de 15 jours



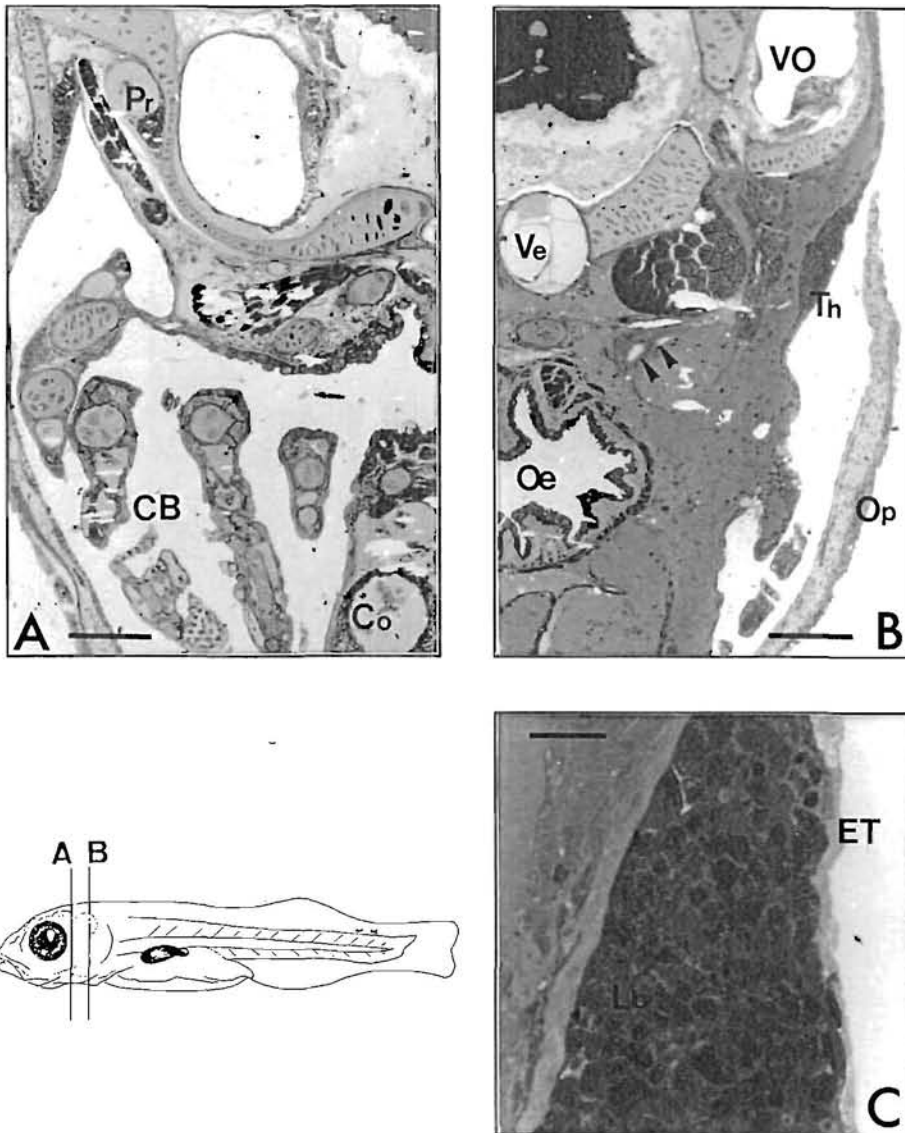
A et B : coupes au niveau des sections A et B.

Cavité branchiale (CB), coeur (Co), oesophage (Oe), operculum (Op), pronéphros (Pr), corps vertébral (Ve), vésicule otique (VO), tubules rénaux (flèches). Barre = 100 µm.

C : Pronéphros.

Cellule blastique (BI) et sinus veineux (SV). Barre = 10 µm.

Planche XV : Coupes semi fines de larves de bar âgées de 20 jours



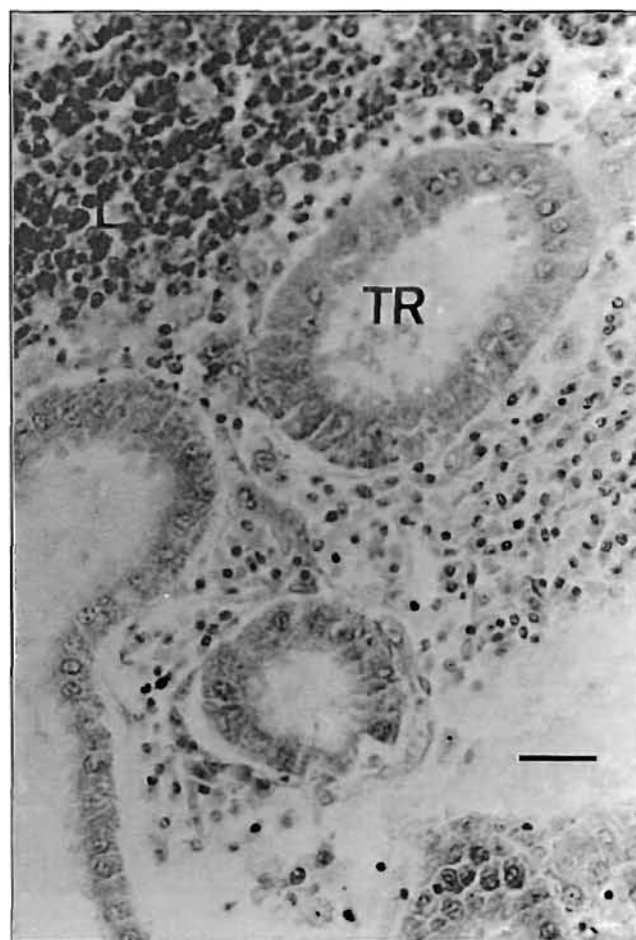
A et B : coupes au niveau des sections A et B.

Cavité branchiale (CB), coeur (Co), corps vertébral (Ve), vésicule otique (VO, oesophage (Oe), pronéphros (Pr), opercule (Op), thymus (Th), tubules rénaux (flèches). Barre = 100 μ m.

C : Thymus.

Thymus séparé de la cavité branchiale par un simple épithélium .
Epithélium thymique (ET), lymphoblastes (Lb). Barre = 10 μ m.

Planche XVI : Coupe de pronéphros de larve de bar âgée de 35 jours



Coupe histologique (Obj. x40) de rein antérieur. De nombreux lymphocytes (flèches) sont visibles dans le tissu rénal à proximité des tubules (TR). Barre = 25 μ m.

Rein (Planches XIV, XV et XVI).

Le rein est visible très tôt (vers le 10^{ème} jour) au cours du développement larvaire sous la forme d'un simple tubule rénal situé de part et d'autre de la colonne vertébrale chez le bar.

Vers le 15^{ème} jour, quelques cellules blastiques (Bc) de la lignée érythropoïétique localisées près d'un sinus veineux (Sv) sont visibles de part et d'autre du crâne (Planche XIV Figure A et C) en région céphalique.

En coupe plus postérieure (Planche XIV Figure B), le rein est alors constitué d'un double tubule rénal (Tr) à proximité d'un grand sinus veineux (Sv) avec des cellules de la lignée érythropoïétique (Bc). Cette masse cellulaire est accolée à la boîte crânienne. Une structure plus complexe s'organise progressivement et quelques cellules lymphoïdes sont visibles vers le 20^{ème} jour dans la partie du rein située en région céphalique postérieure (Planche XV, Figure B) à proximité du thymus (Th).

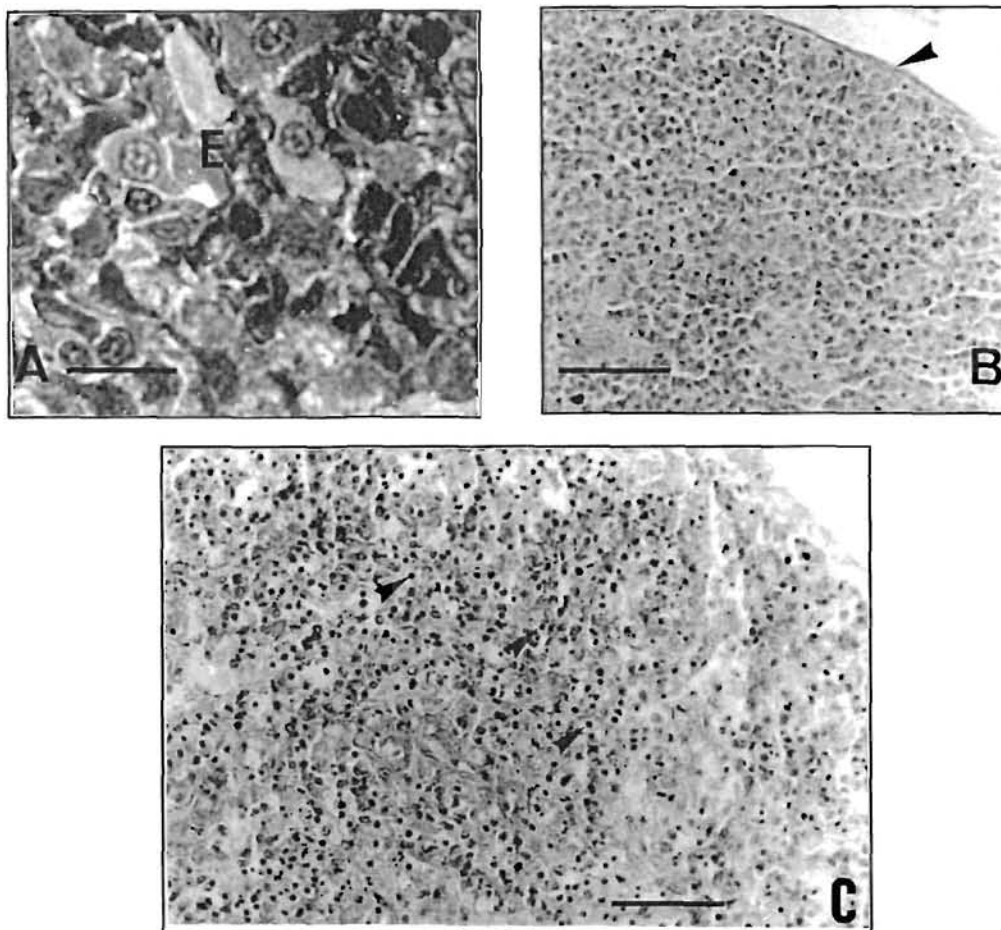
Au 35^{ème} jour, le rein est comparable à celui de l'alevin (Planche XVI): de nombreuses cellules lymphoïdes sont visibles dans le parenchyme rénal.

D'autres études effectuées chez le bar montrent des résultats comparables. Ainsi, le rein apparaît, au 10^{ème} jour, sous la forme d'un simple tubule rénal (Abelli et coll., 1996). Quelques cellules lymphoïdes apparaissent vers le 20^{ème} jour dans le parenchyme rénal puis forment des amas lymphoïdes localisés près des centres mélano-macrophagiques. La vascularisation du tissu lymphoïde se produit tardivement. Elle est clairement visible vers le 8^{ème} mois (Abelli et coll., 1996).

Thymus (Planche XV, Figure B).

Le thymus (Th) est visible dès le 20^{ème} jour sous la forme d'un double amas de cellules situées dans la partie supérieure de la cavité branchiale à la jonction de l'opercule (Op). A l'intérieur de ces amas de nombreux lymphoblastes (Ly) puis lymphocytes (L) sont observés. Le thymus se développe plus tardivement (vers le 27^{ème} jour), quand les larves sont élevées à une température plus froide, voisine de 16°C (Abelli et coll., 1996).

Planche XVII : structure de la rate au cours de la croissance de la larve du bar entre le 28^{ème} et le 54^{ème} jour.



A: Rate d'une larve de 28 jours (Obj. x100). Cellules de la lignée érythrocytaire (E).
Barre = 100 μ m.

B: Rate d'une larve de 43 jours (Obj. x40). structure érythropoïétique de la rate qui est entourée d'une capsule (flèche). Barre = 50 μ m.

C: Rate d'une larve de 54 jours (Obj. x40). Des lymphocytes (flèches) sont visibles.
Barre = 50 μ m.

Vers le 40^{ème} jour, le thymus de la larve présente les mêmes caractéristiques histologiques que celles observées chez l'alevin. Ces résultats sont comparables à ceux observés par O'Neill (1989).

L'organogenèse de cet organe a également été étudiée chez d'autres espèces. comme les salmonidés (Fange, 1982), la daurade (Josefson et Tatner, 1993), la sériole et le pagre (Chantanachookhin et coll., 1991).

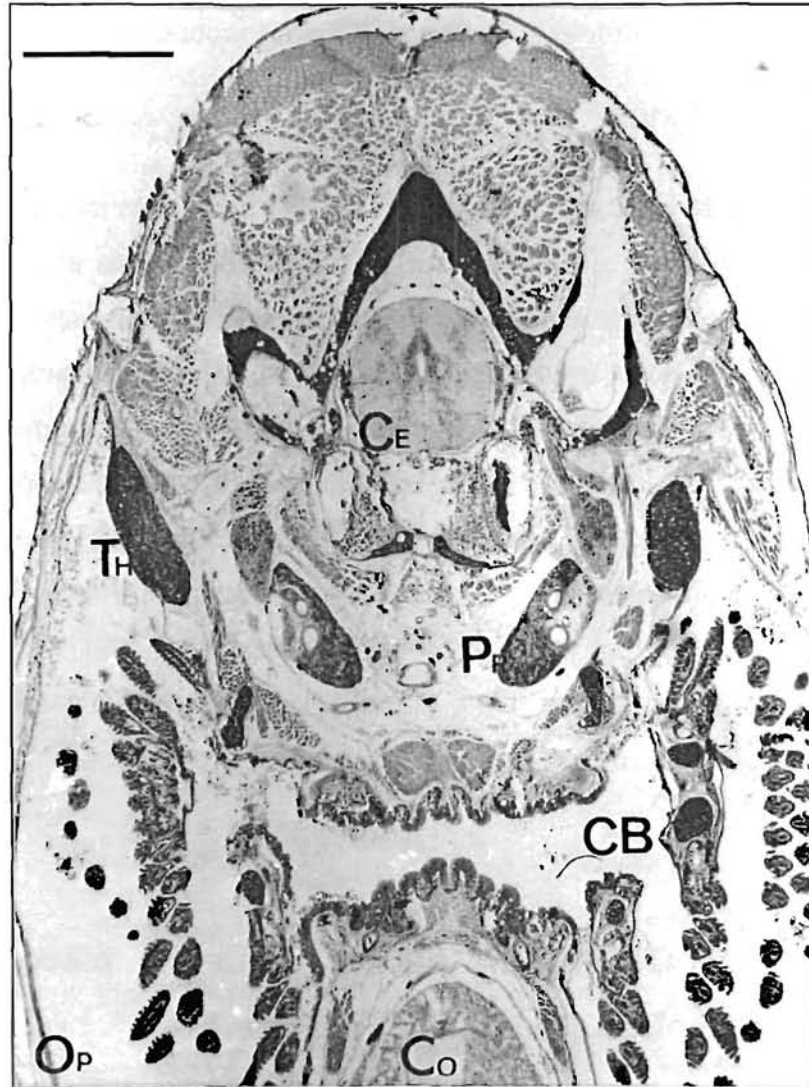
Rate (Planche XVII)

Chez la larve de 17 jours, la rate est un simple sac situé à proximité de la portion antérieure dorsale du tube digestif (Quesada et coll., 1994). Vers le 20^{ème} jour des sinus veineux viennent irriguer l'organe qui se présente alors sous la forme d'un amas de cellules de la lignée hématopoïétique avec de nombreux érythrocytes (Abelli et coll., 1996). La structure lymphopoïétique apparaît assez tardivement. Quelques cellules lymphoïdes sont visibles dans le parenchyme splénique vers le 54^{ème} jour (Quesada et coll., 1994), puis deviennent progressivement plus nombreuses et forment quelques amas de cellules lymphoïdes vers le 59^{ème} jour (Abelli et coll., 1996). Les centres mélano-macrophagiques (CMm) localisés autour des vaisseaux sanguins de la rate n'apparaissent que tardivement chez les poissons d'un an (Quesada et coll., 1994).

3.1.5. Conclusion sur la mise en place des organes lymphoïdes (Planche XVIII)

Chez le bar, les différents organes lymphoïdes, le rein, la rate puis le thymus se mettent successivement en place au cours du développement larvaire. Cependant le développement d'une structure lymphoïde dans les organes ne suit pas directement l'organogenèse puisque des cellules lymphoïdes sont localisées tout d'abord dans le thymus (21^{ème} jour), puis dans le rein (35^{ème} jour), et enfin dans la rate (54^{ème} jour). Les principaux organes lymphoïdes du bar sont donc en place vers le 55^{ème} jour d'élevage larvaire.

Planche XVIII: Coupe transversale de la région céphalique d'un alevin de bar âgé de 54 jours



Coupe transversale (Obj. x4) au niveau de la cavité branchiale (CB).
Barre = 0,5 mm.

Cavité branchiale (CB),cerveau (CE), coeur (Co), opercule (OP), pronephros (PR),
thymus (TH).

L'ensemble de nos observations correspond à celles effectuées par différents auteurs (Quesada et coll., 1994; Abelli et coll., 1996) qui ont étudié l'ontogenèse des organes lymphoïdes du bar. Une température d'élevage plus basse peut ralentir le développement des organes lymphoïdes, sans toutefois en modifier la séquence d'apparition (Abelli et coll., 1996).

Ainsi, l'ontogenèse des organes lymphoïdes du bar est similaire à celle des poissons dont le thymus se développe très tôt au cours du développement larvaire (*Seriola quinqueradiata*, *Pagrus major*, *Paralichthys olivaceus*: Chantanachookhin et coll., 1991; *Sebasticus marmoratus*: Nakanishi et coll., 1991; *Scophthalmus maximus*: Padros et Crespo, 1996). Chez ces espèces, le thymus est le premier organe qui présente une structure lymphoïde au cours de l'embryogenèse suivi par le rein et la rate.

Nos résultats confortent également l'hypothèse d'un développement séquentiel des organes lymphoïdes dont le rein représente l'organe primaire d'où seraient issues les cellules souches de la lignée lymphocytaire (Secombes et coll., 1983; Razquin et coll., 1990; Kaattari, 1992; Koumans Van-Diepen et coll., 1994). Il semble maintenant bien établi que le rein soit à l'origine du développement de ces cellules souches, même chez les espèces dont le thymus apparaît très tôt au cours de l'ontogenèse puisque, des cellules souches provenant de la région céphalique du rein antérieur et venant coloniser le thymus embryonnaire auraient été observées chez le turbot (Padros et Crespo, 1996). Cependant l'existence de cellules souches venant de cette région reste encore hypothétique.

3.2. Les cellules lymphoïdes.

3.2.1. Etats des connaissances

L'existence de différentes populations lymphocytaires similaires à celles observées chez les mammifères (lymphocytes B produisant des IgM et lymphocytes T « helper » de coopération cellulaire) est établie depuis

longtemps chez les poissons. Les preuves scientifiques résident, d'une part, dans l'observation *in vivo* d'une répartition hétérogène des lymphocytes synthétisant des IgM (cellules IgM+) dans les différents organes (rein et rate principalement, thymus exceptionnellement), et, d'autre part, dans la mise en évidence *in vitro* de phénomène de coopération cellulaire après stimulation avec différents type d'antigènes (antigènes T dépendant et T-indépendant) (Miller et Clem, 1984; Marsden et Secombes, 1993; Marsden et coll., 1995). Cependant, chez les poissons, les preuves directes de l'isolement, de la caractérisation antigénique des lymphocytes T et de l'existence de sous populations lymphocytaires sont encore à apporter.

L'étude de la répartition lymphocytaire a été rendue possible grâce aux marqueurs spécifiques que sont les anticorps monoclonaux. Parmi les différents marqueurs employés, les anticorps monoclonaux dirigés contre les IgM sont les plus utilisés et permettent le marquage des cellules productrices d'immunoglobulines (cellules IgM⁺) souvent appelées cellules B par analogie avec les lymphocytes B des mammifères. Quelques espèces comme les salmonidés (De Lucas et coll., 1983), le poisson chat (Miller et coll., 1985) et la carpe (Van Diepen et coll., 1991), ont ainsi bénéficié de ce type d'étude.

La production d'anticorps monoclonaux que nous avons développée au laboratoire, dans le cadre de la thèse de Mlle Bourmaud, nous permet d'envisager ce type d'étude chez le bar. Les marqueurs que nous avons utilisés sont soit des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre les IgM du bar (Romestand et coll., 1995), soit des immunoglobulines purifiées (IgG) de lapin dirigées contre les IgM ou contre les cellules thymiques du bar. Ces différents anticorps permettent d'envisager le marquage des populations cellulaires B et T chez cette espèce.

Cette étude se situe également dans le prolongement logique de l'étude de l'organogénèse des éléments lymphoïdes que nous avons entreprise. Après une phase de colonisation des organes lymphoïdes par des cellules souches succéderait une phase de maturation de ces dernières qui se transforment en cellules productrices d'IgM. Elles peuvent ainsi, être mises en évidence, par des techniques histo-immunoenzymatiques au moyen des Acm dirigés contre les immunoglobulines du bar.

Nous avons étudié l'efficacité de différentes techniques de marquages des cellules prélevées dans les différents organes d'individus de 50 à 300g afin de définir et d'optimiser une technique de marquage permettant l'étude de l'apparition des cellules IgM⁺ au cours de l'ontogenèse du système immunitaire chez les larves.

3.2.2. Matériels et méthodes

Localisation des cellules : techniques microscopiques

Les séparations et les types cellulaires.

Les cellules peuvent être marquées sur lames (empreintes et coupes d'organes: Annexe IX) ou en suspension (tubes employés pour la cytométrie de flux).

Les empreintes d'organes sont réalisées en écrasant un échantillon d'organe (rein, rate ou thymus) sur des lames histologiques. La lame est séchée à l'air libre pendant 5 minutes puis, les cellules sont fixées en recouvrant les lames par de l'acétone pendant 5 minutes. Dans le cas du sang des frottis sont réalisés.

Les coupes en congélation sont effectuées sur du matériel (larves ou tissus) préalablement inclus dans de l'agarose à 2,5%) et congelé à -20°C. Les coupes de 10 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat (HM 505E Microm) réfrigéré à -14°C. Les lames (coupes ou empreintes d'organes) sont conservées à -20°C. Quelques coupes histologiques ont également été effectuées sur du matériel fixé au liquide de Davidson, déshydraté à l'alcool et au butanol, puis inclus dans la paraffine.

- Suspensions lymphocytaires (Annexe XII).

Les organes lymphoïdes ou les larves sont dilacérés dans du tampon PBS hépariné à 10 UI.ml⁻¹ (Mulero et coll., 1994) puis les tissus sont dissociés à l'aide d'un homogénéiseur de tissus (Dounce). La suspension cellulaire est

déposée sur une solution de Ficoll $d=1,077$ (Du Pasquier et coll., 1972; LoPresto et coll., 1995) et les cellules lymphocytaires sont récupérées à l'interface après une centrifugation à 1600 g pendant 20 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée à $+4^{\circ}\text{C}$. Le lavage consiste à rincer les cellules avec du PBS contenant 0.5% d'albumine bovine, puis à sédimenter les cellules par une centrifugation à 500g pendant 10 minutes. A l'issue d'un triple lavage, les cellules sont remises en suspension dans 1 ml de PBS-BSA 0,5 % pour être comptées dans une cellule de Malassez. La suspension cellulaire est alors diluée pour disposer de 1 à 3.10^5 cellules dans 100 μl pour chaque tube.

Les lymphocytes sont alors utilisés immédiatement pour l'étude en cytométrie de flux après un marquage effectué directement dans le tube de cytométrie. Pour l'étude en microscopie (Annexe XI), les lymphocytes sont déposés sur lames de verre, séchés, fixés par l'acétone et congelés à -20°C .

Les types de marquage et la localisation des cellules :

Les différents anticorps (Acm et Acp) peuvent être utilisés pour effectuer un marquage direct ou indirect des cellules.

Dans la technique de **marquage indirect**, les cellules sont marquées avec un anticorps monoclonal de souris ou polyclonal de lapin anti -IgM de bar. La présence de cet anticorps est révélée par un second anticorps (lapin ou chèvre) dirigé contre les immunoglobulines de souris ou de lapin. Ce second anticorps peut être conjugué à la peroxydase (Annexe X) ou marqué à la fluorescéine (Annexe XI). La lecture de la fluorescence (FITC) s'effectue directement par observation au microscope équipé pour l'épifluorescence (Microscope Olympus) ou par mesure de la fluorescence en cytométrie de flux (Beckton-Dickinson). La présence de (POD) est révélée par l'addition d'un substrat chromogène, l'aminoéthyl carbazole (AEC), qui se colore alors en rouge en présence de l'enzyme et permet d'observer les cellules en microscopie classique.

Le marquage indirect présente l'avantage de pouvoir être exécuté avec différents type d'anticorps qu'ils soient purifiés ou non tels que des anticorps

polyclonaux de lapin ou de souris dirigés contre les cellules B ou les cellules T. Les inconvénients de cette technique résident dans la présence d'interférences dues aux réactions non spécifiques pouvant se produire entre les différents anticorps utilisés et le substrat. De nombreux lavages sont alors nécessaires entre chaque étape et, ces derniers sont toujours difficilement supportés par les coupes histologiques.

Dans la technique de **marquage direct** (Annexe XI), l'anticorps est purifié, il s'agit d'une IgG de souris (dans le cas de l'anticorps monoclonal anti IgM de bar), puis directement couplé à un fluorochrome (Fluorescéine FITC).

L'observation du marquage est réalisée directement après un triple rinçage. Un marquage avec un anticorps monoclonal (anticorps anti IgG de souris conjugué FITC Sigma) également couplé à la fluorescéine permet de déterminer la fluorescence non spécifique des cellules (témoin-FITC).

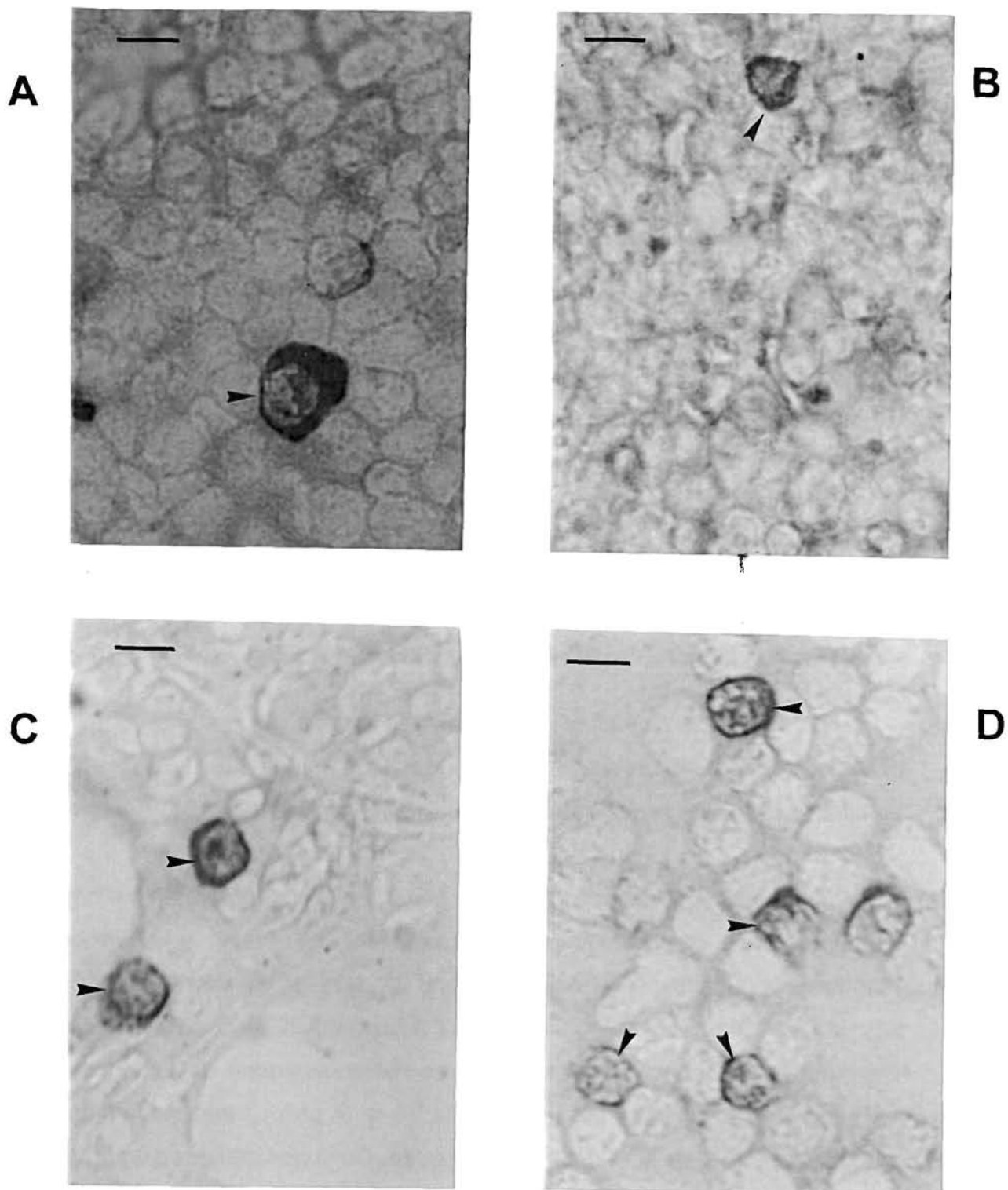
résultats

- Identification des cellules sur empreintes d'organes (Planche XIX)

Le marquage de cellules sur lames nous permet de confirmer la spécificité de la réaction immunologique et d'identifier le ou les types cellulaires réagissant avec l'anticorps anti-IgM (Acm 6E11).

Un marquage indirect POD-AEC effectué sur des empreintes d'organes lymphoïdes de bar en cours de grossissement révèle la présence de nombreuses cellules réactionnelles dans le rein et la rate (Planche XIX, Figures A et B) par opposition au thymus (Planche XIX, Figure C). Les cellules marquées présentent les caractéristiques morphologiques de lymphocytes à savoir : cellules rondes de petite taille (4 à 6 μm), grand noyau arrondi, cytoplasme peu abondant sans pseudopodes. Quelques cellules très fortement réactionnelles avec un cytoplasme plus abondant sont parfois observées dans le rein ou la rate (Planche XIX, Figure D). Ces cellules pourraient correspondre à des cellules B matures décrites comme étant des plasmocytes (Imagawa et coll., 1991).

Planche XIX: Mise en évidence de cellules IgM+ dans le rein, (A et D), la rate (B) et le thymus (C) du bar par marquage indirect (technique POD/AEC) avec l'Acm 6E11. Barre = 5 μ m.



Le marquage de suspensions lymphocytaires déposées sur lames histologiques permet, en outre, de déterminer la concentration optimale d'anticorps, de vérifier la spécificité de la réaction immunologique par inhibition avec de l'IgM en solution et d'effectuer une première analyse quantitative du nombre de lymphocytes réactifs (IgM⁺) dans le sang et le rein antérieur du bar au cours de son développement.

- Concentration optimale de l'anticorps

La concentration optimale en Acm (Acm 6E11) a été déterminée en effectuant un marquage indirect FITC (annexe XI) de lymphocytes déposés sur lames immunologiques avec différentes concentrations en anticorps. L'intensité de la fluorescence est observée en microscopie.

Tableau V : Optimisation de la dilution de l'anticorps par immunofluorescence indirecte.

Acm 6E11 (titre de la dilution)	6E11 ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)	Intensité de la fluorescence
10	140	±
50	70	+
100	14	++
500	7	++
1000	1.4	+++
5000	0.3	++
10000	0.14	±
50000	0.03	-

Ces tests préliminaires ont permis de noter que le signal (intensité de la fluorescence notée +++) est optimal avec une concentration d'anticorps de $1.4 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ correspondant à la dilution 1/1000. Un phénomène d'inhibition par excès d'anticorps (« *Hook effect* ») est observé quand l'anticorps est utilisé à une concentration trop élevée (70 et $140 \mu\text{g}.\text{m}^{-1}$).

- Spécificité de la réaction immunologique (Tableau VII).

La spécificité de la réaction immunologique a été contrôlée en inhibant la réaction avec de l'IgM purifiée. Pour cela, l'anticorps monoclonal 6E11 a été préincubé pendant 1 heure avec une solution contenant différentes concentrations d'IgM puis utilisé pour le marquage indirect de lymphocytes déposés sur lame immunologique. Les tests ont été réalisés avec une concentration optimale en Acm 6E11 de $1.4 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ correspondant à la dilution 1/1000.

Tableau VII : Test d'inhibition de l'Acm 6E11 par différentes concentrations en IgM

Q_{igm} (μg)	Fluorescence
0	+++
1	+++
5	±
10	-
166	-
450	-
1270	-

Q_{igm} = quantité d'IgM (μg) incubée pendant 1 h avec $1 \mu\text{g}$ d'Acm 6E11.

Il y a extinction du signal lorsque l'anticorps 6E11 est préincubé avec une solution d'IgM dix fois plus concentrée. Ainsi $10 \mu\text{g}$ d'IgM sont nécessaires pour inhiber la réactivité de $1 \mu\text{g}$ d'anticorps 6E11.

Quantification des cellules : techniques cytométriques

La Cytométrie en Flux est une méthode d'analyse rapide et précise pour déterminer, compter et caractériser des populations cellulaires (Morgan et coll., 1993). Cette technique, utilisée depuis longtemps en médecine humaine (Lanier, 1983), a été appliquée également chez les poissons pour mettre en évidence une répartition hétérogène des lymphocytes IgM⁺ dans les différents organes lymphoïdes (Allen, 1983; Ellsaesser et coll., 1985; Evans et coll., 1987; Bly et coll., 1990).

Isolement des populations lymphocytaires par analyse en cytométrie de flux (Planches XX et XXI).

- Isolement des populations lymphocytaires d'extraits totaux d'organes lymphoïdes par analyse en cytométrie de flux.

Les caractéristiques morphologiques des différentes populations cellulaires présentes dans les extraits totaux d'organes lymphoïdes du bar sont analysées avec un logiciel de cytométrie (WIN MDI).

Ce logiciel permet de différencier graphiquement les populations cellulaires en fonction de la taille (FSC) et de la granularité (SSC).

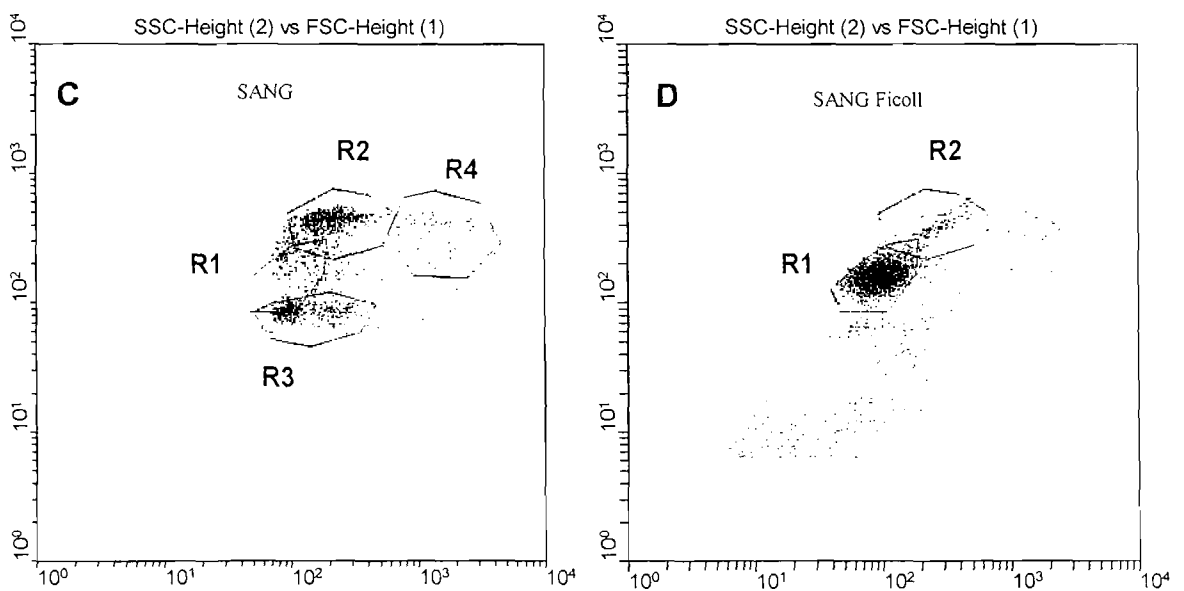
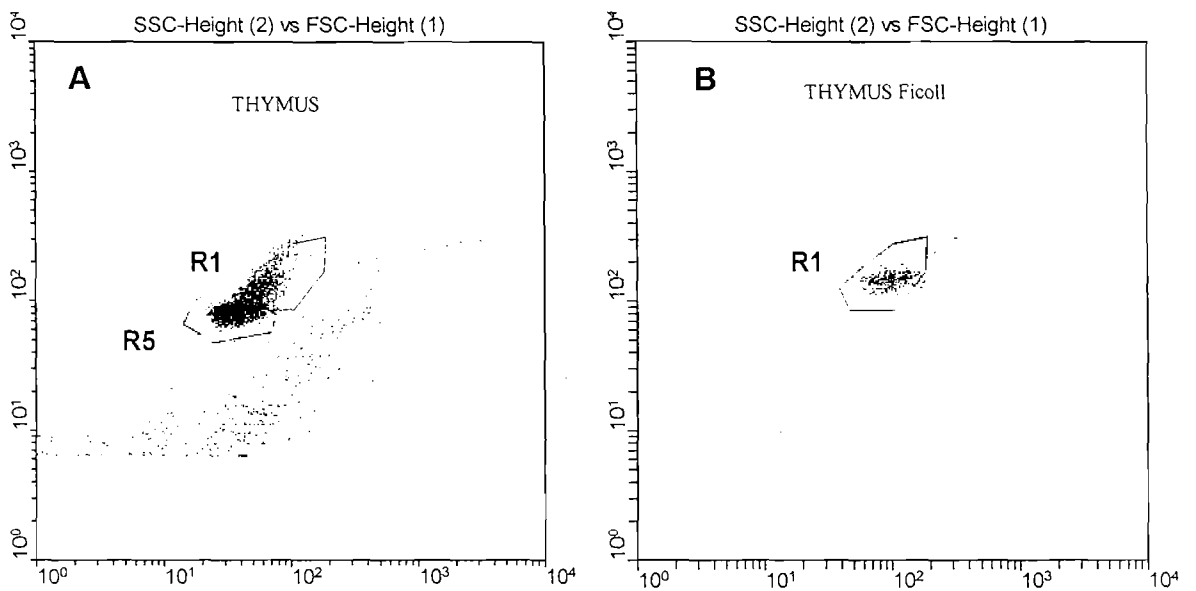
Thymus (Planche XX, Figure A)

la population cellulaire est assez homogène et permet de définir une fenêtre générale R1. Une observation plus attentive permet d'identifier une sous population R5 de taille légèrement inférieure au sein de la population R1.

Sang total (Planche XX, Figure C)

4 Populations cellulaires sont réparties inégalement (trois populations observées par Morgan et coll. 1993). La population R1 est identique à celle définie dans le thymus et regroupe donc les lymphocytes. La population R2 est représentée par une majorité de cellules de plus grande taille (FSC) mais de granularité voisine (SSC). Cette population R2 présente des caractéristiques morphologiques (FSC/SSC) proches de celles d'une population de type monocyttaire (Gilbertson et coll. 1986, Morgan et coll. 1993) et possède des propriétés d'adhérence (Verburg Van Kemenade et coll., 1994). La population R3 est composée de cellules de petite taille (FSC) peu granulaires (SSC) dont la couleur rouge peut être révélée par l'analyse de la fluorescence observée à la longueur d'onde de 680 nm (Gilbertson et coll., 1986), et correspondrait aux cellules de la lignée érythrocytaire. La population R4 est composée de grandes cellules fortement granuleuses dont les caractéristiques se rapprochent de la population de type granulocyte neutrophile observée chez la truite (Morgan et coll., 1993).

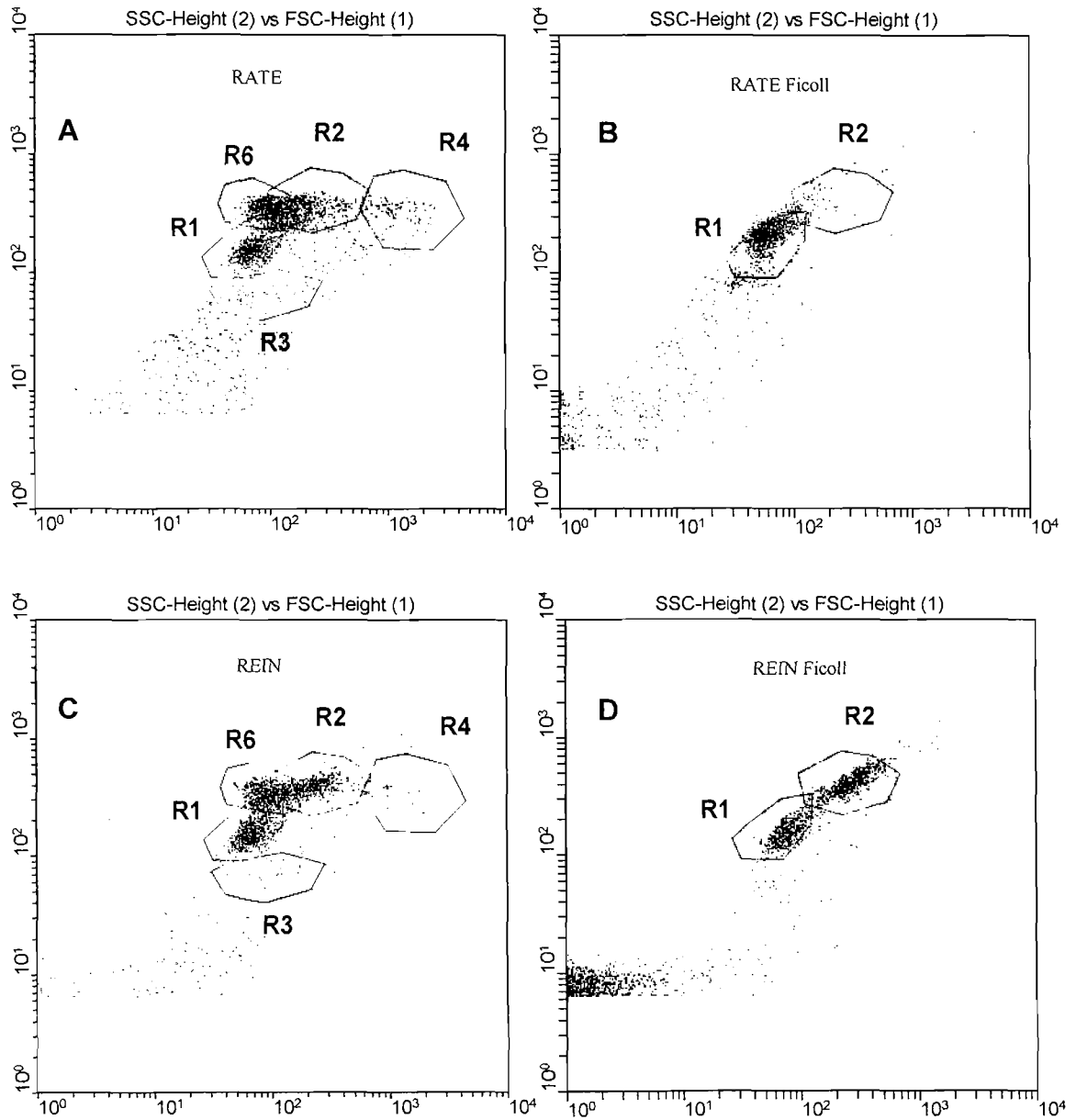
Planche XX: Diagrammes obtenus par cytométrie de flux sur un extrait de thymus et de sang de *D. labrax* avant et après centrifugation sur milieu de Ficoll.



Avant Ficoll

Après Ficoll

Planche XXI: Diagrammes obtenus par cytométrie de flux sur un extrait de rate et de rein de *D. labrax* avant et après centrifugation sur milieu de Ficoll.



Avant Ficoll

Après Ficoll

Rein et Rate (Planche XXI):

Cinq populations sont observées dans la rate (Planche XXI, Figure A) et le rein (Planche XXI, Figure C). Les quatre premières populations (R1 à R4) correspondent à celles observées dans le sang (Planche XX, Figure C) : les lymphocytes sont regroupés dans la population R1, les érythrocytes sont regroupés dans R3 et sont plus abondants dans la rate que dans le rein. Enfin, les granulocytes composent l'essentiel de la population R4. La population cellulaire R2 possède également des propriétés d'adhérence puisqu'une part importante de cette population est éliminée après contact avec de la fibre de laine de Nylon (Appleyard et coll., 1983; Klempau et Cooper 1983). Cette population R2 possède donc des caractéristiques propres à certaines cellules macrophagiques naturellement abondantes dans le rein et la rate (Verburg Van Kemenade et coll., 1994). La cinquième population est plus ou moins identifiable dans le rein et la rate. Elle regroupe une grande partie des cellules de la lignée érythrocytaire associées à des cellules spléniques ou rénales. Cette population est toujours plus abondante dans le rein et très difficilement séparable de la population lymphocytaire R1.

Une technique d'isolement des lymphocytes à partir de prélèvements des différents organes lymphoïdes a dû être réalisée et étudiée en vue d'une optimisation- Isolement des populations cellulaires par centrifugation sur Ficoll et analyse en cytométrie de flux (CMF).

La séparation des différents types cellulaires s'effectue par centrifugation sur des milieux de séparation dont la densité est appropriée. Le Percoll est le milieu le plus employé pour isoler les lymphocytes chez de nombreuses espèces de poissons (Waterstrat et coll., 1988; Rodriguez et coll., 1995) mais présente l'inconvénient d'être utilisé sous la forme de gradients de différentes densités devant être préparés extemporanément. Le milieu de Ficoll est d'un emploi plus aisé puisque les suspensions cellulaires sont déposées directement sur une solution de Ficoll, prête à l'emploi, dont la densité correspond à celle des lymphocytes sanguins humains. Ce milieu est

également utilisé pour séparer les lymphocytes chez les amphibiens (Du Pasquier et coll., 1972) et les poissons (Lo Presto et coll., 1995).

Les tissus sont dilacérés dans du tampon PBS hépariné et la suspension cellulaire est homogénéisée par broyage à l'aide d'un appareil de Douce. Les cellules sont alors déposées sur une solution de Ficoll et sont centrifugées à 1600 g pendant 20 minutes (Annexe IX).

-Thymus (Planche XX, Figure B).

La population cellulaire semble assez homogène et permet de définir une fenêtre assez large pour les lymphocytes (R1).

-Sang (Planche XX, Figure D).

La centrifugation sur Ficoll permet d'isoler les cellules lymphocytaires que l'on retrouve dans la population R1. Les autres populations cellulaires ont presque totalement disparu à l'exception de quelques cellules de type monocytaire provenant de R2.

-Rate (Planche XXI, Figure B).

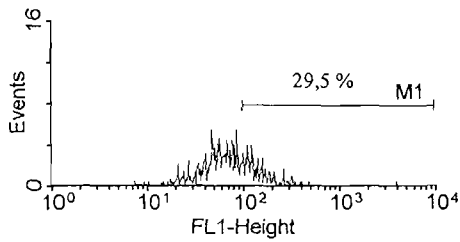
La séparation de la population lymphocytaire (R1) est assez satisfaisante même si quelques cellules provenant de R2 sont encore présentes.

-Rein (Planche XXI, Figure D).

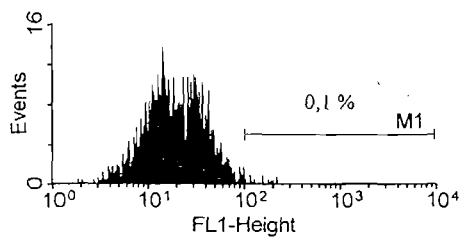
la centrifugation sur Ficoll ne permet pas de séparer totalement les différents types cellulaires. Dans le rein, une part importante de la population R2 vient s'ajouter à la population lymphocytaire R1.

L'utilisation du logiciel de cytométrie WIN MDI permet en outre de différencier les populations R1 et R2 et de mettre en évidence une caractéristique comme la phagocytose propre à la population R2 contenant des macrophages (Planche XXII).

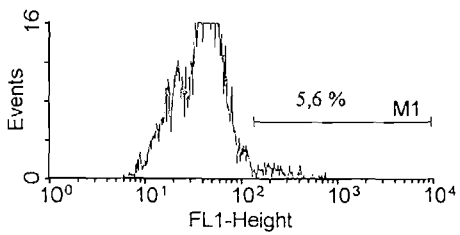
Planche XXII: Fluorescence non spécifique des populations R1 et R2 de la rate et du rein de *D. labrax* après marquage FITC avec un AcM anti-souris.



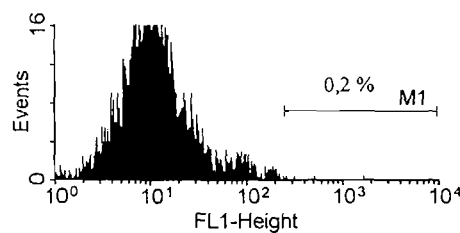
Fluorescence de la population R2 de la rate



Fluorescence de la population R1 de la rate



Fluorescence de la population R2 du rein



Fluorescence de la population R1 du rein

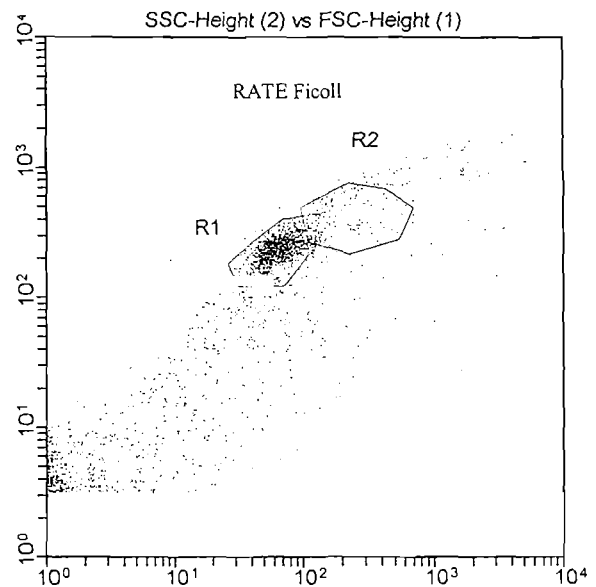


Diagramme en cytométrie de flux d'extrait de rate après centrifugation sur Ficoll

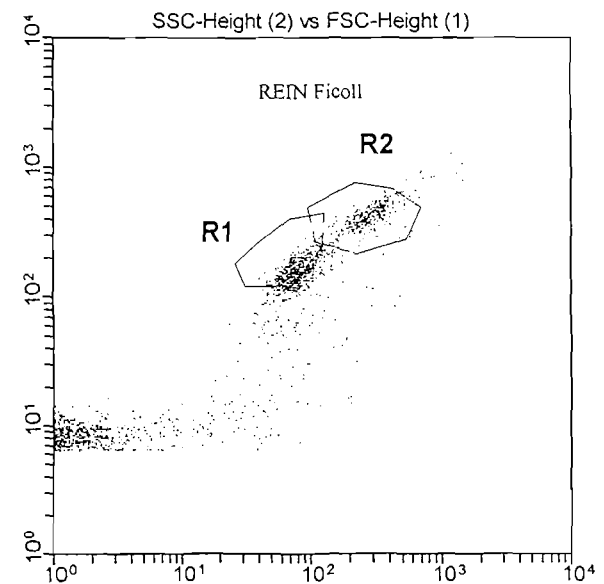


Diagramme en cytométrie de flux d'extrait de rein après centrifugation sur Ficoll

En effet, Les cellules R2 de la rate et du rein peuvent être marquées par un marqueur de fluorescence non spécifique tel que l'anticorps anti-IgG de souris conjugué à la fluorescéine (Annexe XIII) et le marquage (Planche XXII) de cette population dans la rate (29,5%) et le rein (5,6 %) est probablement dû à une phagocytose non spécifique du fluorochrome par la population R2.

En conclusion nous retiendrons, que la centrifugation sur Ficoll, complétée par l'analyse des caractéristiques morphologiques en cytométrie de flux permet d'isoler la population lymphocytaire présente dans les différents éléments du système lymphoïde du bar.

Optimisation des techniques de marquage utilisée en cytométrie de flux..

- 1/ Marquages indirects des populations B et T avec des anticorps polyclonaux (Planche XXIII, Annexe XIII).

Cette technique de marquage est souvent utilisée car les marqueurs sont très faciles à obtenir. Les résultats des marquages indirects des cellules B et T effectués sur les lymphocytes isolés des différents organes lymphoïdes ou sur des broyats totaux de sang, de thymus, de rate et de rein d'un bar de 250 g sont reportés respectivement dans les figures de la planche XXIII. Le pourcentage de cellules marquées peut être calculé par rapport au nombre total de cellules examinées (extrait total de l'organe) ou sur la population lymphocytaire (population R1) de cet organe.

Les pourcentages de cellules B et T mises en évidence dans le sang et le rein (Figure 13) sont sensiblement équivalents. Dans la rate, la population de cellules T (25,2%) est deux fois plus importante que la population de cellules B (9,6 %). Dans le thymus, la population lymphocytaire est presque totalement constituée de cellules T (96,8 %).

Planche XXIII: Marquage FITC indirect des cellules B et T du sang, du thymus, du rein et de la rate d'un bar de 130 g, avec des anticorps polyclonaux anti-cellules B et anti-cellules T.

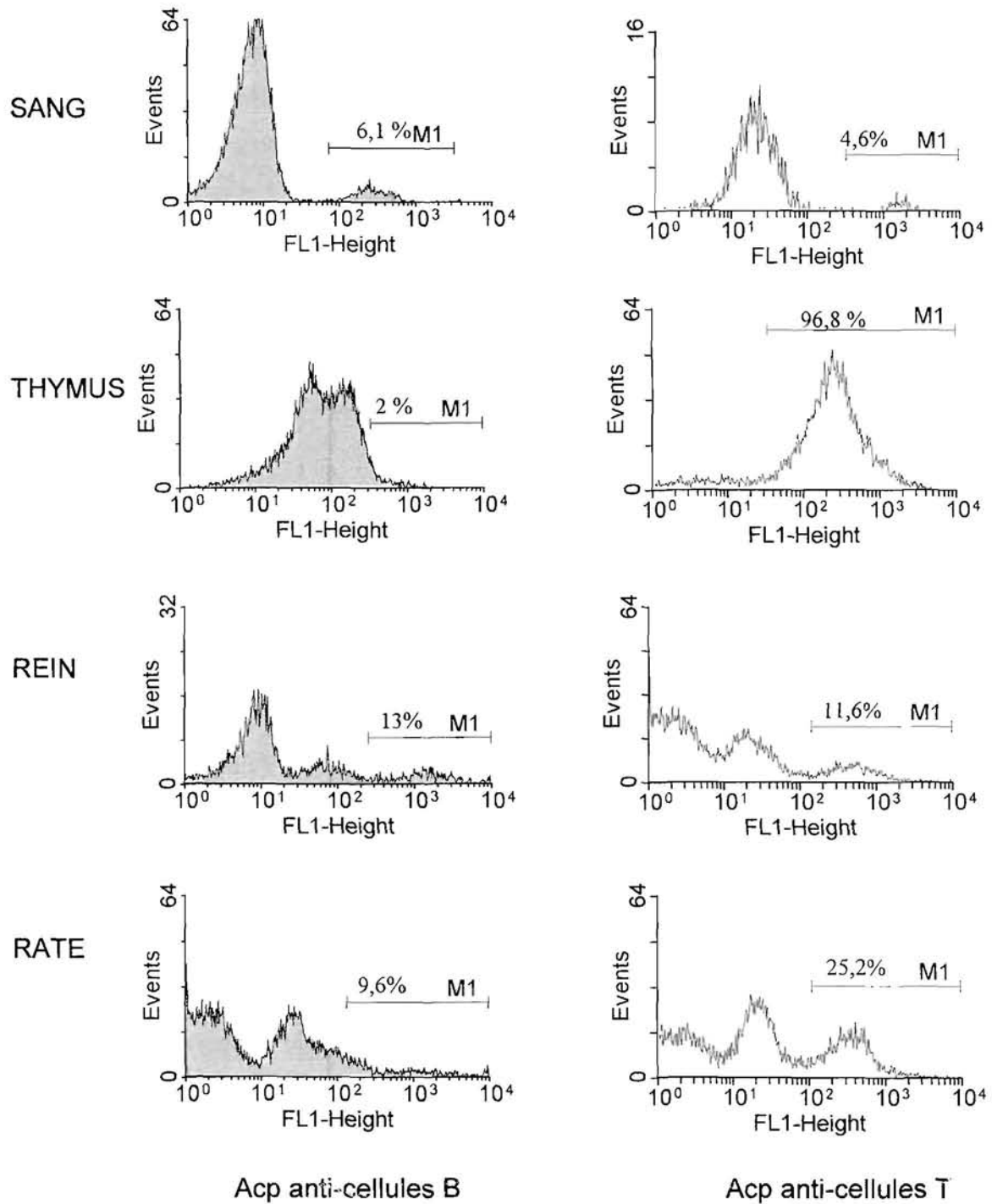
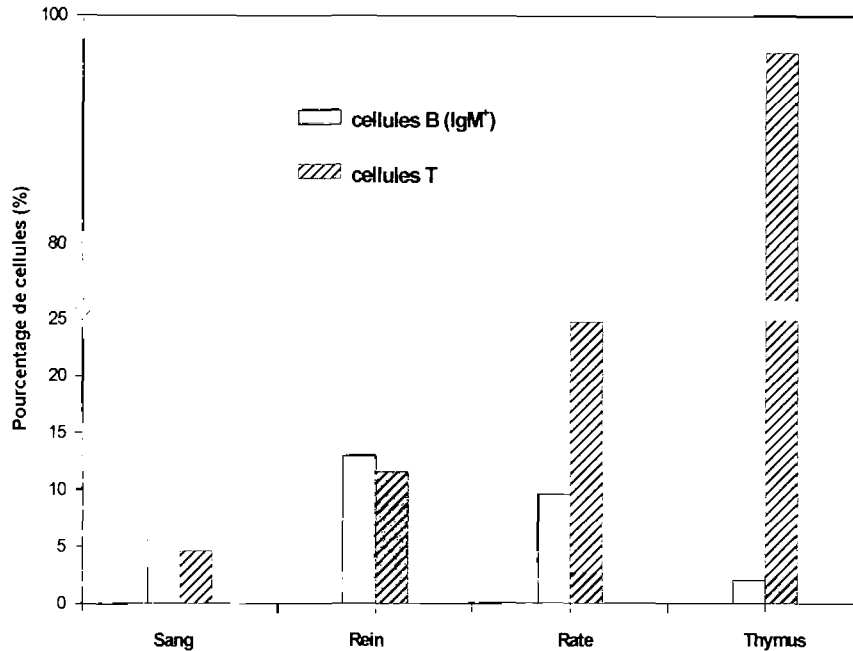


Figure 13 : Pourcentage de cellules B et T dans la population lymphoïde isolée des organes lymphoïdes d'un bar de 130 g après marquage indirect avec des anticorps polyclonaux anti-cellules B et anti- cellules T .



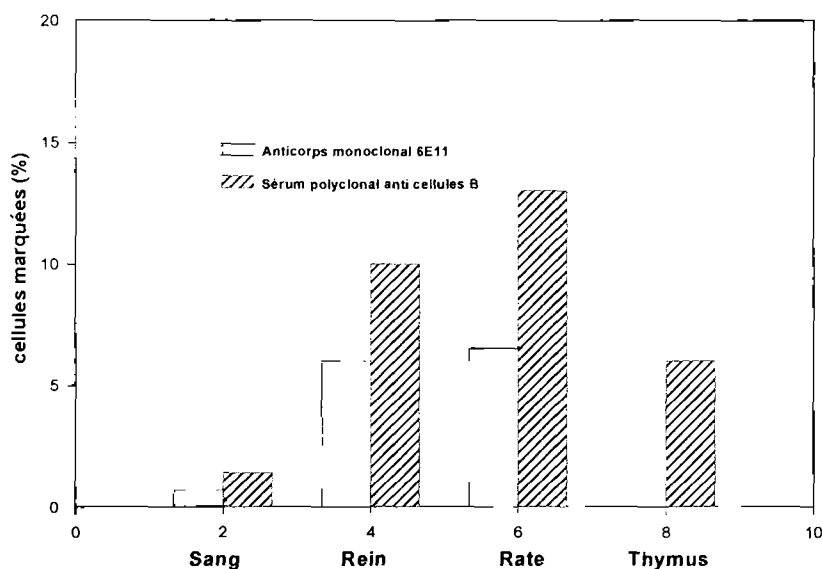
Ce type de marquage est cependant peu sensible et sujet à de nombreuses fausses réactions. Le diagramme de fluorescence des cellules du rein et de la rate (Planche XXIII) montre un double pic rendant le positionnement du marqueur (M1) difficile. Seuls les pics de fluorescence de forte intensité ($>10^2$) correspondent aux marquage spécifiques alors que ceux de faible intensité ($<10^2$) sont dus à une captation non spécifique des Acp de lapin par les populations R2 du rein et de la rate. De plus, le pourcentage assez élevé (3%) de cellules du thymus marquées par l'Acp anti-cellules B indique également l'existence d'un marquage non spécifique.

Afin de diminuer l'intensité du marquage non spécifique, nous avons comparé l'efficacité d'un marqueur polyclonal (anti-IgM) et celui d'un marqueur monoclonal de grande spécificité (anti-chaîne H).

-2/ Etude comparée de l'efficacité d'un marquage indirect de la population B avec un anticorps polyclonal ou monoclonal anti IgM (Annexe XIII).

Le marquage est effectué en deux étapes comme cela a été défini précédemment. La première étape est constituée par un anticorps monoclonal de souris (6E11) ou un sérum polyclonal de lapin dirigé contre les IgM du bar, la seconde étape est un anticorps conjugué à la fluorescéine. Cet anticorps est soit un anticorps de lapin dirigé contre les IgG de souris, soit un anticorps de chèvre dirigé contre les IgG de lapin. Nous avons ainsi marqué les lymphocytes provenant de différents organes lymphoïdes d'un bar de 80g de poids moyen. Les pourcentages de cellules IgM⁺ dans les prélèvements totaux d'organes lymphoïdes sont indiqués dans la figure 14.

Figure 14 : Etude comparée de l'efficacité du marqueur polyclonal par rapport à un marqueur monoclonal pour la détection des cellules IgM⁺.



Le pourcentage de cellules IgM⁺ marquées avec le sérum de lapin (Acp) est toujours supérieur (d'environ 40 à 50% pour le sang, le rein et la rate) à celui obtenu avec un anticorps monoclonal appliqué dans les mêmes conditions. Une meilleure reconnaissance des IgM par l'anticorps polyclonal a d'ailleurs été signalée dans la partie relative au dosage ELISA des immunoglobulines (Chapitre II, p. 68). Si, comme nous l'avons fait lors des dosages ELISA, nous considérons, dans le cadre des marquages en

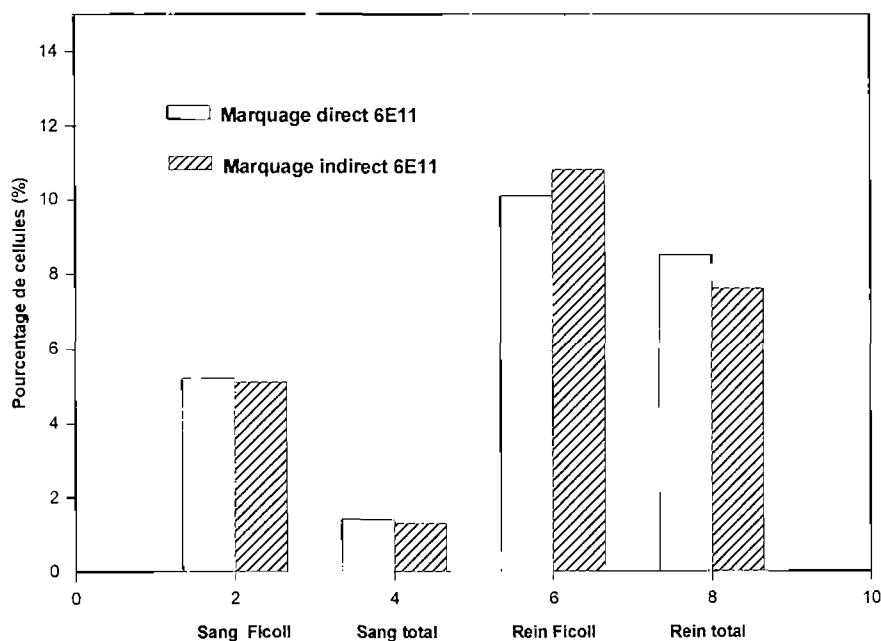
cytométrie de flux, que le sérum polyclonal reconnaît 100 % des cellules, l'anticorps monoclonal reconnaît entre 40 et 50 % des cellules IgM⁺. Ce pourcentage correspond au pourcentage (56,4 %) de reconnaissance de l'IgM par l'Acm 6E11 lors du dosage ELISA du sérum S370.

Dans le thymus, le pourcentage de cellules « B » marquées par l'Acm est inférieur à 1% alors qu'il dépasse 5% avec un Acp. Cette proportion très élevée de cellules thymiques marquées par l'Acp anti cellules B, pourrait être due à l'existence, sur les cellules T, d'épitopes voisins de ceux rencontrés sur les IgM.

-3/ Etude comparée de l'efficacité d'un marquage direct ou indirect avec un anticorps monoclonal (Acm 6E11) anti IgM (Planche XXIV, Annexe XIV).

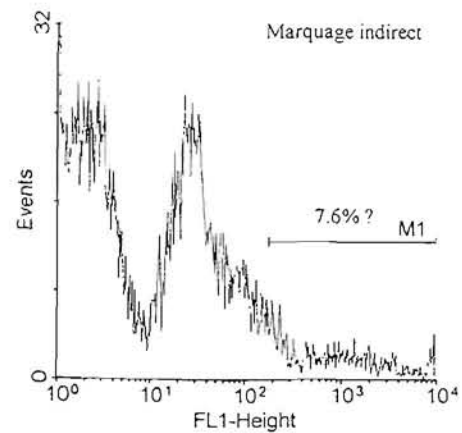
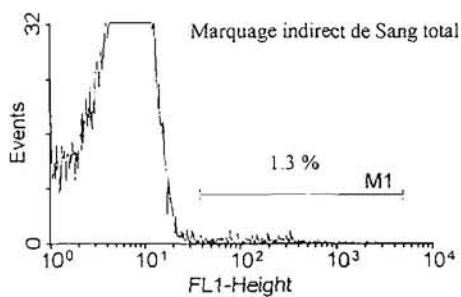
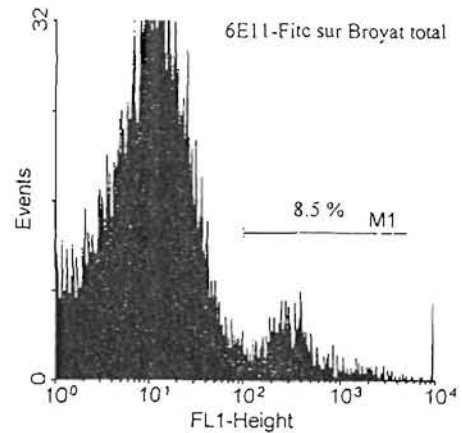
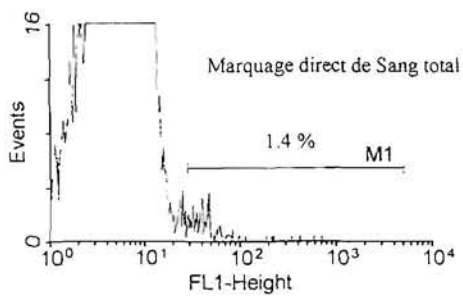
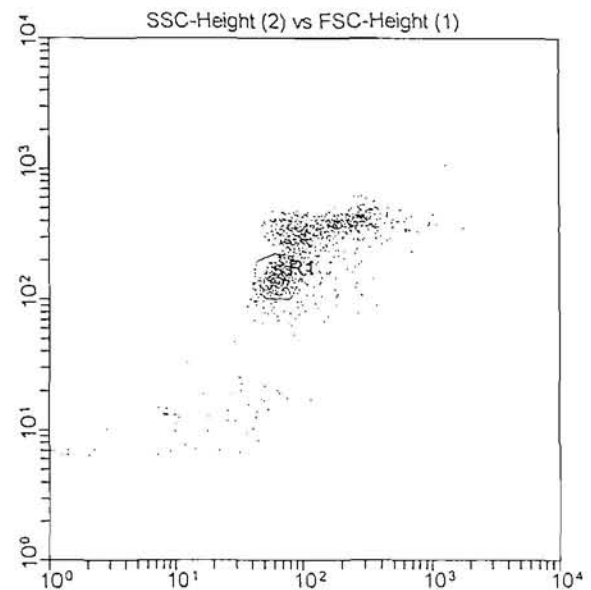
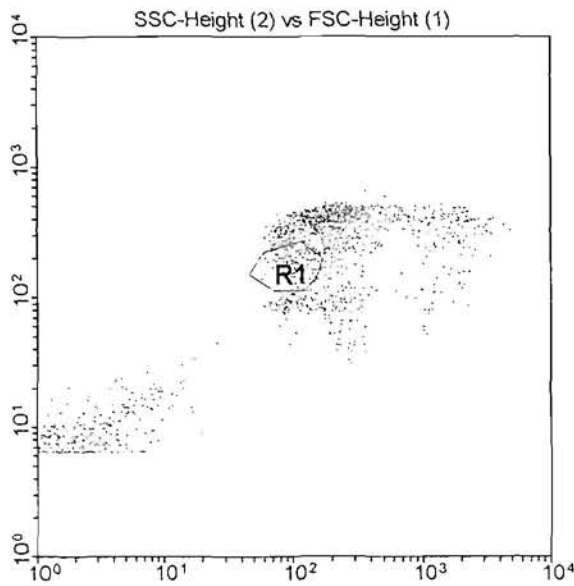
Les lymphocytes isolés du sang ont été marqués avec l'anticorps monoclonal 6E11 (Figure 15).

Figure 15 : Etude comparée de l'efficacité d'un marquage direct ou indirect avec un anticorps monoclonal anti IgM (Acm 6E11).



Dans le cas du sang total, les pourcentages de lymphocytes IgM⁺ sont de 1.4% pour le marquage direct et 1.3% pour le marquage indirect. Dans le rein, ces proportions sont respectivement de 8,5% et 7,6% .

Planche XXIV: Marquages FITC directs et indirects des cellules IgM+ du sang et du rein de *D. labrax* par l'anticorps monoclonal 6E11.



L'examen des diagrammes de fluorescence des populations cellulaires du sang et du rein (planche XXIV) indique que les deux types de marquage (direct et indirect) donnent des résultats comparables. Toutefois, le marquage indirect, entraîne parfois un décalage important de la fluorescence rendant le positionnement du marqueur (M1: témoin de fluorescence) délicat. Ce décalage de fluorescence est clairement visible dans le cas du marquage indirect des lymphocytes isolés du rein (Planche XXIV, Figure D). Le pourcentage relevé (7,6 %) est alors très approximatif.

Aussi, le marquage direct, au moyen d'un anticorps monoclonal conjugué FITC paraît plus fiable et plus spécifique que le marquage indirect. Seule la technique de marquage direct a été optimisée.

-4/ Optimisation du marquage direct: étude de la concentration optimale de l'Acm conjugué (Annexe XIV).

Différentes concentrations en anticorps couplé à la fluorescéine (6E11-FITC) ont été utilisées pour le marquage des lymphocytes isolés du sang (annexe XIV). Le témoin (Témoin-FITC) est marqué avec un Acm anti immunoglobuline de souris conjugué FITC (F4143 Sigma) et utilisé aux mêmes concentrations (Figure 16).

Figure 16 : Pourcentages de cellules marquées avec différentes concentrations d'anticorps monoclonal.

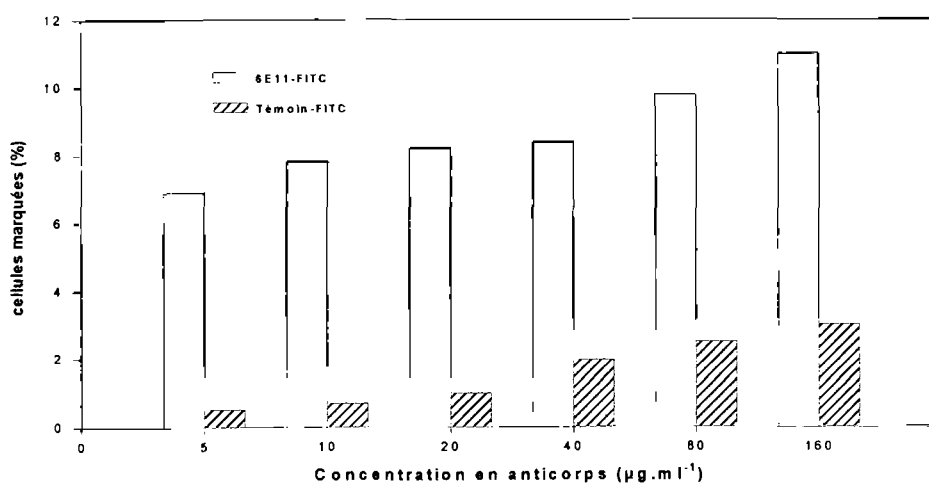
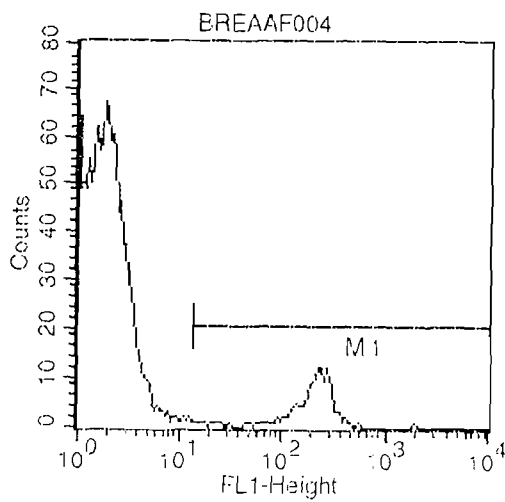


Planche XXV: Intensité moyenne de fluorescence de la population IgM⁺ du sang de *D. labrax* après marquage direct FITC avec l'anticorps monoclonal 6E11 utilisé selon deux concentrations (20 et 80 µg.ml⁻¹).

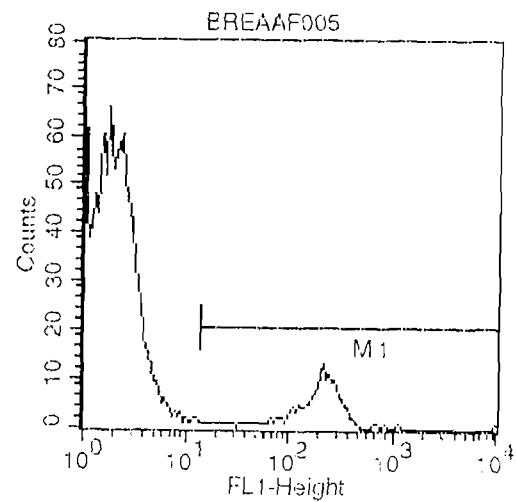


File: BREAAF004 Gate: G1

Left	Right	% Gated	Geo Mean
1	9910	100.00	2.55
13	9910	8.37	179.41

6E11-FITC : 20 µg.ml⁻¹

intensité moyenne = 179,41



File: BREAAF005 Gate: G1

Left	Right	% Gated	Geo Mean
1	9910	100.00	2.85
13	9910	9.77	168.34

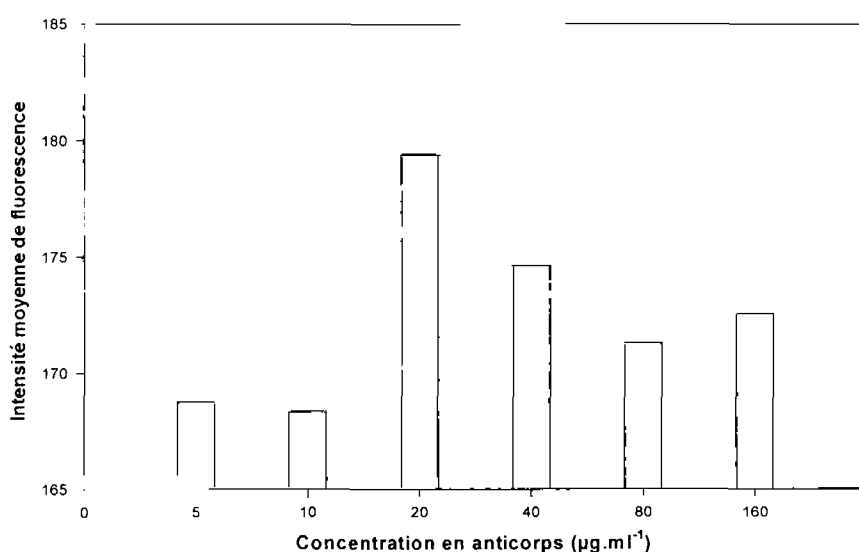
6E11-FITC : 80 µg.ml⁻¹

intensité moyenne = 168,3

L'augmentation de la concentration en Acm 6E11, à partir de $20 \mu\text{g.ml}^{-1}$, augmente légèrement la proportion de cellules marquées spécifiquement par l'Acm 6E11 ainsi que celle des cellules marquées avec le marqueur non-spécifique (Témoin-FITC : F4143 Sigma). Au delà de $20 \mu\text{g.ml}^{-1}$, le signal non spécifique (Témoin-FITC) devient important.

L'intensité moyenne de fluorescence des cellules marquées peut également être observée pour chaque échantillon (Planche XXV). On remarque que l'intensité de la fluorescence de la population marquée (intensité moyenne de fluorescence) est optimal pour la concentration en Acm 6E11 de $20 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (Figure 17).

Figure 17 : Intensité moyenne de fluorescence des cellules après marquage avec différentes concentrations en anticorps monoclonal conjugué à la Fluorescéine.



Quantification des cellules : Conclusion.

L'utilisation d'un anticorps monoclonal couplé au fluorochrome (6E11-FITC) donne les meilleurs résultats pour effectuer le marquage des populations cellulaires IgM^+ en cytométrie de flux. En effet, un marquage direct avec $20 \mu\text{g.ml}^{-1}$ d'Acm donne une intensité de fluorescence maximale avec un signal non-spécifique bas. Cette technique de marquage, sera mise à profit pour quantifier par cytométrie de flux, les cellules dans les organes lymphoïdes de l'adulte et dans les larves de bar.

3.2.3. Etude de la répartition des cellules B dans les organes lymphoïdes de l'adulte

Dans le chapitre II, nous avons étudié l'évolution de la réponse immunitaire humorale en fonction de la croissance et de l'immunisation. Nous avons constaté que la teneur en **IgM sérique du bar** augmentait avec la **taille des poissons** et qu'elle évoluait peu après une immunisation expérimentale (injection de TNP-LPS). Afin de vérifier que les variations des IgM sériques étaient corrélées, ou non, à celles du pourcentage de cellules IgM⁺ observées dans les organes lymphoïdes, nous avons effectué l'étude de la répartition des cellules IgM⁺ dans les différents compartiments lymphoïdes (sang, rein et rate) du bar.

En ce qui concerne l'influence de l'**âge** et de la taille, différentes études, effectuées chez les larves, ont montré que la répartition des cellules IgM⁺ dans les organes lymphoïdes évoluait au cours de la mise en place du système immunitaire (Tatner et Findlay, 1991; Koumans Van Diepen et coll., 1994). Par contre, à notre connaissance, aucune étude n'a été effectuée chez le jeune poisson ou l'adulte.

Par contre, de nombreux travaux sont relatifs à l'effet d'une **stimulation** ou d'une immunisation. La prolifération lymphocytaire induite par une stimulation antigénique ou mitogénique est décrite par différents auteurs (Faulmann et coll., 1983; Sizemore et coll., 1984; Luft et coll., 1991; Marsden et coll., 1995), et l'amplitude de la réponse proliférative a ainsi été proposée comme paramètre permettant l'évaluation de l'immunocompétence (Anderson, 1990). Parmi les mitogènes les plus couramment utilisés dans le cadre d'étude de stimulation lymphocytaire effectuées *in vitro*, les LPS auraient pour cibles d'action les cellules B et la concanavaline A agirait sur les cellules T (Etlinger et coll., 1976; Miller et coll., 1987; Reitan et Thuvander, 1991; De Koning et Kaatari, 1992; Koumans van Diepen et coll., 1994b), par analogie avec les expérimentations réalisées chez les mammifères (Kearny et Lawton, 1975; Djilali et coll., 1987). L'activité mitogénique a également été observée *in vivo* quand ces substances sont inoculées par voie intrapéritonéale chez l'anguille (Van der Heijden et coll., 1995).

Enfin, différents paramètres peuvent également modifier la répartition des différentes populations cellulaires dans les organes lymphoïdes. Selon Morgan et coll. (1993), la répartition des différentes populations cellulaires du sang peut être modifiée après une exposition du poisson à des toxiques (Dick et Dixon, 1985), à un stress (Ainsworth et coll. 1990, Pottinger et Pickering, 1992), ou plus généralement, dans le cas de maladies comme la nécrose pancréatique infectieuse (NPI) chez la truite où la teneur en IgM est multipliée par cinq (Sanchez et coll., 1989).

Indépendamment de ces facteurs, la répartition des cellules IgM⁺ dans les différents organes a été étudiée en cytométrie de flux chez quelques espèces de poissons (tableau XII).

tableau XII : Répartition des cellules IgM⁺ (%) dans les organes lymphoïdes de différentes espèces de poissons (nd = non déterminé).

espèces	Sang	Thymus	Rein	Rate	bibliographie
<i>Salmo gairdneri</i>	nd	4,5	26	24	De Lucas et coll, 1983
<i>Cyprinus carpio</i>	16 à 48	1,5 à 4	10 à 21	6 à 22	Koumans-VanDiepen et coll, 1994b
<i>Cyprinus carpio</i>	36,2	3,8	15,9	23,7	Rodriguez et coll, 1995
<i>Anguilla anguilla</i>	31	nd	nd	nd	Van der Heijden et coll., 1995
<i>Ictalurus punctatus</i>	37,3	nd	18,3	nd	Ainsworth 1990
<i>Sparus aurata</i>	nd	3	22	23	Navarro et coll., 1993
<i>Dicentrarchus labrax</i>	9,5	nd	12,2	22	Scapigliati et coll. 1996

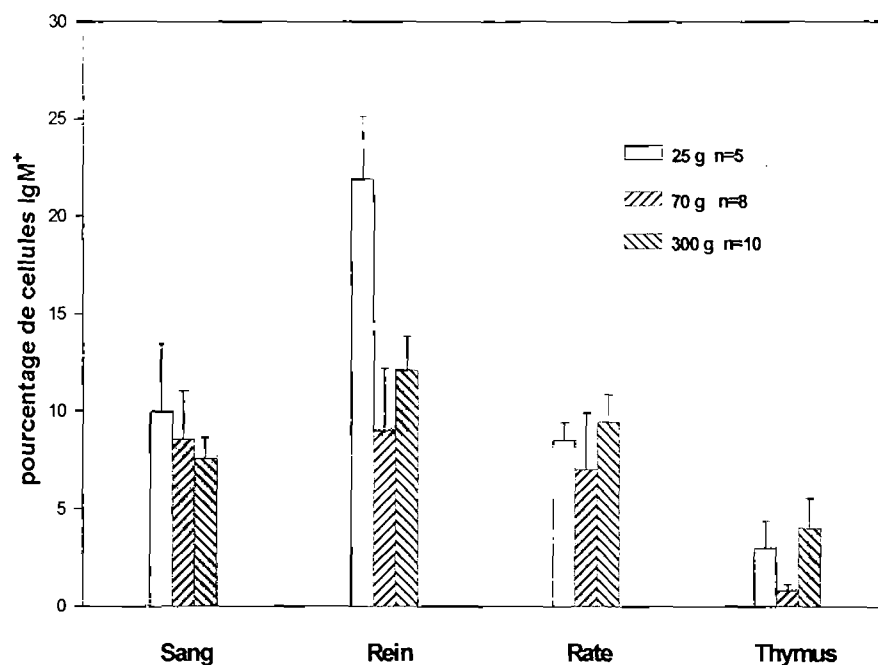
Chez le bar de 2 ans, une seule observation a été effectuée (Scapigliati et coll., 1996), sans pouvoir estimer la variabilité individuelle des pourcentages relevés.

Variation des cellules IgM⁺ au cours de la croissance

L'étude de la répartition des cellules IgM⁺ dans les compartiments lymphoïdes du bar s'inscrit donc naturellement dans le prolongement de nos recherches relatives à l'évolution de la teneur en IgM sérique. **L'augmentation de la teneur en IgM sérique serait elle liée à une augmentation du pourcentage de cellules productrices d'IgM dans les organes lymphoïdes ?**

Afin de répondre à cette question, nous avons étudié la répartition des cellules IgM⁺ dans le sang, le thymus, le rein et la rate chez trois lots (n=8) de poissons de poids croissant : 25 g, 70 g et 300 g, élevés à une température identique de 18 à 22 °C.

Figure 19 : Etude de la répartition des cellules IgM⁺ (%) dans les organes lymphoïdes du bar au cours de la croissance



La répartition des cellules IgM⁺ dans les organes lymphoïdes du bar est hétérogène:

Dans le **thymus**, très peu de cellules IgM⁺ sont observées (pourcentage inférieur à 4 %) et ce résultat est comparable au pourcentage observé chez la carpe par différents auteurs (Koumans van Diepen et coll., 1994; Rodriguez et coll., 1995).

Dans le **rein**, le pourcentage de cellules IgM⁺ est plus élevé et très variable (8 à 23%) et correspond à la proportion (9,5 %) relevée par Scapigliati et coll. (1996). Une grande variabilité est également signalée dans le rein de la carpe où la proportion de cellules IgM⁺ peut doubler (10 à 21 %) selon les individus (Koumans Van Diepen et coll., 1994).

Dans la **rate**, le pourcentage de cellules IgM⁺ est similaire à celui observé dans le rein. Nos résultats concordent également avec ceux de Scapigliati (Scapigliati et coll., 1996) qui observe moins de 10% de cellules IgM⁺ dans la rate d'un bar âgé de 2 ans.

Dans le **sang**, le pourcentage de cellules IgM⁺ est comparable à celui observé dans la rate et correspond à celui observé par Scapigliati et coll. (1996). Cependant ce pourcentage de cellules IgM⁺ est faible, par rapport aux pourcentages observés dans le sang d'autres espèces, chez qui la proportion atteint et dépasse quelquefois les 30 % (tableau XII).

Comme nous l'avons précisé lors de l'étude des immunoglobulines, il apparaît que l'augmentation de la teneur en IgM sérique constatée au cours de la croissance du bar ne peut, en aucun cas, être imputable à une modification du nombre des cellules IgM⁺ observées dans les organes lymphoïdes. En effet, les pourcentages de cellules IgM⁺ observées dans chaque organe lymphoïde évoluent peu et ont même tendance à diminuer, au niveau sanguin, au cours de la croissance des individus dont le poids est compris entre 25 g et 300 g.

Nous avons cependant observé quelques différences significatives du pourcentage de cellules IgM⁺ dans le thymus et le rein au cours de la croissance :

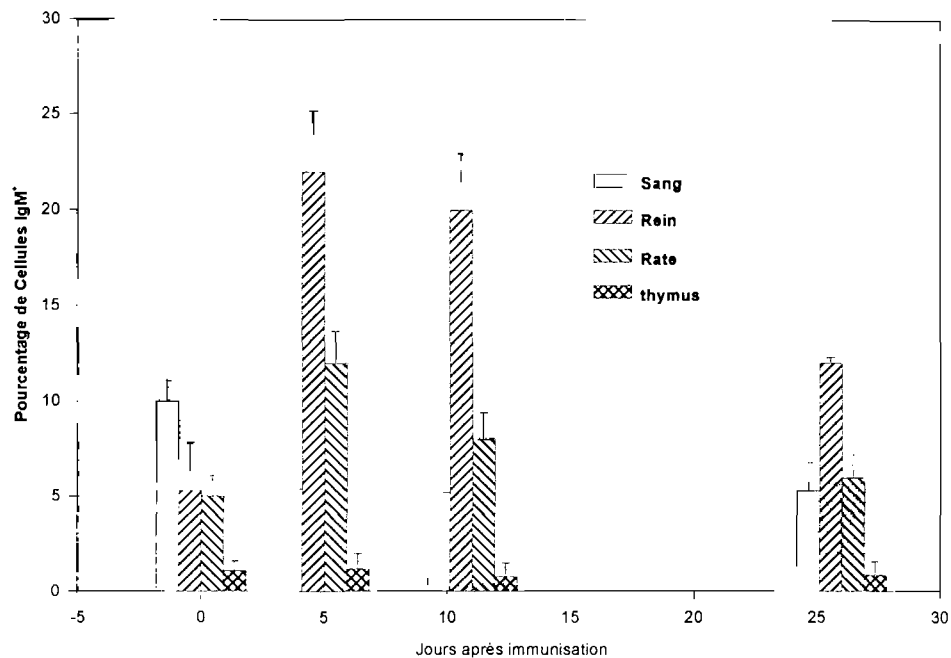
- La proportion des cellules IgM⁺ observées dans le thymus augmente chez les bars de 25 g et de 300 g. Chez les jeunes poissons de 25 g, l'augmentation du nombre de cellules IgM⁺ pourrait être due à une contamination sanguine du prélèvement. En effet, la taille du thymus chez ces poissons est inférieure à 1 mm et la résection de l'organe est extrêmement délicate. Chez les poissons plus âgés (300 g), le prélèvement du thymus ne pose pas de difficultés techniques et l'augmentation de la proportion de cellules IgM⁺ pourrait être en rapport avec l'involution de l'organe.

- Le pourcentage des cellules IgM⁺ dans le rein des jeunes bars de 25 g est très élevé par rapport aux pourcentages observés dans les autres catégories pondérales (différences significatives). Des différences importantes sont également observées chez la carpe (Koumans van Diepen et coll., 1994) dont le pourcentage de cellules IgM⁺ peut doubler dans le rein (10 à 21 %) et tripler dans la rate (6 à 22 %). Aucune hypothèse ne permet d'expliquer cette augmentation du nombre de cellules chez certains individus. Toutefois, il est possible que les jeunes bars utilisés dans le cadre de notre expérience aient été prélevés à un moment de forte stimulation de leur système immunitaire.

Variation des cellules IgM⁺ après une immunisation expérimentale

Afin de vérifier cette hypothèse, les organes lymphoïdes de 8 bars provenant du lot immunisé (TNP-LPS) et du lot témoin (Chapitre II, p. 40) ont été prélevés, le pourcentage de cellules IgM⁺ a été déterminé par marquage direct avec un Acm-FITC, et étudié en cytométrie de flux (Figure 20).

Figure 20 : Répartition des cellules B dans les organes lymphoïdes du bar après immunisation.



Les résultats de cette expérimentation mettent en évidence une augmentation du nombre de cellules IgM⁺ dans le rein et la rate à partir du 5^{ème} jour suivant l'immunisation. Dans le rein, cette augmentation est encore visible 25 jours après l'injection et pourrait expliquer les différences constatées chez les bars de 25 g.

La proportion des cellules IgM⁺ dans les organes lymphoïdes du bar n'est pas corrélée à celle du taux des IgM sériques (Chapitre II, p. 51) car ce taux est identique chez les deux lots (lot témoin AIF et lot immunisé). De plus, la teneur en IgM sérique diminue entre le 5^{ème} et le 10^{ème} jour suivant l'immunisation alors que la proportion des cellules productrices d'IgM est maximale dans le rein et la rate.

Conclusions.

La répartition des cellules IgM⁺ (cellules B) présentes dans les différents compartiments lymphoïdes du bar est hétérogène. Les pourcentages relevés

sont comparables (à l'exception du sang dont la proportion de cellules IgM⁺ est plus faible chez le bar), aux pourcentages observés chez les autres espèces (tableau XII, p.121). Il est cependant difficile de comparer les résultats obtenus chez le bar avec ceux obtenus chez différentes espèces de poissons, compte tenu des méthodologies employées par les différents auteurs.

Nous avons observé, dans le cas de notre étude, que le pourcentage de cellules IgM⁺ pouvait être augmenté lorsque des cellules de type monocytaire ou macrophagique étaient présentes dans la population de type lymphocytaire ou, plus généralement, lorsque les observations en cytométrie de flux étaient réalisées après un marquage indirect des cellules. La plupart des observations effectuées par les différents auteurs (tableau XII, p.121) ont été réalisées après un marquage indirect des cellules.

D'autres milieux (Percoll ou Ficoll Hypaque) que le nôtre, ont également été employés pour l'isolement des lymphocytes sanguins chez les poissons, expliquant probablement certaines différences.

La variabilité individuelle de la répartition des cellules IgM⁺ dans les compartiments lymphoïdes du bar a pu être appréciée. Dans certains organes (rein et rate), cette variabilité est grande et pourrait être interprétée par une stimulation du système immunitaire chez certains individus.

Les pourcentages de cellules IgM⁺ varient peu au cours de la croissance (entre 25 g et 300 g) alors qu'ils augmentent fortement dans le rein et la rate 5 jours après une immunisation expérimentale avec un antigène T-indépendant (TNP-LPS). Une observation similaire est rapportée chez l'anguille (Van der Heijden et coll., 1995). Toutefois, ces variations du pourcentage de cellules IgM⁺ ne sont pas corrélées à celles des IgM sériques chez le bar.

3.3. Ontogenèse du système lymphoïde et sa modulation dans le temps.

3.3.1. Objectif de l'étude.

Cette étude doit nous permettre de déterminer à quel moment apparaissent les cellules immunocompétentes productrices d'IgM (cellules IgM⁺) chez les larves de bar. Cette étape est cruciale, car elle permet de détecter le stade optimal pour une vaccination, d'autant plus que les IgM (totales et spécifiques) d'origine parentale ont disparu dans les oeufs et les larves au cours de cette période.

Chez les mammifères (Kitamura et coll., 1992), l'apparition de différents stades cellulaires se fait selon le schéma classique cellules pré-B, cellules B (immunoglobulines de surface) et cellules B matures (synthèse des IgM).

Chez les poissons, les premières cellules lymphocytaires apparaissent très tôt au cours de l'embryogenèse et sont localisées dans le rein comme l'indiquent nos observations en microscopie électronique. Les cellules productrices d'IgM (IgM⁺) apparaissent bien plus tardivement et de manière séquentielle dans les différents organes lymphoïdes (rein, thymus et rate), cette observation conforte la nécessité d'une étape de maturation des lymphocytes dans les différents organes lymphoïdes. Ainsi, chez la truite arc en ciel, les premières cellules IgM⁺ apparaissent dans le rein au 4^{ème} jour, puis dans la rate au 30^{ème} jour, enfin dans le thymus (Razquin et col. 1990). Chez le tilapia, les premières cellules IgM⁺ apparaissent dans le rein au 54^{ème} jour, puis dans le thymus entre le 47^{ème} et le 54^{ème} jour et enfin dans la rate entre le 54^{ème} et le 77^{ème} jour (Luft et coll. 1991).

D'une manière générale, il semble que les premières cellules lymphocytaires (IgM⁺) apparaissent dans les organes lymphoïdes au moment de la première prise alimentaire, comme cela a été signalé chez les salmonidés (Dogget et Harris, 1987; Dogget et coll., 1991) et chez le tilapia (Takemura,

1993). Chez les salmonidés, cette étape correspond à la résorption de la vésicule vitelline : *Salmo salar* (Ellis, 1977), *Salmo gairdneri* (Razquin *et al.*, 1990) et *Oncorhynchus keta* (Nagae *et al.*, 1993). Chez le bar, la résorption de la vésicule vitelline est achevée très tôt, au 10^{ème} jour, lorsque la larve commence à s'alimenter avec des proies vivantes.

L'immunocompétence, c'est à dire le développement d'une réponse spécifique capable de protéger contre l'infection par un agent pathogène est, quant à elle, achevée plus tardivement vers le 54^{ème} jour chez les salmonidés (Ellis 1977), le 54^{ème} jour chez la daurade (Josefsson et Tatner 1993) et le 77^{ème} jour chez le tilapia (Luft *et coll.* 1991). Chez le bar, différentes données concernant la vaccination expérimentale indiquent que le système immunitaire est partiellement en place vers le 50^{ème} jour d'élevage puisque, la vaccination d'alevins de 200 mg contre la vibriose entraîne une protection significative lorsque l'épreuve virulente est effectuée 1 mois après (Vigneulle *et coll.*, 1993).

3.3.2. Matériel et méthodes

Quatre élevages larvaires de bar dénommés : A, B, C et D ont été réalisés simultanément. Les pontes provenant des différents géniteurs sont récupérées et les oeufs viables sont mis en incubation pendant 3 jours (technique d'incubation standard avec de l'eau de mer filtrée, température 16-18°C). La ponte A provient d'une femelle vaccinée 1 mois avant la date de ponte (vaccin *V. anguillarum* sérotype O1: $2 \cdot 10^9$ corps bactériens/poisson. Rappel à 15 jours après l'immunisation. Les autres pontes B, C et D proviennent de femelles non vaccinées.

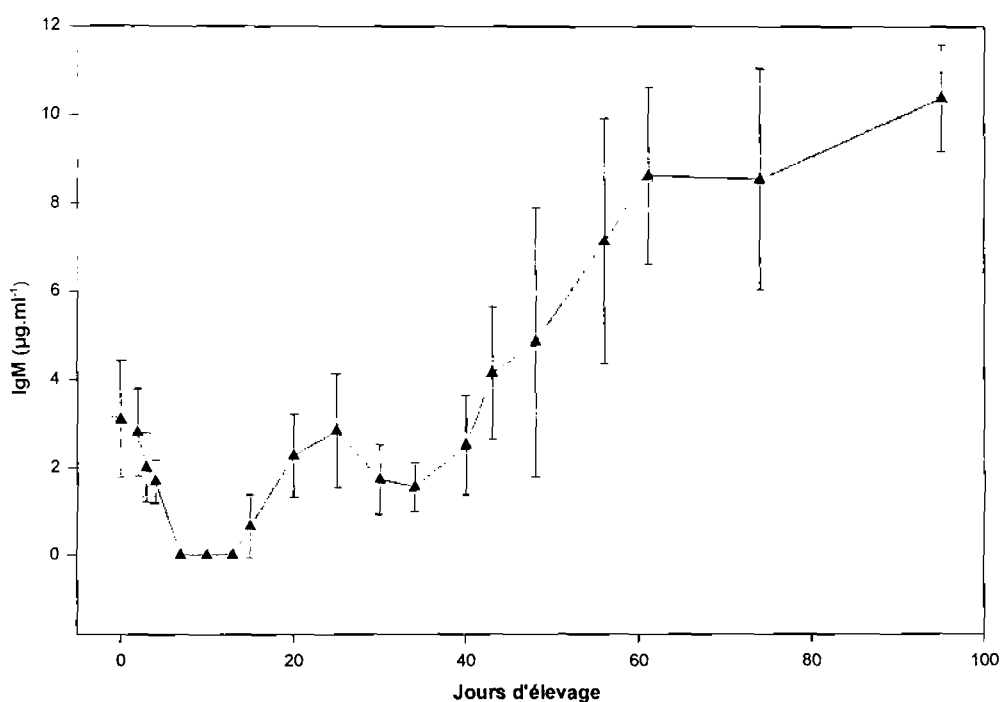
Les immunoglobulines sont alors dosées dans les œufs et les larves par ELISA « sandwich » Acp/Acm (Chapitre II, p. 46). La quantification des cellules IgM⁺ est effectuée dans les broyats totaux de larves par marquage direct avec l'Acm 6E11-FITC et par cytométrie de flux (Breuil *et coll.*, 1997). Enfin, ces cellules sont mises en évidence dans des coupes de pronéphros de larves par marquage indirect FITC avec l'Acm 6E11.

3.3.3. Résultats

Dosage des immunoglobulines dans les larves

Les résultats de nos dosages sont représentés dans la figure 22. Pour chaque élevage, les immunoglobulines ont été dosées en triplicats. Chaque point représente la moyenne obtenue sur quatre élevages différents. Nous avons représenté l'intervalle de confiance correspondant à $P < 0.05$ (pour la table de t : test de Fisher et Yates).

Figure 20 : Evolution de la teneur en IgM totale au cours du développement larvaire chez le bar



Après une phase de diminution progressive des Immunoglobulines d'origine maternelle (Chapitre II, p. 66), une première augmentation du taux d'IgM est observée entre le 18^{ème} et le 30^{ème} jour d'élevage ($2.84 \pm 1.30 \mu\text{g.ml}^{-1}$ au 25^{ème} jour). Cette phase coïncide avec le développement du thymus, au 20^{ème} jour, chez les larves (Chapitre III, p. 91, Planche XV). Au delà du 35^{ème} jour, la teneur en immunoglobuline augmente progressivement dans les larves ($1.55 \pm 0.17 \mu\text{g.ml}^{-1}$ au 35^{ème} jour et $10.38 \pm 0.73 \mu\text{g.ml}^{-1}$ au 94^{ème} jour).

Lorsque la teneur en IgM est rapportée à l'individu, cette teneur est corrélée positivement au poids, ce qui indique une forte synthèse d'IgM chez la larve (Figure 21).

Figure 21 : Evolution de la teneur en IgM au cours de la croissance chez les larves du bar.

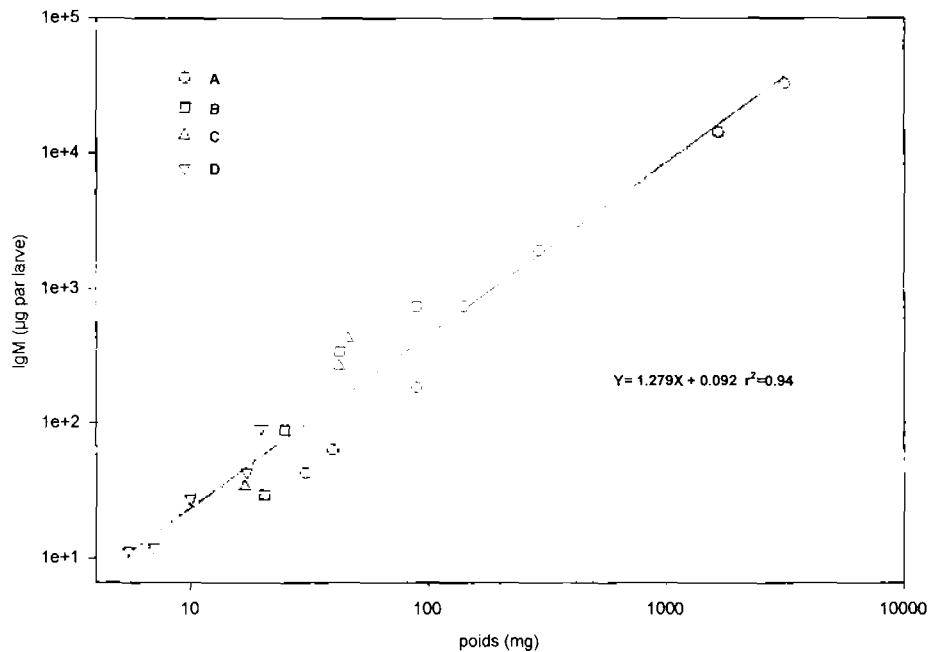


Figure 22 : Tests en dilution des différents sérums de bar adulte et de larves âgées de 74 et 95 jours.

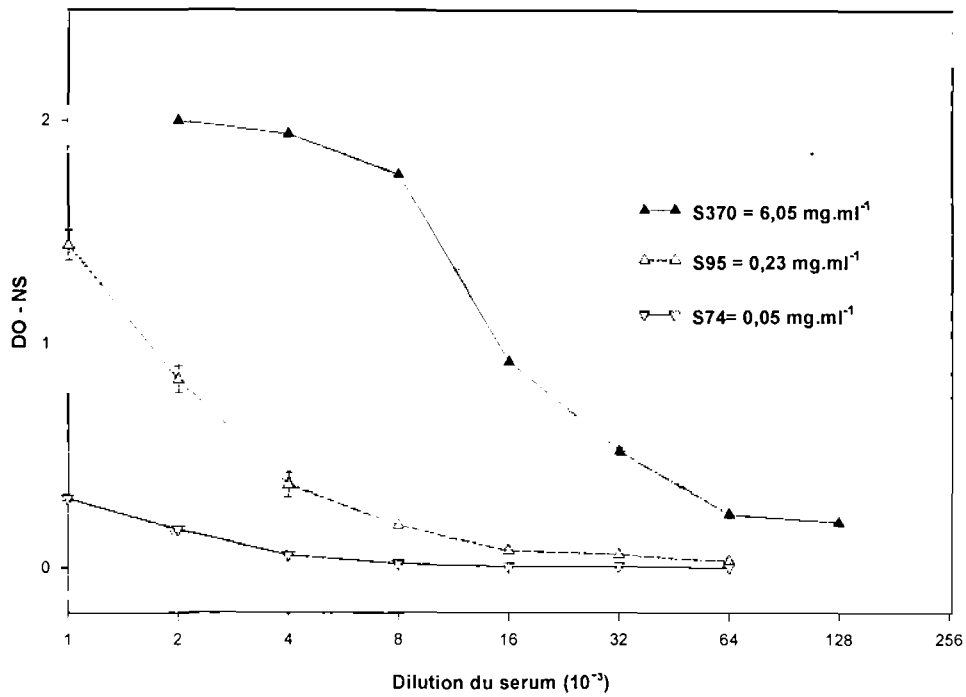


Tableau XIII : Teneur en IgM dans les broyats total et dans le sérum de larves de bar âgées de 74 et 95 jours.

âge des larves (jours)	poids des larves (mg)	IgM de broyat total (µg.ml ⁻¹)	IgM sériques (mg.ml ⁻¹)
74	1,67	8,53 ± 0,5	0,05
95	3,16	10,37 ± 0,7	0,23

Ces résultats indiquent que vers le 74^{ème} jour, le taux d'IgM sérique est très faible (0.05 mg.ml⁻¹) et, que la quantité totale d'IgM ainsi détectée (4,75 µg) représente le quart de la quantité d'IgM présente dans le broyat total de cette même larve (14,2 µg d'IgM). Vers le 95^{ème} jour, la quantité totale d'immunoglobulines dans l'extrait larvaire a doublé (33 µg) alors que le taux d'IgM sérique a plus que quadruplé (0.23 mg.ml⁻¹).

Pour un volume sanguin total calculé sur la base de 5 % du poids vif, la quantité totale d'IgM présente dans le sérum de larves âgées de 95 jours atteint 36,3 µg et représente la totalité des IgM dosées dans le broyat (32 µg).

Ces résultats appellent d'emblée une remarque concernant l'immunocompétence en fin d'élevage larvaire. Bien que présentant un taux d'IgM sérique particulièrement faible (environ le 1/100 de la teneur détectée chez l'adulte), les alevins sont capables de développer une protection efficace sur la base d'anticorps sériques induits par une vaccination. (Vigneulle et coll., 1993)

Ces données relatives aux teneurs en immunoglobulines, sont confortées par la mise en évidence des cellules productrices d'IgM (cellules IgM⁺) au cours de la même période.

Quantification des cellules IgM⁺ au cours du développement larvaire.

Isolement de la population lymphocytaire dans les extraits larvaires (Planche XXVI).

La population lymphocytaire présente dans un extrait de broyat de larve est parfois difficilement identifiable par étude en cytométrie de flux. En effet, chez les **jeunes larves** (larves âgées de moins de quarante jours), la population cellulaire isolée après centrifugation sur Ficoll contient une forte proportion de cellules pigmentées constituée en majorité par des cellules pigmentaires de la rétine et de quelques mélanophores. Cette population vient interférer dans les isollements et empêche toute localisation directe de la population lymphocytaire d'autant que la taille de cette population est probablement très réduite chez les jeunes larves.

Aussi, pour l'observation en cytométrie de flux des larves de moins de 40 jours (Planche XXVI, Figure A), une fenêtre correspondant à cette population a été définie après examen du sang (Planche XXVI, Figure C) ou du thymus (Planche XXVI, Figure D) provenant d'un bar de 50 g ou d'une larve âgée de 74 jours (Planche XXVI, Figure B).

Planche XXVI: Analyses en cytométrie de flux d'extraits de larves de bar âgées de 20 jours (A), de larves âgées de 74 jours (B), de sang (C) et de thymus (D) d'un bar de 50 g.

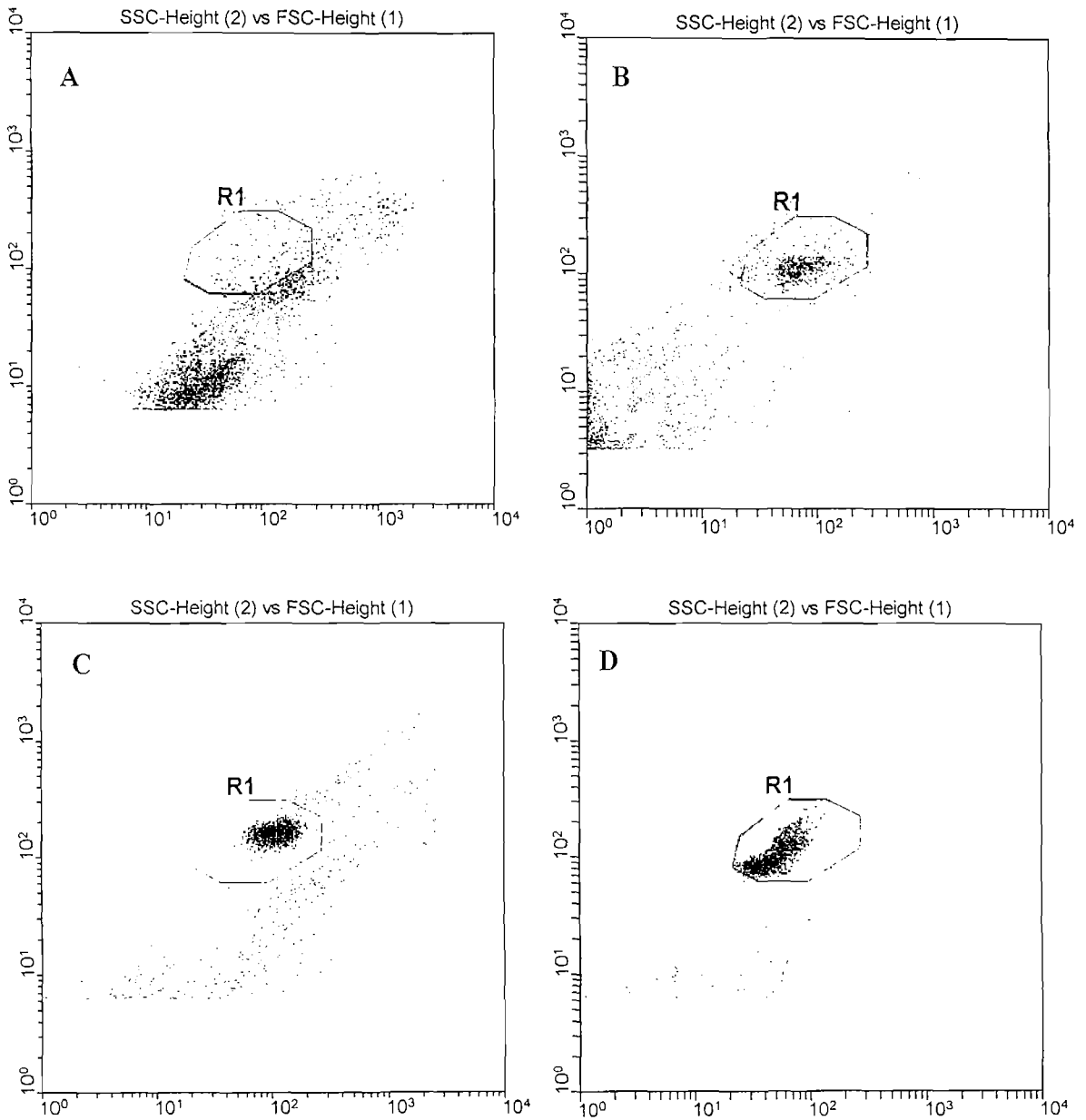


Planche XXVII: Analyses en cytométrie de flux d'extraits de larves de bar à différents stades de développement.

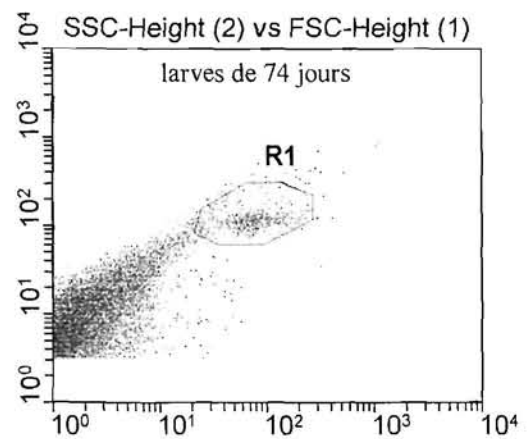
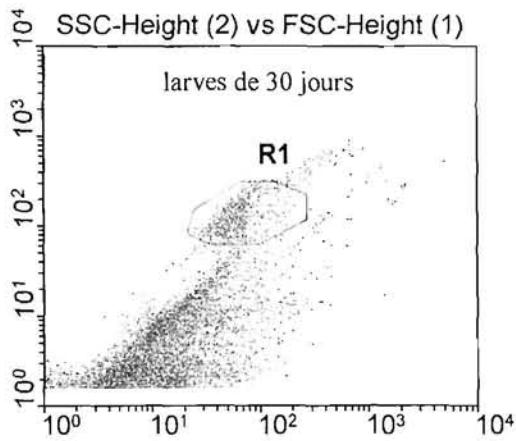
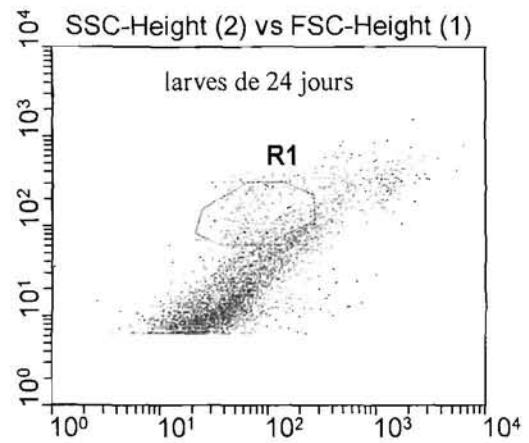
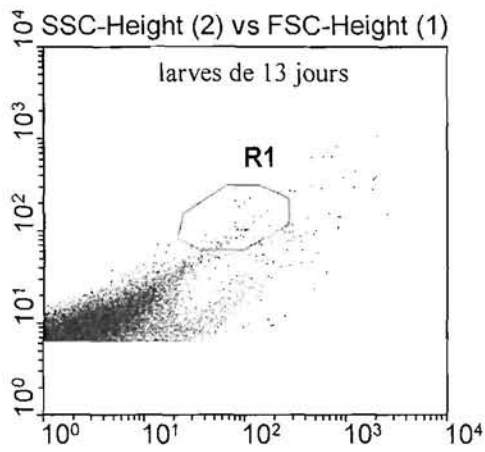
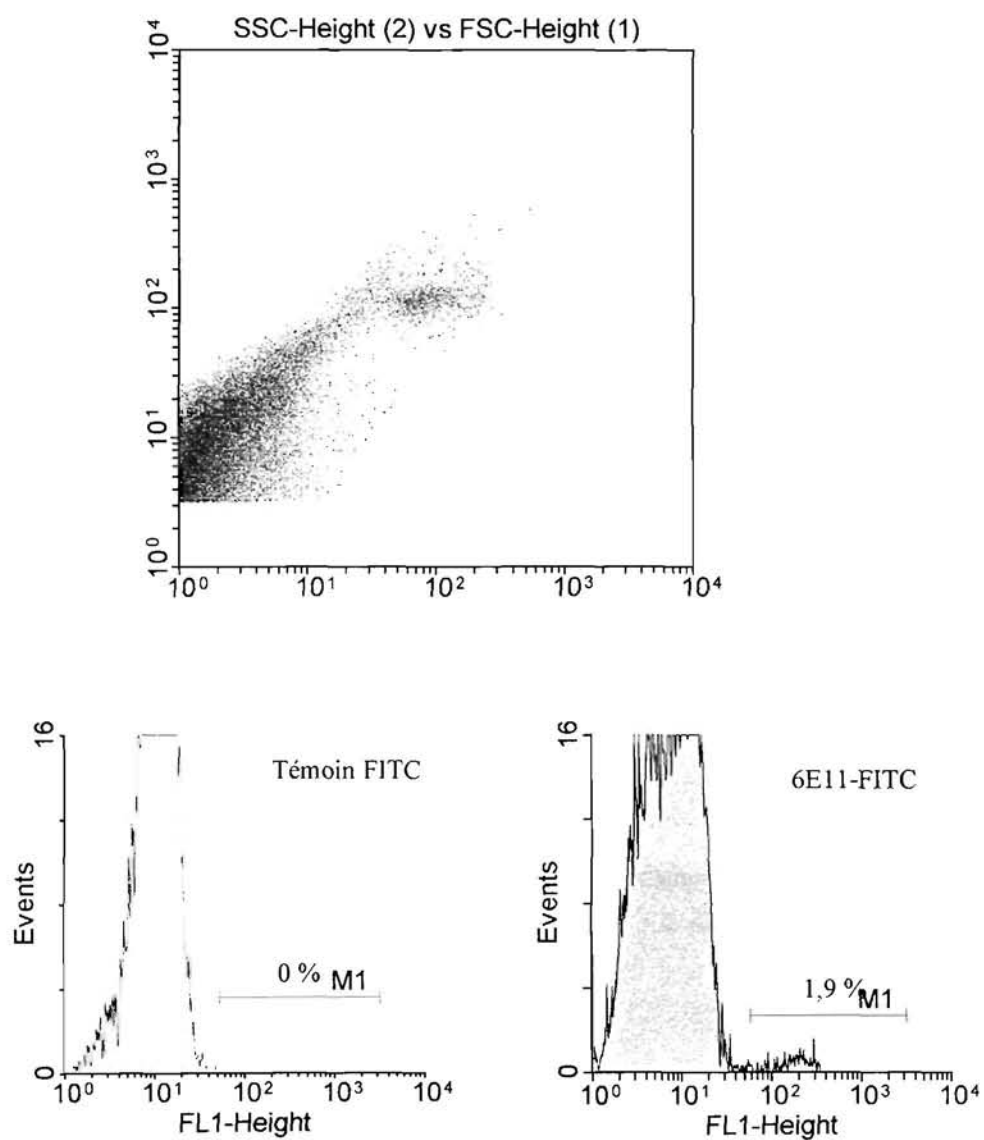


Planche XXVIII : Marquage FITC direct (Acm 6E11) des cellules IgM+ dans un broyat de larve de bar âgé de 54 jours.



A partir du 40^{ème} jour (Planche XXVII), la population lymphocytaire est suffisamment abondante dans les prélèvements pour pouvoir être délimitée directement par cytométrie de flux.

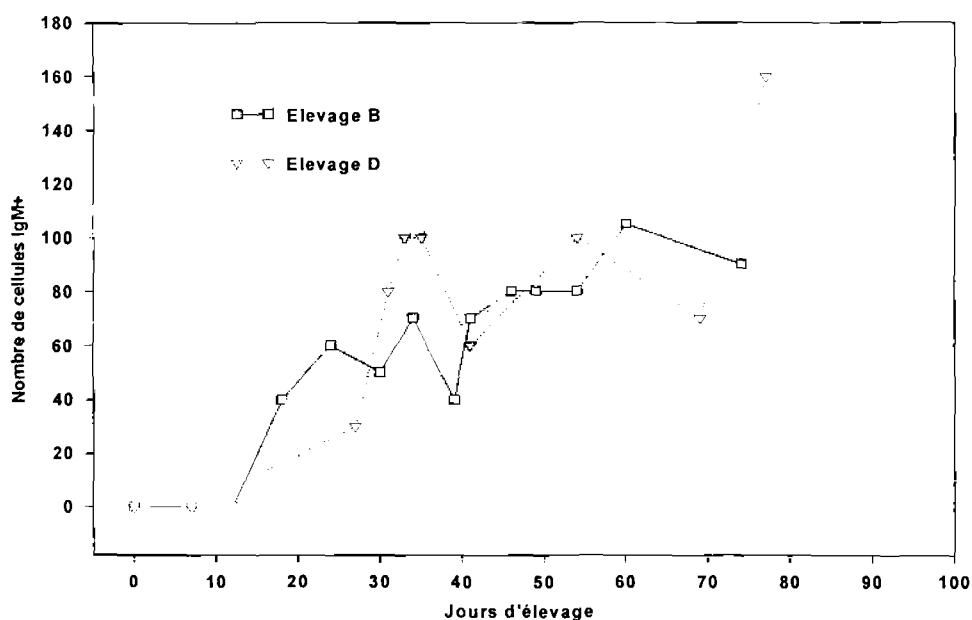
L'observation des différents diagrammes obtenus chez les larves du bar indique qu'une phase de multiplication importante des cellules lymphoïdes se produit entre le 24^{ème} et le 30^{ème} jour (Planche XXVII : analyses en cytométrie de flux d'extraits totaux de larves âgées de 13, 24, 30 et 74 jours).

Pourcentage de cellules IgM+ chez les larves

Un marquage direct des cellules avec un Acm couplé à la fluorescéine (6E11-FITC) permet de déterminer, la proportion de cellules réactives (cellules IgM⁺), dans une population totale de 10 000 cellules examinées dans la fenêtre R1 correspondant à la population lymphocytaire définie à partir du sang d'un alevin de 5 g (Planche XXVIII).

L'ensemble des résultats est représenté dans la figure 22. La proportion de cellules IgM⁺ détectée dans les extraits totaux de larves (après isolement sur Ficoll) est, en général, très faible (inférieure à 2%), mais montre une progression au cours du développement larvaire

Figure 22 : Nombre de cellules IgM⁺ dans la population lymphocytaire isolée des larves de bar en fonction du temps (élevages B et D).



Les premières cellules IgM⁺ sont détectées au 18^{ème} jour, correspondant à la même période que l'apparition des IgM détectées en ELISA, puis le nombre des cellules IgM⁺ augmente alors progressivement au cours du développement larvaire.

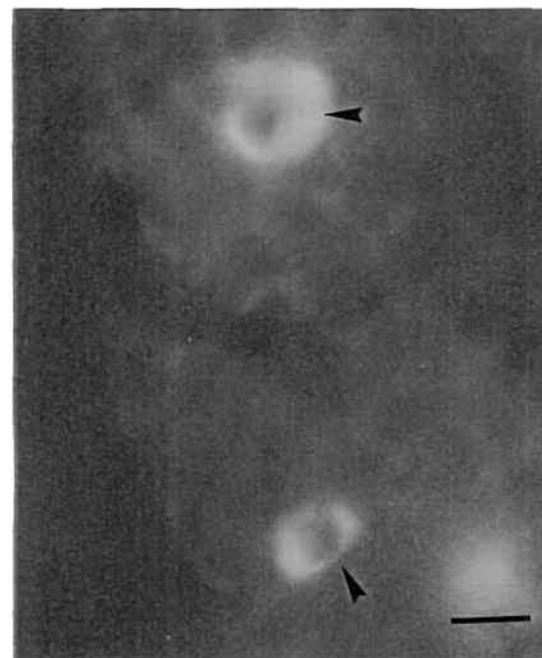
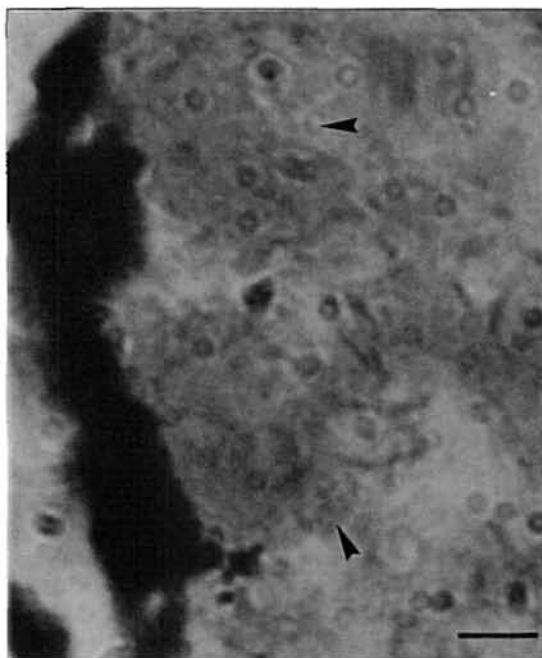
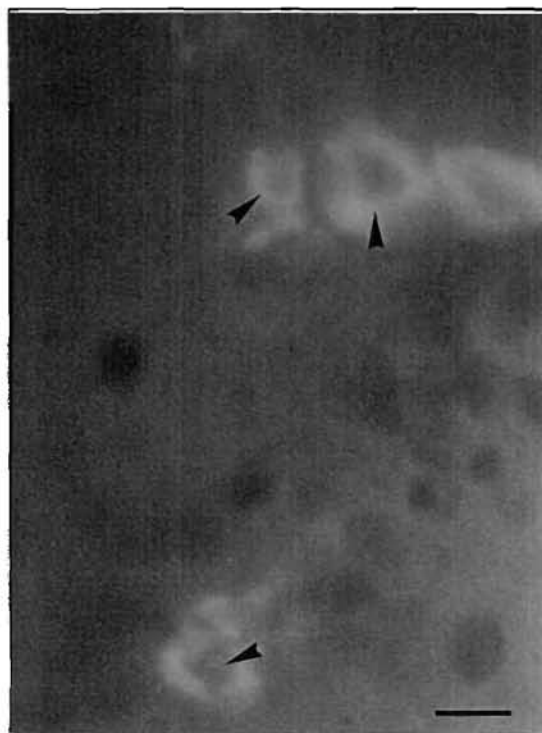
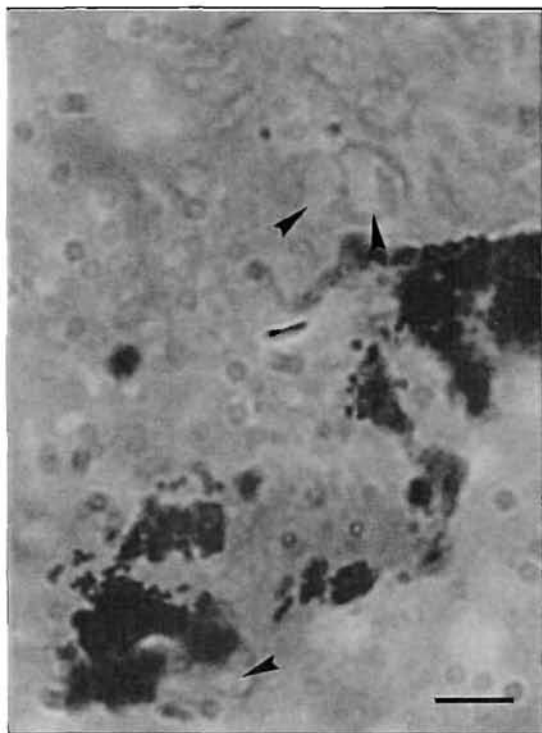
L'étude comparée de la cinétique d'apparition des IgM en ELISA et des cellules IgM⁺ est également riche d'enseignement. Le premier pic d'IgM détecté en ELISA coïncide avec l'apparition des cellules IgM⁺ observées en CMF. Le temps de latence entre l'apparition des premières cellules porteuses d'IgM de surface et des cellules B matures capables de synthétiser des IgM circulantes est en général de 15 jours chez la truite et de 5 à 10 jours chez le bar (Chapitre II, p. 55). Il est donc probable que les immunoglobulines détectées au cours du premier pic ELISA correspondent aux immunoglobulines de surface des cellules IgM⁺ dont la membrane a été broyée lors du protocole de préparation des échantillons et non à des IgM circulantes. Au delà du 40^{ème} jour, l'augmentation du taux d'IgM suit l'augmentation du nombre de cellules.

L'ontogenèse des IgM et des cellules productrices d'IgM évoluerait ainsi en deux phases. La première phase (du 30^{ème} au 40^{ème}) jour serait caractérisée par une multiplication cellulaire importante (visualisation de la population lymphocytaire en cytométrie de flux chez les larves de 40 à 46 jours) avec détection d'immunoglobulines à la surface des cellules, sans que la teneur en IgM globale augmente chez la larve (elle diminue même entre le 30^{ème} et le 40^{ème} jour). La seconde phase, du 50^{ème} au 95^{ème} jour, serait par contre, une phase de synthèse plus importante des IgM par les cellules IgM⁺ (cellules B).

Localisation des cellules IgM⁺ dans le pronéphros des larves (Planche XXIX).

Le marquage indirect de coupes en congélation de pronéphros de larves prélevées à différents stades de développement a été effectué (Tableau VI, Annexes IX et XI).

Planche XXIX : Mise en évidence de cellules IgM+ dans le rein antérieur de larves de bar âgées de 38 jours par marquage indirect FITC avec l'Acm 6E11



A: observation des cellules en microscopie. Barre = 6 μ m.

B: Observation en épifluorescence des cellules IgM+. Barre = 6 μ m.

Tableau VI : Mise en évidence de lymphocytes (IgM+) sur des coupes en congélation de rein de larves à différents âges.

Stade larvaire	Observation de cellules IgM+
L11	-
L38	+
L41	++
L48	++
L61	++
L74	+++

Quand l'Acm 6E11 est utilisé à la concentration optimale ($1.4 \mu\text{g.ml}^{-1}$) correspondant à la dilution 1/1000, les cellules réactives (cellules IgM⁺) sont observées dans le rein antérieur de larves âgées de 38 à 74 jours.

3.3.4. Conclusion

La cinétique d'apparition des IgM au cours du développement larvaire observée chez le bar est comparable (réserves faites des conditions différentes du développement larvaire et de la température d'élevage) à celles observées chez différents poissons: la truite arc en ciel (Castillo *et al.*, 1993), le tilapia (Takemura, 1993) et le saumon (Nagae *et al.*, 1993). Cependant l'observation, chez les larves de bar, d'un pic précoce correspondant à la détection d'immunoglobulines de surface n'a pas été décelé chez les autres espèces. Ces immunoglobulines pourraient correspondre à des immunoglobulines de surface (Kaattari, 1992) ou à des fragments d'immunoglobulines (chaînes μ) correspondants à des immunoglobulines cytoplasmiques (Zettergren, 1982; Kitamura et coll., 1992) provenant de cellules pré-B. Cette période est en outre caractérisée par une forte multiplication lymphocytaire visible à partir du 30^{ème} jour, chez les larves analysées en cytométrie de flux et, elle correspond à la phase de développement du thymus.

Origine de ces cellules

Si nous acceptons l'hypothèse selon laquelle le rein antérieur des poissons joue un rôle important dans la différenciation des cellules B au cours de l'ontogenèse (Razquin et coll., 1990), nous aurions dû détecter des cellules IgM⁺ dans le rein antérieur de larves âgées de 17 à 30 jours, c'est à dire au moment où des IgM sont détectées en ELISA et où des cellules IgM⁺ sont observées en cytométrie de flux. L'observation au 38^{ème} jour, c'est à dire relativement tard au cours de l'ontogenèse, de cellules dans le rein des larves est logique compte tenu de la sensibilité de la technique utilisée. En effet, les premières cellules IgM⁺ sont extrêmement difficiles à mettre en évidence car elles ne sont pas très abondantes dans le rein antérieur des larves observées au cours de cette période (Castillo et coll., 1993) alors que, l'examen de coupes histologiques ne permet pas d'observer un grand nombre de cellules. De plus, le marquage sur coupes histologiques n'est pas la méthode optimale pour mettre en évidence les immunoglobulines présentes à la surface des cellules, par comparaison avec l'observation de cellules entières en cytométrie de flux (CMF).

Enfin, une origine extra-rénale des cellules souches IgM⁺ ne doit pas être écartée puisque certaines cellules souches peuvent provenir du foie embryonnaire comme l'ont souligné LLoyd-Evans chez les sélaciens (LLoyd-Evans, 1993) et Van Rees et coll. (1990).chez les mammifères.

Acquisition de l'immunocompétence

L'acquisition de l'immunocompétence survient lorsqu'un nombre critique de cellules productrices d'IgM localisées dans les organes lymphoïdes est obtenu (Nakanishi, 1986). Chez le bar, nous avons vu que les différents organes lymphoïdes étaient bien développés chez les larves de 50 jours. A partir de cet âge, nous pouvons mettre en évidence une forte synthèse d'IgM et un grand nombre de cellules IgM⁺ dans les larves. Bien que la teneur sérique en IgM de ces larves soit très faible comparée à celle des poissons en grossissement, ces diverses observations suggèrent que l'immunocompétence est acquise chez les larves de bar âgées de 50 jours.

Cette hypothèse est corroborée par le fait que différentes données concernant la vaccination expérimentale contre la vibriose indiquent que des larves de 45 jours (200 mg de poids moyen) peuvent développer une réponse spécifique capable de les protéger contre une infection par l'agent pathogène (Vigneulle et coll., 1993).

Par contre, chez d'autres espèces, l'immunocompétence est achevée plus tardivement, vers le 54^{ème} jour chez les salmonidés (Ellis, 1977; Tatner, 1986), le 54^{ème} jour également chez la daurade (Josefsson et Tatner, 1993) et le 77^{ème} jour chez le Tilapia (Luft et coll., 1991) au 60^{ème} jour chez *Sebasticus marmoratus* (Nakanishi, 1986).

3.4. Conclusion

Cette étude a été menée en parallèle avec différentes techniques: immuno-cytologie sur empreintes d'organes, immuno-histologie sur coupes en congélation et immuno-marquage sur cellules en suspension (cytométrie en flux). Nous avons ainsi optimisé une méthode de marquage des cellules en cytométrie de flux (marquage direct) applicable chez les larves.

Cette étude représente ainsi, un inventaire assez complet de la population lymphocytaire IgM⁺ aussi bien sur le plan qualitatif (ultrastucture, histologie) que quantitatif (cytométrie de flux). De plus, elle nous permet de définir une période « **critique** » (du 20^{ème} au 40^{ème} jour d'élevage) correspondant à la mise en place du système immunitaire humoral chez les larves, et une période d'acquisition de l'**immunocompétence** qui se situerait vers le 54^{ème} jour.

**CHAPITRE IV: APPLICATION A UNE PATHOLOGIE
VIRALE A NODAVIRUS**

CHAPITRE IV: APPLICATION A UNE PATHOLOGIE VIRALE A NODAVIRUS

4-1. Objectifs de l'étude

Nous avons vu, lors des chapitres précédents, que le système immunitaire (immunité humorale spécifique) de la larve du bar se mettait graduellement en place au cours du développement et que, au cours de l'organogenèse et de l'ontogenèse des cellules IgM⁺, l'immunocompétence devait probablement être acquise vers le 54^{ème} jour d'élevage. Le système immunitaire des larves de bar présente donc une étape « critique » entre le moment où les immunoglobulines « vitellines » d'origine maternelle ont disparues (4^{ème} jour) et celui où la larve acquiert son immunocompétence (54^{ème} jour). Au cours de cette étape, que nous qualifierons de « phase critique » les premiers, et les seuls, systèmes de défense des larves sont l'expression de l'immunité non-spécifique (Ingram, 1980). La mortalité des larves dans les élevages à la suite du développement d'une pathologie virale à nodavirus survenant fréquemment au cours de cette étape, montre tout l'intérêt d'une étude portant sur les modes de transmission de cette pathologie ainsi que sur les moyens de prévention applicables dans une éclosierie.

La mise en évidence d'un transfert d'immunoglobulines dans les œufs et les larves (Chapitre II, p. 66) ouvre ainsi, des perspectives nouvelles de recherche qui, traduites en terme d'objectifs, soulèvent plusieurs questions parmi lesquelles:

(i) Ces immunoglobulines jouent-elles un rôle dans la protection des larves contre un agent pathogène ?

(ii) Quelles sont les possibilités d'induire, puis d'augmenter ce type de protection passive chez les larves?

Après avoir mis au point et optimisé le titrage des anticorps anti-nodavirus, nous avons essayé d'apporter quelques éléments de réponse à ces différentes questions

-en réalisant l'étude de l'immunité spécifique anti-nodavirus chez l'adulte après une contamination naturelle ou une vaccination expérimentale (vaccin inactivé).

-en définissant un modèle de contamination expérimental des larves et des œufs par épreuve virulente. Ce modèle nous a ainsi permis d'aborder les études relatives à la transmission d'une protection passive chez les larves issues de géniteurs vaccinés.

4.1. Immunité spécifique et vaccination.

4.1.1: Matériel et méthodes

Purification du virus (Annexe XV).

Des larves présentant des symptômes ainsi que des lésions d'encéphalite virale (larves récoltées en 1991) sont homogénéisées dans du tampon PBS pH 7,2 par broyage avec un Ultraturax. La suspension est alors clarifiée par différentes centrifugations suivies d'une centrifugation sur gradient de saccharose 20/40% (poids/poids) puis sur gradient de chlorure de Césium 25/38% (poids/poids).

Les particules virales sont localisées dans la bande inférieure du gradient de chlorure de Césium correspondant à une densité de 1.30 à 1.33 g.cm³ (Breuil et coll., 1991; Comps et coll., 1994). Cette fraction est récupérée à l'aide d'une seringue, diluée dans du PBS 0.1X et les particules virales sont mises au culot une dernière fois pendant 2 heures à 41 000 tours/minute dans un rotor Beckman SW41. Le culot contenant les particules virales purifiées est remis en suspension dans du PBS 0.1X et la concentration en virus est déterminée par spectrophotométrie (Annexe XV).

Pour le calcul de la concentration virale, nous avons utilisé la formule de Harlow et Lane (1988):

$$\text{Concentration virale (mg. ml}^{-1}\text{)} = 1.55 \text{ DO}_{280} - 0.76 \text{ DO}_{260}$$

Selon cette formule la concentration de la suspension virale est de 0,555 mg ml⁻¹. Cette estimation est légèrement supérieure à celle donnée par la formule de Arimoto et coll. (1996): Concentration virale = DO₂₆₀ /5. pour laquelle la concentration de la suspension virale est de 0,404 mg.ml⁻¹.

préparation du vaccin

La suspension virale (555 µg.ml⁻¹) préparée selon le protocole décrit précédemment est stérilisée pendant 2 heures au bain-marie à 100°C puis stockée à +4°C. Le vaccin expérimental est préparé extemporanément pour la primo vaccination, en émulsionnant la suspension virale inactivée par la chaleur avec une quantité égale d'adjuvant incomplet de Freund (AIF). Chaque femelle de bar adulte (total 5 femelles) reçoit une double dose de vaccin (0.2 ml en inoculation intrapéritonéale et 0.2 ml en inoculation sous cutanée au niveau du repli situé derrière la nageoire dorsale), soit 0.4 ml de suspension contenant 100 µg de virus. Deux rappels sont effectués à J30 et J63 par injection sous cutanée, au niveau du repli de la nageoire dorsale, de 0,2 ml d'une solution virale (0,300 µg.ml⁻¹) sans adjuvant de Freund.

Titration des anticorps sériques

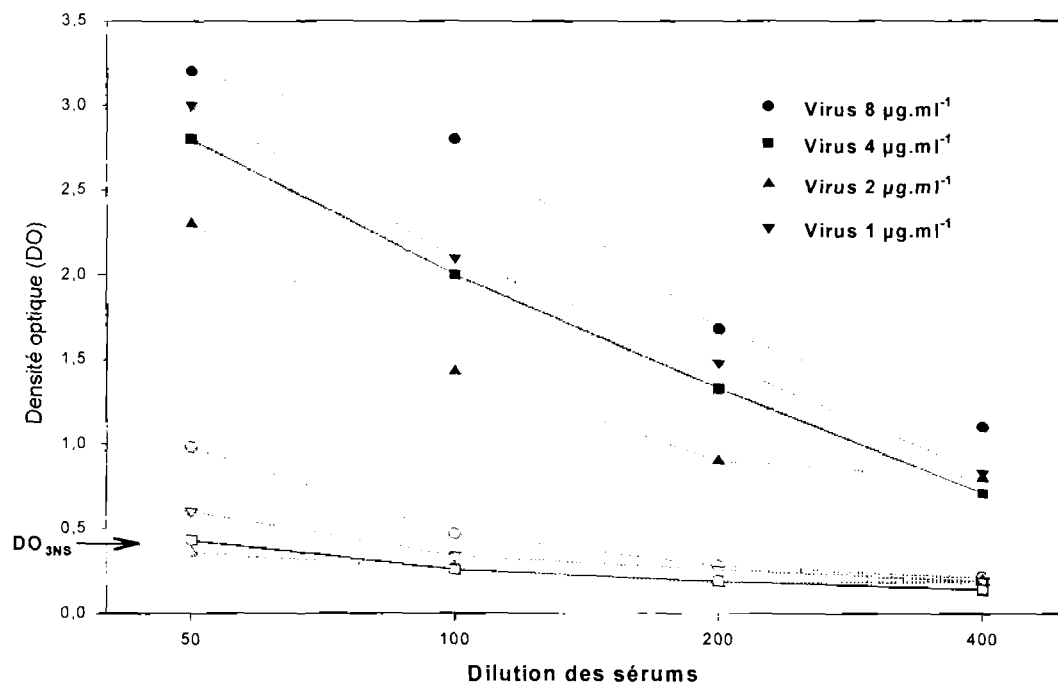
Dosage des anticorps sériques anti nodavirus et exemple de calcul (Annexe XVII)

Le dosage des anticorps est réalisé par un ELISA dont le principe est représenté sur la Figure B de la Planche VIII (chapitre II, p 52). Un premier anticorps (IgG de lapin dirigé contre le nodavirus) est utilisé pour capturer des particules virales qui sont disposées au fond des puits de la plaque ELISA. Le sérum de poisson à analyser est déposé à différentes dilutions. Les étapes suivantes ont pour but de révéler la présence des anticorps fixés par les

particules virales et sont identiques à celles décrites pour le dosage des IgM vitellines. L'Acm spécifique de la chaîne lourde des IgM (Acm 6E11 biotinylé) se fixe sur les immunoglobulines du bar, puis la streptavidine conjuguée à la peroxydase (Streptavidine-POD) vient se fixer sur l'anticorps monoclonal biotinylé. La coloration en jaune du substrat (OPD) en présence de l'enzyme (POD) est dosée par lecture à 492 nm.

L'optimisation des deux premières étapes de l'ELISA (concentrations d'anticorps et de virus) nous a permis de mettre en évidence qu'une meilleure titration des anticorps sériques anti-nodavirus est obtenue avec une suspension virale de $4 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Figure 23).

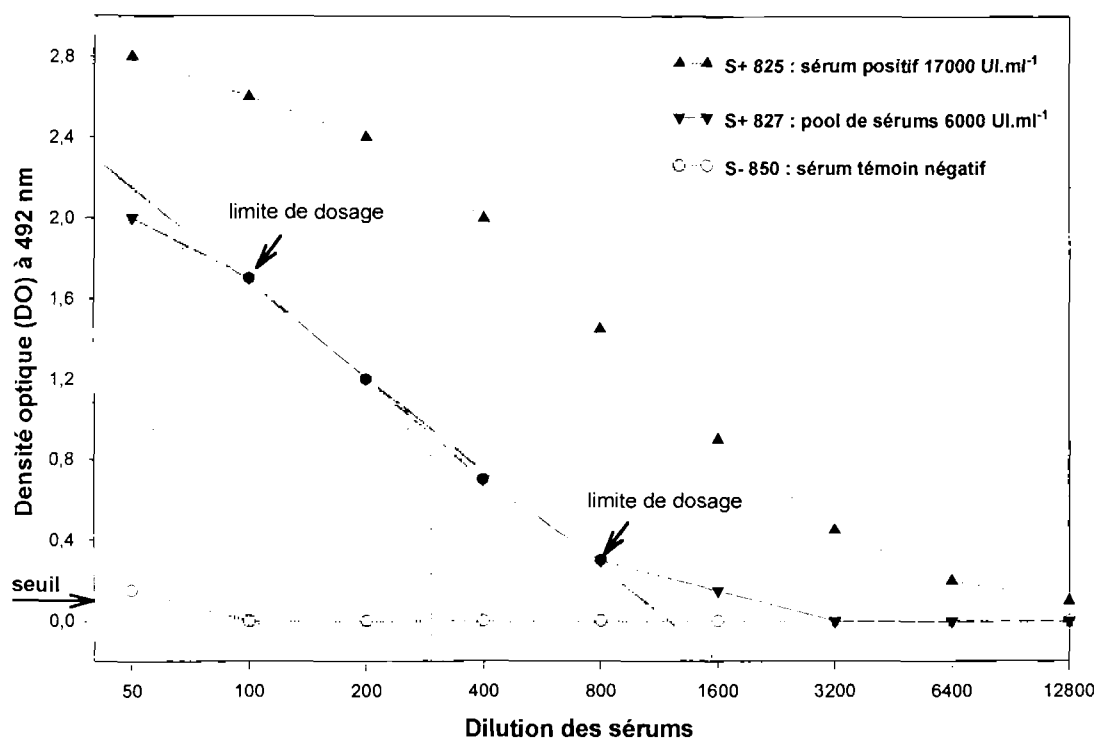
Figure 23: Optimisation du dosage des anticorps sériques anti-nodavirus du bar.



Une suspension contenant $4 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de virus permet un meilleur dosage des anticorps sériques anti-nodavirus car (i) le signal (DO) du sérum témoin négatif (S-) est minimal et inférieur au seuil de sensibilité, (ii) le coefficient de la droite de régression du sérum positif est optimal ($r^2 > 0,95$) et (iii) les différences des DO entre le sérum positif (S+) et négatif (S-) sont maximales pour les dilutions 1/50 et 1/100.

Avant d'effectuer le calcul du titre des anticorps sériques, nous avons préparé un sérum positif de référence (S827) constitué par le pool des sérums provenant de 10 reproducteurs malades (M1 à M10). A partir de ce sérum, nous avons déterminé les titres individuels de ces 10 sérums ainsi que ceux d'autres reproducteurs apparemment « sains » (Figure 24).

Figure 24: Courbe de dosage des anticorps anti-nodavirus dans le sérum de trois poissons.



La densité optique correspondant à 50% de liaison ($DO_{50\%}$) du sérum S827 de référence est obtenue pour la dilution de 1/300 (Dil = 300), et le titre de ce sérum est donné par la formule:

$$\text{Titre (UI.ml}^{-1}\text{)} = \text{Dil.} \cdot 10^3 / 50^* \text{ (* prise d'essai).}$$

soit un titre de 6000 UI.ml⁻¹ pour le sérum S827.

Un calcul identique effectué pour le sérum S825 donne 17 000 UI.ml⁻¹. Ce sérum, provenant d'un reproducteur malade (M10), a alors été utilisé comme sérum de référence dans la suite de nos différents dosages (Chapitre II, p. 52).

4.1.2. Résultats

Sérologie des géniteurs.

Après la réalisation des tests ELISA précédents, nous avons dosé les anticorps sériques anti-nodavirus chez 78 reproducteurs provenant de 5 bassins différents (A à E). Chaque individu a alors été classé dans une des trois catégories suivantes (Tableau XIV):

Le lot S- regroupe les individus dont le sérum est dépourvu d'anticorps ($DO < \text{seuil de sensibilité}$). Le seuil de sensibilité correspond à la densité optique lue avec la dernière dilution du sérum de référence (S827) donnant une DO significativement différente de la dilution suivante. Pour le dosage effectué avec le sérum S827, ce seuil correspond à la DO obtenue pour la dilution 1/3200 du sérum (Figure 24).

Le lot S+ regroupe les individus dont le sérum présente des anticorps (DO comprise dans les limites du dosage). Dans le cas d'un dosage effectué avec le sérum de référence S827, la densité optique du sérum à analyser doit être comprise entre 0,4 et 1,8 (Figure 24).

Le lot « douteux » regroupe les individus dont le sérum ne peut être titré (DO comprise entre le seuil de sensibilité de l'ELISA et la limite inférieure de dosage).

Tableau XIV: Résultats sérologiques de 78 géniteurs de bar

catégorie	S+	S-	« douteux »
nombre d'individus	12	44	22
pourcentage	15,3 %	56,4 %	28,2 %

Les résultats de la titration des anticorps sériques de ces géniteurs indiquent qu'une importante proportion de ceux-ci (56%) sont dépourvus d'anticorps. Seuls 15 % des reproducteurs présentent un titre en anticorps élevé pouvant être dosé ($\text{Titre} > 1500 \text{ UI.ml}^{-1}$). Enfin, 29 % des reproducteurs sont classés comme « douteux » car bien que la densité optique (DO) de ces sérums soit significativement différente de celle des sérums négatifs, le titre en anticorps ne peut être dosé ($DO < \text{limite de dosage}$).

Ces résultats ne sont donnés qu'à titre indicatif car les analyses ont été réalisées ponctuellement.

Un dépistage sérologique effectué chez le « striped jack » (Mushiake et coll., 1992), a permis de détecter une proportion importante (65 %) de reproducteurs ayant des anticorps dirigés contre le nodavirus (SJNNV). Cependant la tentative de constitution de lots de reproducteurs indemnes de virus, sur la base de cette détection, se solda par un échec car, quelques individus dépourvus d'anticorps se révélèrent porteurs de virus et *vice versa*. Toutefois, cette expérimentation menée au Japon ne prouve pas, de façon concluante, qu'un sérodiagnostic soit inapplicable pour la sélection des reproducteurs car la technique de dépistage employée était basée sur une seule mesure par individu. De plus, la sensibilité de l'ELISA était probablement insuffisante puisque la séropositivité du sérum était basée sur l'observation d'une densité optique ($DO > 0,1$) à peine supérieure à celle du témoin négatif.

Sur la base de ces observations, nous avons testés par notre technique ELISA, à trois reprises, sur une période de 5 mois, les sérums des reproducteurs d'un bassin contaminé (bassin G9) dans lequel un géniteur malade avait été diagnostiqué auparavant (Tableau XV).

Nous observons que les taux d'anticorps sériques anti-nodavirus des femelles sont assez stables au cours de cinq mois de maintien dans le même bassin. Les seules variations sérologiques importantes ayant entraîné un changement d'affectation dans le groupe de classement initial concernent deux poissons du groupe douteux: l'individu F4452 devient séropositif au mois de mars 97, alors que le poisson F8171 est déjà négatif à la deuxième analyse de Novembre. Les titres sérologiques de la femelle positive (F3167) diminuent au cours du temps.

Chez les mâles du même bassin, seuls trois poissons sur 24 ont été classés dans le groupe « douteux » (résultats non montrés) tout au long de la période d'observation.

Tableau XV: Evolution du titre anticorps (UI.ml⁻¹) des reproducteurs femelles d'un bassin de géniteurs pendant 5 mois (Novembre à Mars).

Groupe	individus	9/11/95	30/11/95	7/03/96
Négatifs	<i>F9538</i>	S	S	S
	<i>F9285</i>	S	S	S
	<i>F7879</i>	S	S	S
	<i>F7531</i>	S	S	S
	<i>F3759</i>	S	S	S
	<i>F7752</i>	S	S	S
	<i>F6480</i>	S	S	S
	<i>F8171</i>	S	S	S
	<i>F4013</i>	S	S	S
	<i>F1020</i>	S	S	S
	<i>F8171</i>	D	S	S
Positifs	<i>F3167</i>	3296	2736	1035
	<i>F4452</i>	D	D	896
Douteux	<i>F3299</i>	D	D	D
	<i>F6495</i>	D	D	D
	<i>F6811</i>	D	D	S
	<i>F1063</i>	D	D	D
	<i>F9276</i>	D	D	D

D: douteux, S: sain, P: positif.

Ces résultats montrent que la réponse sérologique des reproducteurs est relativement stable, et cette observation pourrait indiquer que la contamination virale directe, de poisson à poisson, est peu importante dans un bac de géniteur. De plus, nous observons que les poissons séropositifs d'un lot de reproducteurs sont le plus souvent des individus femelles, ce qui pourrait suggérer que des manipulations diverses: biopsies, prélèvements de sang, marquage, peuvent être à l'origine de la transmission de l'agent pathogène.

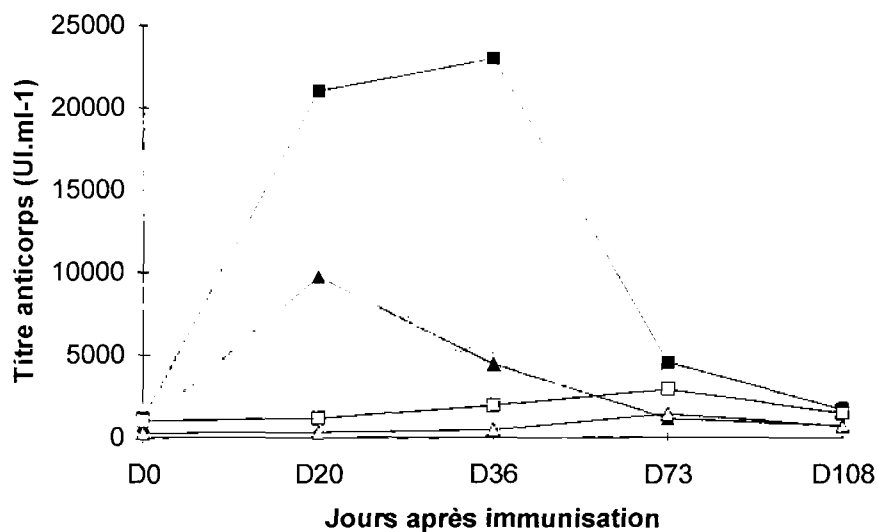
Enfin, signalons que la titration des anticorps sériques nous a permis de **sélectionner** les reproducteurs **séronégatifs** nécessaires pour effectuer les **expérimentations d'immunisation** des reproducteurs et de **transmission** de la maladie aux larves.

Vaccination des reproducteurs: cinétique d'apparition des anticorps.

Deux femelles, provenant du lot de poissons dépourvus d'anticorps anti-nodavirus ont été immunisées avec le vaccin inactivé expérimental (une seule inoculation de 0,2 ml de vaccin) et deux autres avec de l'adjuvant incomplet de Freund (Témoin).

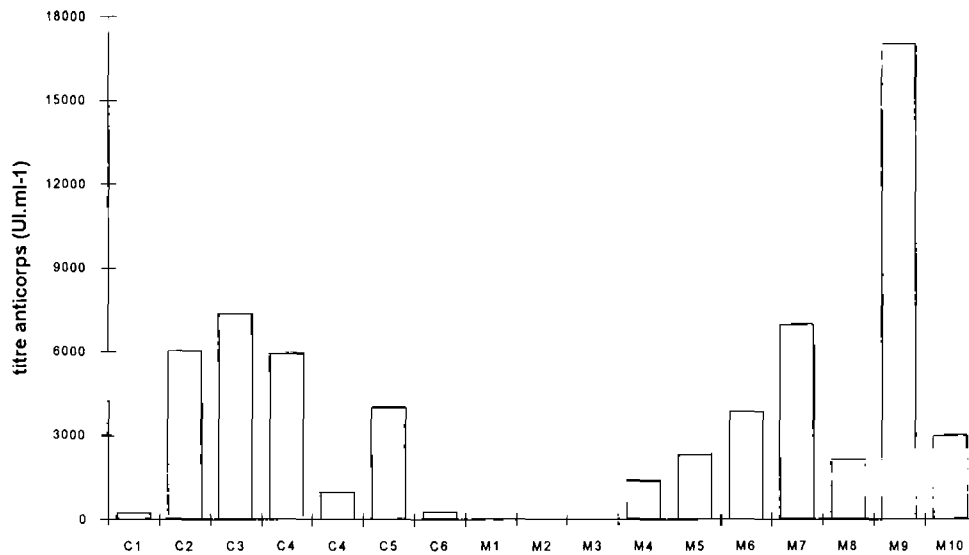
la cinétique d'apparition des anticorps anti-nodavirus de chaque poisson est représentée dans la figure 25.

Figure 25: Variation du taux d'anticorps anti-nodavirus (UI.ml⁻¹) après immunisation avec un vaccin inactivé expérimental.



Il apparaît que des titres élevés en anticorps (5000 et 22000 UI.ml⁻¹) sont obtenus chez les poissons vaccinés dès le 20^{ème} jour suivant la vaccination. A l'exception du poisson M9, les titres anticorps des poissons immunisés sont supérieurs à ceux des poissons malades (groupe M) et à ceux des poissons probablement contaminés (groupe C) provenant du même bassin (Figure 26). Enfin, la diminution importante du taux d'anticorps après le 73^{ème} jour montre la nécessité d'effectuer des rappels vaccinaux à J36 et J63 pour maintenir un taux élevé d'anticorps sériques chez les reproducteurs. Ces résultats indiquent que le vaccin expérimental inactivé par la chaleur est un bon immunogène.

Figure 26: Titre d'anticorps sériques chez des reproducteurs d'un bassin dont certains individus (M) présentent des symptômes et des lésions d'encéphalite virale alors que d'autres, apparemment « sains », sont probablement contaminés (C).



Existence d'une isotypie dans le sérum des malades ?

Loob (1986) observe une expression différentielle de certains isotypes d'IgM après immunisation avec différents anticorps couplés au DNP chez la truite. Ce phénomène d'isotypie observé après une immunisation expérimentale à également été observé dans le cas de certaines maladies touchant la truite Arc en Ciel (Sanchez et coll., 1989). Les bases biochimiques et moléculaires de cette isotypie ne sont toujours pas établies. Une hétérogénéité dans le poids moléculaire des chaînes L des IgM du poisson chat aurait été observée (Loob et Olson, 1988).

Comme nous l'avons vu précédemment (Chapitre II, p. 68), nous avons cherché l'existence d'une isotypie en comparant le pourcentage de reconnaissance des IgM sériques par l'Acm 6E11 dans le sérum de bars atteints d'encéphalite virale (nodavirus), dans celui de poissons contaminés (séropositifs) et dans celui de poissons « sains » (séronégatifs).

Tableau XVI: Pourcentage de reconnaissance par l'Acm 6E11 des IgM sériques provenant de poissons non virosés, contaminés et malades.

	Non virosés	Contaminés	Malades
nombre individus	16	16	8
pourcentage de reconnaissance	70,6±9,7	65,3±4,8	48,8±8,5
IgM (mg.ml ⁻¹)	14,3±2,2	17,9±3,2	4,3±1,3

Le pourcentage de reconnaissance des IgM du bar par l'Acm 6E11 est différent significativement entre le groupe des individus malades et celui des autres groupes: individus « sain » séronégatifs, et « contaminés » séropositifs. Chez les individus « sains », le pourcentage de reconnaissance de 'IgM sérique est assez élevé (70,6%). Ce pourcentage diminue légèrement (65,3 %) chez le groupe « contaminé » (différence non-significative par rapport au groupe « sain ») et significativement chez les malades. De plus, chez ces derniers, le pourcentage de reconnaissance est variable selon les individus, et devient minimal (34,5±7,1), chez ceux dont le taux d'IgM est le plus faible (< 5 mg.ml⁻¹) indiquant que ces derniers sont en phase terminale de l'évolution de la maladie.

Ces différents résultats indiquent qu'il existe une isotypie puisque le pourcentage de reconnaissance de l'IgM par l'Acm 6E11 baisse significativement chez les poissons malades.

Une diminution du pourcentage de reconnaissance des IgM a également été observée chez des truites atteintes de Nécrose pancréatique infectieuse (Sanchez et coll., 1989). Le pourcentage de reconnaissance de l'IgM sérique par un anticorps monoclonal passe alors de 30% chez des truites saines à 14,3 % chez des malades.

Après avoir défini la réponse humorale des reproducteurs, nous avons constitué un lot de reproducteurs séronégatifs pour étudier la transmission de la maladie aux larves, ainsi qu'un lot de femelles vaccinées pour étudier la transmission de l'immunité passive aux œufs et aux larves.

4.2. Transmission expérimentale de la maladie

Selon le postulat de Koch, l'origine virale d'une maladie nécessite la reproduction des symptômes et des lésions après infection expérimentale avec l'agent pathogène. Dans le cas de l'encéphalite des poissons, cette origine virale n'a pas été démontrée chez toutes les espèces étudiées. Ainsi, la maladie a été reproduite chez les larves et les juvéniles de mérou (Mori et coll., 1991) et chez les larves de « striped Jack » (Arimoto et coll., 1993 et 1996). A l'exception du mérou, la transmission de la maladie chez des alevins d'autres espèces comme le bar (Bellance et Gallet de Saint Aurin, 1988) ou le « striped jack » (Arimoto et coll., 1993) n'a pas encore été réalisée. Aussi, la **transmission de la maladie par contamination expérimentale** (épreuve virulente) de **larves ou d'œufs de bar** devait donc être abordée et démontrée.

D'autre part, la possibilité d'une transmission verticale de l'agent pathogène, par l'intermédiaire d'une ponte contaminée, a été démontrée chez le « striped jack ». Le virus a été détecté dans les pontes au moyen de tests ELISA (Arimoto et coll., 1992) et de techniques « Polymerase Chain Reaction : PCR » (Mushiake et coll., 1994). Ces deux méthodes ont également été utilisées pour la détection des individus porteurs de virus au moyen d'un dépistage sérologique par ELISA (Mushiake et coll., 1992) ou par PCR effectuée sur des œufs et des ovocytes (Mushiake et coll., 1994). Chez le bar, l'existence d'une transmission verticale du virus n'est pas démontrée mais est fortement soupçonnée car des particules virales ont également été détectées dans les pontes (Comps et coll., 1996; Baudin-Laurencin pers. comm.).

Aussi, pour éliminer la possibilité qu'une transmission verticale du virus vienne fausser nos expérimentations, nous avons effectué les contaminations virales sur des larves provenant de reproducteurs « sains », c'est à dire, dépourvus d'anticorps sériques (groupe S-).

4.2.1. Contaminations expérimentales de larves (L1 et L4) à différentes températures d'élevage.

Protocole expérimental

Les larves de bar (stades L1, L4 et L10) sont prélevées dans les incubateurs et placées sur un tamis de 200 μm . L'ensemble des opérations se déroule à température constante voisine de celle de l'eau de mer des incubateurs. La contamination virale (épreuve virulente) est alors effectuée en immergeant le tamis pendant 10 minutes dans une eau de mer contenant 2.2 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ de virus (200 μl d'une suspension virale contenant 550 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ de virus dans 50 ml d'eau de mer) ou de l'eau de mer (témoin). Après un bain de 10 minutes, les larves sont rincées délicatement avec de l'eau de mer et placées, à raison de 500 larves/litre, dans des cristallisoirs de 3 litres thermostatés.

Différentes températures (13 à 17°C) ont été testées afin de déterminer l'optimum thermique pour l'apparition de la maladie. A partir du stade L10, les larves sont nourries avec des proies vivantes (nauplii d'*Artemia salina*).

Chaque jour, les larves présentant des symptômes de « tournis » sont récupérées et fixées dans du fixateur de Davidson pour être examinées en histo immunologie après un marquage FITC indirect avec un sérum purifié (IgG) de lapin anti-nodavirus (Annexe XVI). Cette technique permet de vérifier la présence de lésions virales dans le cerveau et de confirmer le diagnostic d'encéphalite virale.

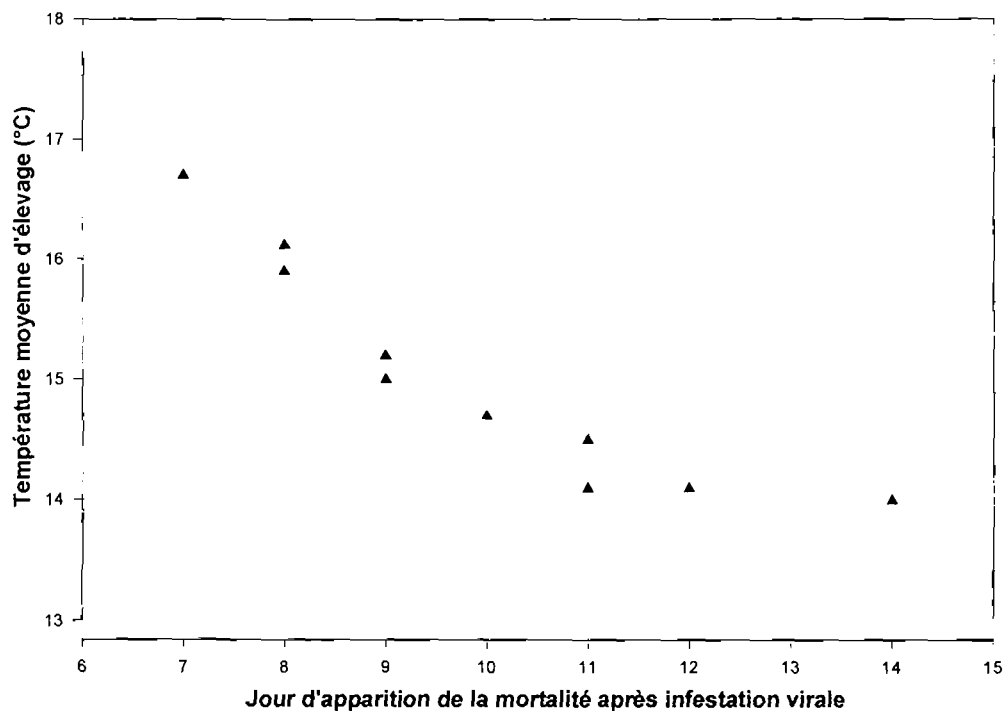
Résultats

Une première période, dite de latence, est caractérisée par l'observation, sur l'ensemble de nos expérimentations, d'une faible mortalité qui n'excède pas 1% par jour. Chez les lots contaminés, cette période de latence est suivie d'un pic de mortalité de deux à trois jours au cours duquel la

mortalité cumulée est en général supérieure à 50 % du lot. Ce pic de mortalité se déclare deux à trois jours après l'observation des premières manifestations cliniques de l'encéphalite virale. Chez les lots témoins, ce pic de mortalité n'est jamais observé et la mortalité reste faible (mortalité cumulée inférieure à 15%) et régulière tout au long de l'élevage.

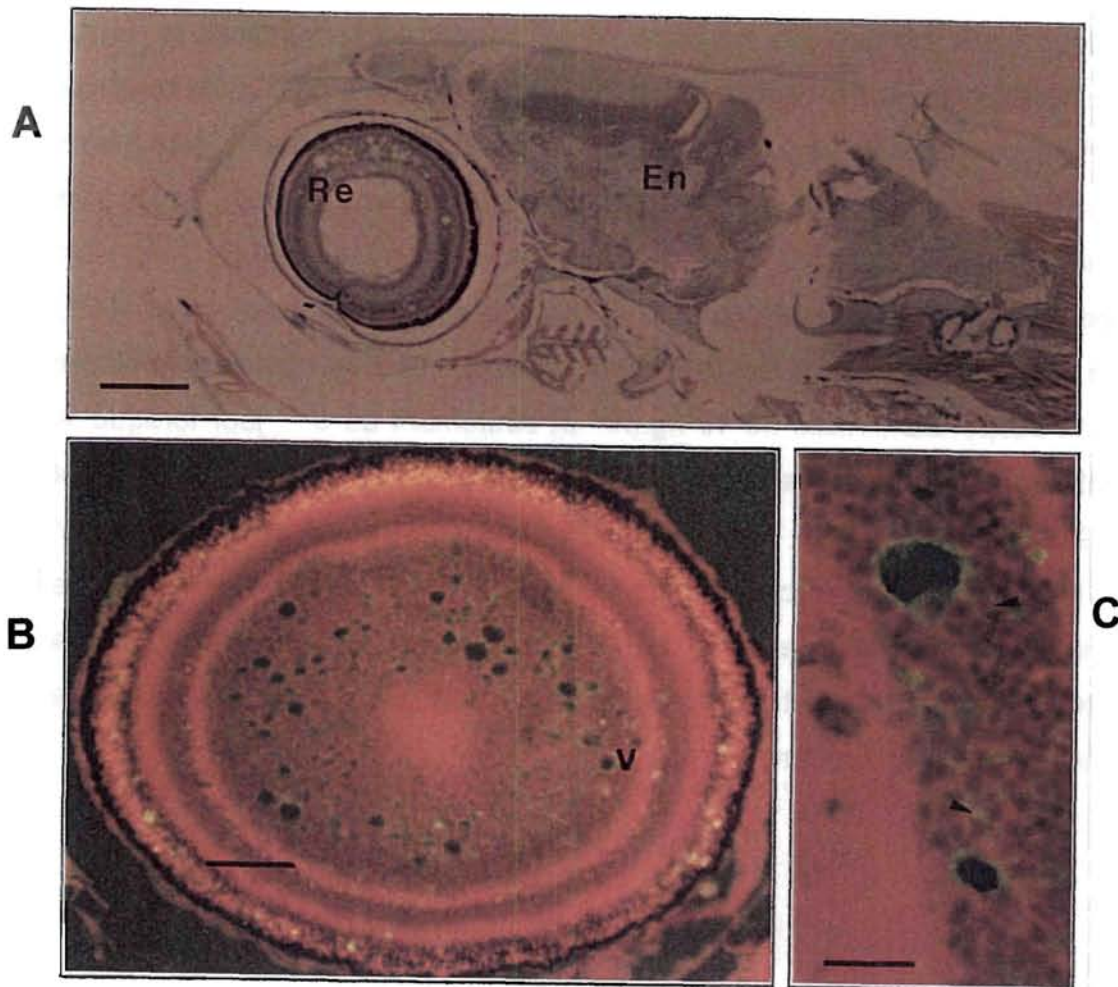
On peut également noter qu'en fonction de la température d'élevage, ce pic de mortalité survient entre le 8^{ème} et le 15^{ème} jours suivant la contamination virale (Figure 26).

Figure 26 : Influence de la température d'élevage sur la durée d'incubation de la maladie après contamination expérimentale des larves (L1 à L4) de bar.



Les larves malades présentent des lésions virales caractéristiques de l'encéphalite virale (Planche XXX, Figure A et B). La vacuolisation de la rétine et du cerveau est importante chez les larves contaminées qui ont été élevées à une température inférieure à 15°C (Planche XXX, Figure A). Dans le cerveau des larves élevées à température plus chaude, de nombreuses cellules nerveuses infectées par le virus sont visibles après marquage FITC alors que les vacuoles sont peu abondantes. Nous n'avons jamais observé de symptômes ni de lésions virales chez les larves des lots témoins non contaminées.

Planche XXX Coupes transversales au niveau de l'encéphale et des yeux de larves de bar âgées de 20 jours ayant été contaminées expérimentalement par le virus au stade de larve L4 et élevées à 14°C.



A: Coloration Eosinate d'azur. Les lésions virales (vacuoles) sont surtout localisées dans la rétine (Re). L'encéphale (En) est peu atteint. Barre = 200 μ m.

B et C: Observation de la rétine en épifluorescence après marquage FITC indirect avec un anticorps anti-nodavirus. Importantes lésions virales (V) avec fluorescence des cellules (Flèches).

B: Barre = 50 μ m, **C:** Barre = 25 μ m.

Pour une même concentration virale infectante, la durée d'incubation de la maladie est étroitement liée à la température d'élevage des larves. Une température moyenne comprise entre 14 et 15°C, dans nos conditions expérimentales, est représentative des conditions de température relevées dans les élevages larvaires réalisés dans les écloséries. L'influence de la température sur le développement de la maladie en éclosérie a été également signalée par Bellance et Gallet de Saint Aurin (1988).

Nos résultats concordent avec les rares cas de transmission de la maladie au stade larvaire que nous avons pu trouver dans la littérature. Ainsi, chez le « stripped jack » (température d'élevage de 19 à 23°C) la mortalité survient 5 jours après la contamination des larves (L1) par un bain d'une heure dans une suspension virale de 10 à 100 ng.ml⁻¹ (Arimoto et coll., 1993). De plus, la mortalité apparaît plus tardivement lorsque la contamination est réalisée avec des concentrations plus faibles de virus: Arimoto et coll. (1996) signale l'apparition d'une mortalité 7 jours après une épreuve virulente réalisée avec une suspension virale de 10 ng.ml⁻¹ et seulement au 9^{ème} jour lorsque la concentration virale est plus faible, comprise entre 0.1 et 1 ng.ml⁻¹ (Arimoto et coll., 1993). Chez le mérrou, dont la température d'élevage se situe entre 25 et 27°C, la mortalité se déclare entre le 10^{ème} et le 14^{ème} jour après la contamination virale (Mori et coll., 1991). Cette expérimentation représente la seule tentative réussie de transmission de la maladie chez un alevin dont la taille moyenne est de 85 mm.

4.2.2. Transmission d'une protection chez les larves

Dans le chapitre II (p. 61), nous avons mis en évidence l'existence d'immunoglobulines dans les oeufs du bar et nous avons localisé ces dernières dans et sous la membrane (chorion). Dans la mesure où le taux de ces immunoglobulines chez les larves diminue rapidement avec l'âge, il était

logique de rechercher l'existence d'une protection au stade œuf puis de la confirmer dans les stades ultérieurs (L1, L2 et L3).

Protocole expérimental

La ponte issue d'une femelle vaccinée (individu F6049) selon le protocole décrit précédemment (Chapitre III, p.129) a été récupérée par stripping et fécondée avec le sperme d'un mâle également vacciné. La ponte provenant d'une femelle non vaccinée et servant de témoin pour notre expérimentation a été fécondée par le sperme de ce même mâle.

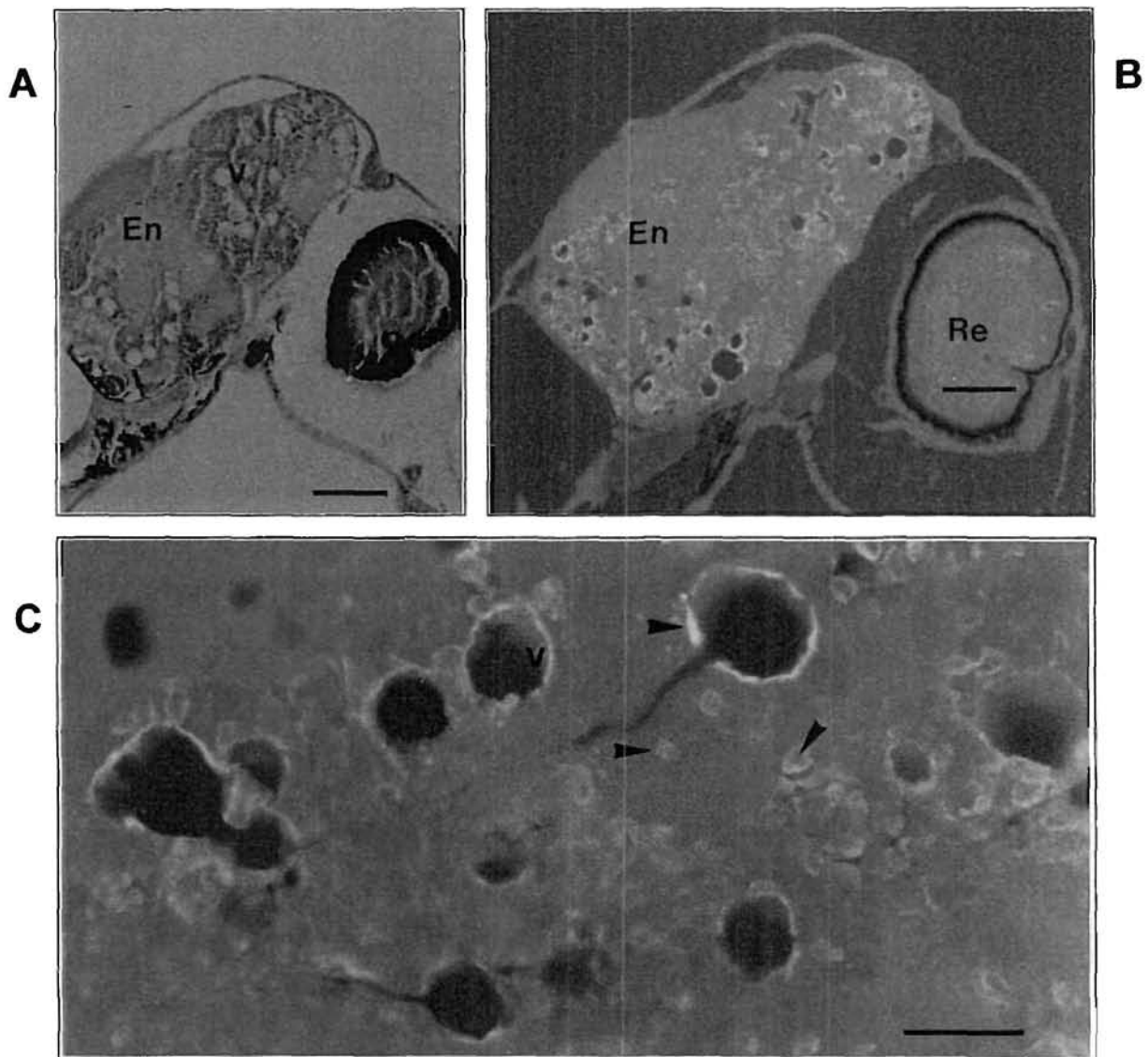
Ces deux pontes ont été contaminées expérimentalement puis mises en élevage afin d'étudier l'existence d'une protection dans les œufs issus de la femelle vaccinée.

La contamination des œufs a été réalisée au troisième jour d'incubation selon un protocole expérimental identique à celui décrit pour la contamination des larves. Le lendemain, jour de l'éclosion, les larves L1 ont été récupérées à la surface des cristallisoirs et transférées dans un second cristallisoir. Une contamination des larves au stade L5 a également été réalisée. Pour chaque ponte, les expérimentations ont été effectuées en duplicats et à deux températures d'élevage (14 et 18°C), de plus un lot d'œufs ou de larves non contaminés sert de témoin (témoin non-contaminé).

Résultats

On observe l'apparition de symptômes de tournis chez les larves issues de la ponte provenant de la femelle non vaccinée entre le 4^{ème} jour (18°C) et le 7^{ème} jour (14°C) d'élevage (Tableau XVII). La mortalité est moins massive que celle observée après une contamination réalisée au stade de larves L1 ou L4. Cependant, les lésions neurologiques observées au 11^{ème} jour sont beaucoup plus spectaculaires et abondantes (Planche XXXI, p. 144), que celles observées après une contamination au stade L1 (Planche XXX, Figure B, p. 155).

Planche XXXI coupes transversales au niveau de l'encéphale et des yeux de larves de bar âgées de 11 jours ayant été contaminées expérimentalement par le virus au stade oeuf et issues d'une femelle non vaccinée.



A: Coloration éosinate d'azur. Nombreuses vacuoles (V) visibles dans l'encéphale. Barre = 50 μ m.

B et C: Observations en épifluorescence après marquage FITC indirect avec un anticorps anti-nodavirus. Fluorescence importante des cellules et du pourtour des vacuoles (flèches)

B: Barre = 50 μ m, **C** Barre = 25 μ m.

Tableau XVII: Contamination expérimentale d'œufs issus d'une femelle vaccinée (F6049) et non vaccinée (naturelle)

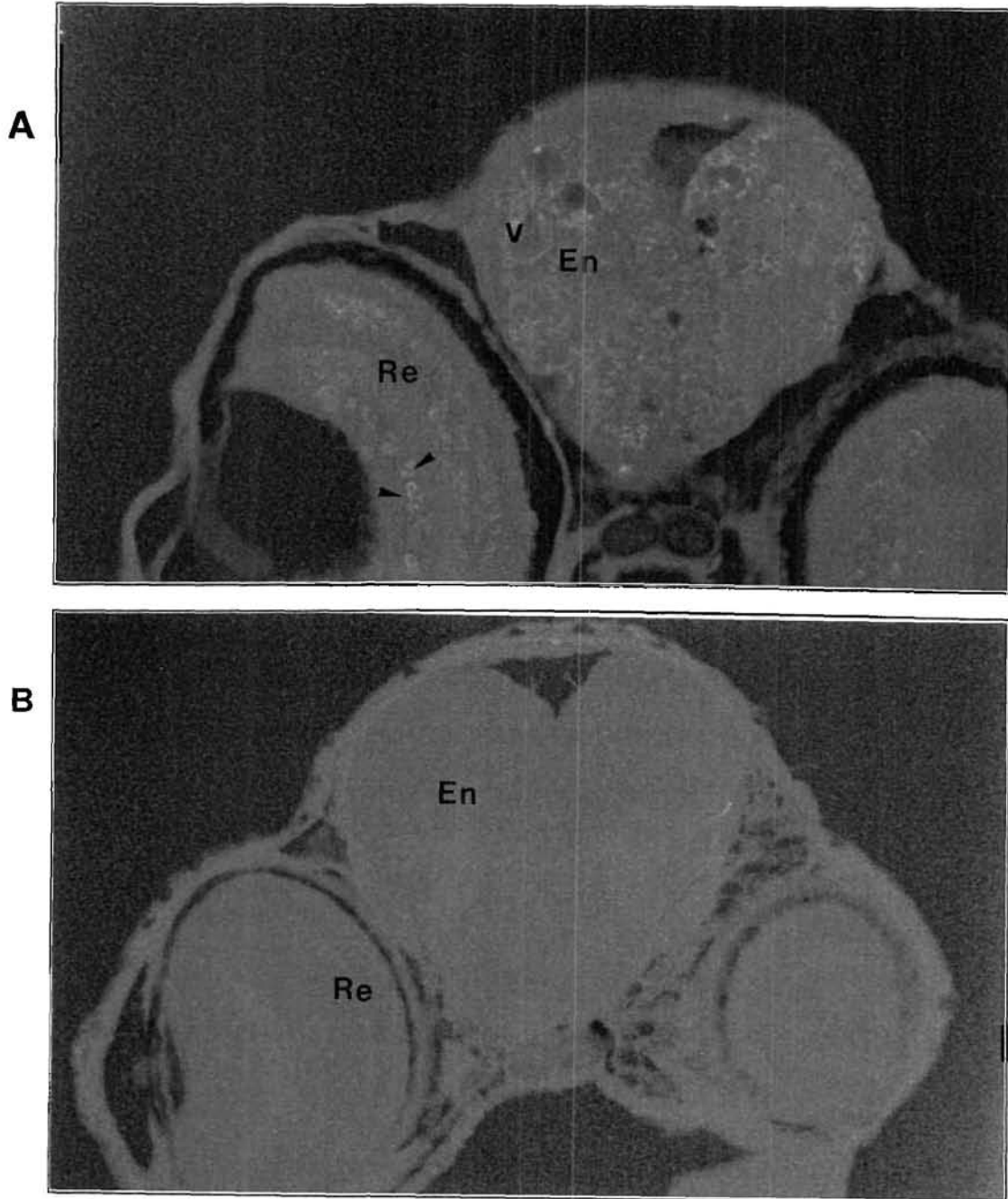
<i>Date</i>	<i>Non vaccinée témoin</i>	<i>Vaccinée témoin</i>	<i>Vaccinée contaminée</i>	<i>Non vaccinée contaminée</i>	<i>Non vaccinée contaminée</i>
	14 et 18°C	14 et 18°C	14 et 18°C	14°C	18°C
J0	-	-	-	-	-
J4	-	-	-	tournis	-
J5	-	-	-	+++	
J6	-	-	-	++	
J7	-	-	-	+-	tournis
J8	-	-	-	+-	++
J10	-	-	-	lésions	lésions

Nous n'avons jamais observé de symptômes, ni de lésions, chez les larves issues d'œufs contaminés provenant de la femelle vaccinée, ni chez les lots témoins non contaminés. L'observation en épifluorescence, des coupes histologiques marquées avec l'anticorps anti-nodavirus, permet de confirmer l'absence de virus dans le cerveau de ces larves (Planche XXXII, Figure B), alors que des larves du même âge, provenant de la ponte d'une femelle non vaccinée, présentent des lésions virales caractéristiques (Planche XXXI, Figure A). Les larves issues des lots témoins non contaminés, n'ont pas présenté de symptômes ni de lésions virales.

L'influence de la température d'élevage se traduit également par un allongement de la durée d'incubation de la maladie (7 jours à 14°C au lieu de 4 jours à 18°C).

Il semble donc que les œufs issus de la femelle vaccinée soient protégés contre une contamination expérimentale au stade œuf. Cette protection est probablement à mettre en relation avec la présence d'immunoglobulines dans les œufs (Chapitre II, p. 66) et leur localisation en périphérie sous le chorion.

Planche XXXII: Observation en épifluorescence après marquage FITC indirect avec un anticorps anti-nodavirus, de coupes transversales, au niveau de l'encéphale et des yeux, de larves de bar âgées de 10 jours ayant été contaminées expérimentalement par le virus au stade d'oeuf et issues d'une femelle non vaccinée (A) et vaccinée (B).



A: Larve issue d'une femelle non vaccinée: importante vacuolisation (V) de l'encéphale (En) avec fluorescence (flèches) de quelques cellules dans la rétine (Re). Barre = 50 μ m.

B: Larve issue d'une femelle vaccinée: absence de lésion virale et de fluorescence dans l'encéphale (En) ou la rétine (Re). Barre = 50 μ m.

Cependant, ce résultat n'ayant été obtenu que sur une seule ponte, doit être confirmé par de nouvelles expérimentations.

Afin de vérifier si cette protection pouvait être liée à la présence d'anticorps nous avons dosé les anticorps anti-nodavirus présents dans les œufs (tableau XVIII, Annexe XVII)).

Tableau XVIII: Dosage des anticorps anti-nodavirus (UI.ml⁻¹) dans les œufs et les larves de bar issus d'une femelle vaccinée et non vaccinée.

	Ovule	œuf (P3)	Larve (L1)	L5
Vacciné	25,6	25	20,2	nd
Non-vacciné	nd	nd	nd	nd

nd= non détecté

Nos résultats indiquent que des anticorps sont détectés dans les œufs (25 UI.ml⁻¹) et les larves de 1 jour (20,2 UI.ml⁻¹) issus de la femelle vaccinée. Au 5^{ème} jour d'élevage larvaire (L5), ces anticorps ne sont plus détectables dans les larves (L5).

La détection d'anticorps dans les œufs issus d'une femelle vaccinée, suggère que la protection passive transférée par la mère est du type immunité humorale (anticorps). Cette hypothèse est confortée par l'absence de protection des larves issues de cette même femelle lorsque la contamination virale est réalisée au 5^{ème} jour (résultats non montrés) alors que les larves (L5) sont dépourvues d'anticorps.

Nous avons vu (Chapitre II, p. 62) que les immunoglobulines « vitellines » étaient localisées préférentiellement sous le chorion et cette observation est en accord avec les résultats de Haymann et Lobb (1992) et Olsen et Press (1997). Si la quantité globale d'immunoglobulines détectée dans les œufs est faible (<10 ng.mg⁻¹ dans notre étude), la concentration locale, sous la membrane, de ces immunoglobulines pourrait être suffisante pour protéger l'œuf contre une contamination exogène.

Aussi, pour préciser le rôle éventuellement protecteur des anticorps anti-nodavirus, nous avons testé l'activité neutralisante *in vitro* de ces anticorps.

4.2.3. Mise en évidence des anticorps sériques neutralisants

Protocole expérimental (Tableau XX)

Le dosage des anticorps neutralisants est classiquement obtenu par une recherche d'effets cytopathiques observés sur des cultures cellulaires inoculées avec différentes concentrations de virus. En l'absence de cultures cellulaires sensibles disponibles au moment de la réalisation de notre étude (Frerichs et coll., 1997), nous avons dosé les anticorps par un test *in vivo* de contamination des larves de bar.

Séroneutralisation

La suspension virale utilisée pour la contamination expérimentale des larves (p. 146) est préalablement incubée pendant 48 heures à +4°C avec différentes concentrations d'un pool de sérums (S827) contenant 3000 UI.ml⁻¹ d'anticorps anti-nodavirus ou avec du sérum de bar ne contenant pas d'anticorps anti-nodavirus (témoin sérum S850).

Le virus a été mis en contact et incubé avec différentes quantité d'anticorps (Tableau XIX).

Tableau XIX: séroneutralisation du virus par incubation à 4°C pendant 48 heures avec différentes concentrations d'anticorps.

<i>Lot</i>	<i>Témoin négatif (V-S-)</i>	<i>V+60</i>	<i>V+40</i>	<i>V+20</i>	<i>V+10</i>	<i>Témoin positif (V+ S-)</i>
<i>Ac (UI)/virus (µg)</i>	0	60	40	20	10	0

Epreuve virulente des larves

La contamination expérimentale des larves (stade L1) issues d'un géniteur séronégatif est effectuée selon le protocole décrit précédemment (Bain de 10 minute). Dans cette expérimentation, le témoin positif est représenté par des larves ayant été contaminées avec une suspension de virus

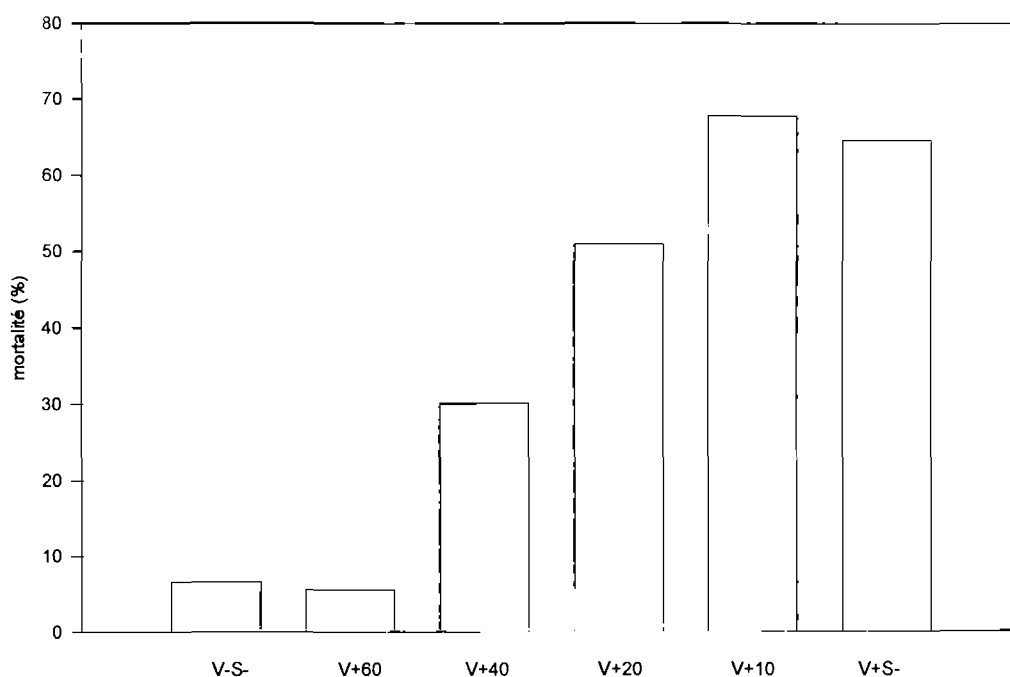
ayant été incubé avec le sérum ne possédant pas d'anticorps détectables (S850). Le témoin négatif est représenté par des larves ayant été immergées dans de l'eau de mer additionnée du même sérum (S850) ne contenant pas d'anticorps.

L'expérimentation a été menée à une température moyenne de 14.1 °C jusqu'à l'observation d'un pic de mortalité des larves (11^{ème} jour). En début d'expérimentation, les différents lots sont constitués en prélevant les larves dans un bac ayant été homogénéisé par brassage. En fin d'expérimentation, le dénombrement des larves est estimé par la détermination du poids total des larves survivantes et le calcul du poids moyen sur un échantillon de 100 larves.

Résultats

Les pourcentages de mortalité observés sur chaque lot sont regroupés dans la Figure 28.

Figure 28: Variation de la mortalité des larves de bar après contamination avec une suspension de virus préalablement incubée avec différentes concentrations d'anticorps sériques.



L'observation de la mortalité en fin d'expérimentation indique que le pouvoir infectieux viral commence à être inhibé après un contact du virus avec des anticorps sériques à raison de 20 unités d'anticorps (UI) par μg de virus (lot V+20). Dans nos conditions expérimentales, le pouvoir pathogène du virus est totalement neutralisé avec une concentration de 60 unités d'anticorps par μg de virus (lot V+60).

4-3. Conclusion

Le titrage des anticorps sériques anti-nodavirus par test ELISA nous a permis d'effectuer une première étude sérologique de 78 reproducteurs maintenus en captivité à la station de Palavas. Cette étude a révélé que 15 % de la population était constituée d'individus présentant des titres anticorps élevés (séropositifs) et que ces individus étaient en grande majorité des femelles. En outre, un suivi sérologique pendant 5 mois de chaque poisson d'un bassin de reproducteurs a montré que les taux d'anticorps de chaque individu étaient suffisamment stables pour permettre de constituer les lots de reproducteurs (individus dépourvus d'anticorps sériques anti-nodavirus) nécessaires pour la réalisation de nos expérimentations.

A cet effet, nous avons étudié la réponse immunitaire de quelques individus séronégatifs après une vaccination, à l'aide d'un vaccin expérimental inactivé. L'inoculation IP de ce vaccin entraîne l'apparition d'anticorps sériques (5 à 25000 UI.ml⁻¹) 20 jours après et jusqu'au 73^{ème} jour. Ces résultats préliminaires, nous ont permis de proposer un protocole de vaccination, comportant des rappels vaccinaux tous les mois pour maintenir un taux élevé d'anticorps sériques chez les reproducteur.

Parallèlement, nous avons entrepris l'étude de la transmission expérimentale de la maladie afin de disposer d'un modèle expérimental. Pour cela, des larves, issues de pontes de reproducteurs séronégatifs, ont été contaminées par balnéation dans une suspension virale et la maladie a été reproduite. Ces premiers essais de contamination expérimentale nous ont

permis de préciser l'influence de la température d'élevage sur la durée d'incubation de la maladie.

Le modèle de contamination expérimentale, ainsi défini, a été utilisé pour contaminer des œufs issus d'une femelle vaccinée contre le nodavirus. Les résultats de cette expérimentation indiquent que ces œufs sont protégés contre une contamination expérimentale et que cette protection est liée à la présence d'anticorps anti-nodavirus puisque (i) seuls les œufs issus de la femelle vaccinée sont protégés, (ii) la protection disparaît lorsque la contamination virale est effectuée à un stade où les anticorps ne sont plus détectés dans les larves (stade L5).

Enfin, l'activité neutralisante des anticorps sériques anti-nodavirus a été déterminée par un test *in vivo* de contamination à des larves de bar.

CONCLUSION

COLORED PENCIL

CONCLUSION GENERALE

Confronté aux problèmes pathologiques apparus avec le développement de l'aquaculture, il nous a semblé opportun d'approfondir les connaissances concernant les mécanismes de défense des poissons, et en particulier du bar. Les données concernant la protection des larves et des géniteurs reproducteurs élevés en éclosérie, sont d'autant plus nécessaires, que cette étape constitue un des maillons clefs de la filière d'élevage.

Dans ce cadre, nous avons, dans un premier temps, étudié chez les bars adultes, les immunoglobulines, éléments de l'immunité spécifique humorale ainsi que leur rôle anticorps, et nous avons alors cherché si ce type de protéine était présente dans les œufs afin de mettre en évidence un transfert d'immunité de la mère à l'œuf.

Dans un second temps, nous avons essayé de déterminer le moment d'acquisition de l'immunocompétence chez les larves. Pour cela, après avoir effectué des études préliminaires chez les bars adultes, nous avons étudié la mise en place des principaux organes lymphoïdes, l'apparition des cellules productrices d'immunoglobulines (IgM+) et enfin, dosé les immunoglobulines présentes dans les extraits de larves au cours du développement.

Par ailleurs, nous avons essayé de compléter ces connaissances générales, par l'étude du rôle protecteur des immunoglobulines vis à vis de l'encéphalite virale. En effet, cette pathologie entraîne d'importantes mortalités tant en élevage larvaire qu'au cours du grossissement dans les élevages de différents pays du littoral Méditerranéen. A cet égard, le nodavirus, dans la mesure où il peut entraîner des mortalités au stade larvaire (transmission horizontale), et être transmis par les œufs d'une femelle infectée (transmission verticale), offre ainsi, la possibilité d'étudier sous l'angle « fonctionnel » les différents aspects du transfert d'une protection immune spécifique.

Transmission de l'immunité passive

L'étude des immunoglobulines du bar a permis de préciser les caractéristiques des immunoglobulines sériques, et de mettre en évidence des immunoglobulines appelées « vitellines » dans les œufs de cette espèce.

Les immunoglobulines du bar sont des protéines de haut poids moléculaire (850 kD) présentes sous une forme tétramérique dans le sérum, alors que des formes plus simples, probablement monomériques, sont mises en évidence dans les œufs. Ces dernières, que nous avons appelées immunoglobulines « vitellines » sont localisées à la périphérie de l'œuf, en position interne sous la membrane chorionique.

Le rôle que pourrait jouer ce type d'immunoglobuline dans l'activité anticorps et plus spécifiquement dans la protection contre un agent pathogène tel que le nodavirus a été précisé. Après avoir défini un modèle de contamination expérimental au niveau larve et œuf, permettant de reproduire l'encéphalite virale chez les larves, nous avons mis en évidence une protection des œufs lorsque ceux-ci proviennent d'une femelle vaccinée contre le nodavirus (vaccin expérimental). Ce résultat ayant été conforté par la détection d'anticorps spécifiques dans ces œufs.

Acquisition de l'immunocompétence

En ce qui concerne l'acquisition de l'immunocompétence, nous avons montré par l'étude structurale et ultrastructurale des principaux organes lymphoïdes du bar, que le thymus et le pronéphros pouvaient être considérés comme des organes lymphoïdes primaires et la rate comme un organe lymphoïde secondaire. Ces organes se mettent en place de façon séquentielle (le pronéphros, puis la rate et le thymus) à partir du 10^{ème} jour du développement larvaire. Des cellules lymphoïdes sont détectées successivement dans le thymus (21^{ème} jour), le pronéphros (35^{ème} jour) et enfin la rate au 54^{ème} jour. Un marquage à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-IgM de bar (Acm 6E11) conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), permet de détecter par analyse en cytométrie de flux (CMF), les cellules produisant les

IgM (cellules IgM+) dans les extraits de larves âgées de 20 jours. Cette étape coïncide avec la détection d'immunoglobulines par ELISA dans les extraits de larves et survient au moment de la mise en place du thymus. Cependant, l'acquisition de l'immunocompétence survient probablement lorsqu'un nombre suffisant de cellules IgM+ sont présentes dans les organes lymphoïdes et que la synthèse des IgM est effective. Ces différentes conditions sont réunies lorsque la larve est âgée de 54 jours, date que nous proposons pour l'acquisition de l'immunocompétence chez le bar.

Par ailleurs, les études préliminaires effectuées chez des bars plus âgés indiquent que la teneur sérique en IgM augmente au cours des deux premières années pour se stabiliser (15-20 mg.ml⁻¹) chez les reproducteurs, ce qui pourrait indiquer que le système immunitaire humoral du bar poursuit sa maturation au cours de cette période.

Enfin, l'étude de la répartition des cellules dans les organes lymphoïdes du bar, nous a permis de constater une distribution variable selon les organes, avec cependant, pour chaque organe, un pourcentage de cellules IgM⁺ relativement constant au cours de la croissance pondérale.

Perspectives

Immunocompétence des larves.

L'hypothèse de l'acquisition de l'immunocompétence (immunité humorale) vers le 54^{ème} jour de développement, devrait être confirmée par des vaccinations expérimentales, à différents âges, suivies d'épreuves virulentes. Par ailleurs, nos résultats indiquent qu'une phase de mise en place des cellules pré-B se produit entre le 20^{ème} et le 40^{ème} jour. Cette étape pourrait correspondre à une période d'immunotolérance qui pourrait être objectivée par une immunisation des larves avec un antigène cible à cette phase, et l'étude de la réponse immune à cet antigène.

Vaccination contre le nodavirus et dépistage sérologique des reproducteurs porteurs sains.

L'étude préliminaire de l'immunogénicité d'un vaccin expérimental contre le nodavirus, indique qu'un vaccin tué administré par inoculation intrapéritonéale à des reproducteurs entraîne l'apparition d'anticorps sériques détectables pendant un à deux mois. Cette étude, très partielle, s'inscrit dans le cadre du développement d'un projet de mise au point de vaccin qui est proposé dans le cadre d'un contrat de recherche (contrat FAIR et appel d'offre biotechnologies).

Parallèlement, la titration des anticorps sériques anti-nodavirus par test ELISA, pourrait être utilisée en complément de différentes techniques de détection du virus (PCR, cultures cellulaires), pour dépister les reproducteurs sains dans les écloséries.

Transfert d'une immunité dans les œufs

La mise en évidence d'une protection passive spécifique contre le nodavirus dans les œufs du bar devrait être confirmée par d'autres expérimentations. Ce résultat préliminaire devrait être complété par une étude de la cinétique d'incorporation des immunoglobulines au cours de l'ovogenèse.

11/20/05 10:11 AM

ANNEXES

ANNEXES

Annexe I: Techniques chromatographiques

Chromatographie sur colonne SEC-4000

pression 7 bars
température : 20 °C
tampon d'élution KH_2PO_4 100 mM, Na_2SO_4 100 mM,, pH 7,4
débit : 0,8 ml.min⁻¹
volume d'échantillon : 20 µl (analytique) ou 250 µl (préparative)
sensibilité de la cellule de détection (280 nm) ; S=0,05 (analytique) ou S=0,5 (préparative)

Solution de contrôle

thyroglobuline : 20 mg.ml⁻¹
ovalbumine : 10 mg.ml⁻¹
ribonucléase : 10 mg.ml⁻¹
uracile : 0,1 mg.ml⁻¹

Chromatographie sur résine échangeuse d'ions (colonne Q-sépharose).

pression : 1 bar
température : 18 °C
tampon Tris HCl pH 9,2
tampon d'élution Tris pH 9,2 + NaCl (5% à 100 %)
volume d'échantillon : 4 ml
volume de colonne : 50 ml
débit : 1 ml.min⁻¹.

Annexe II: Electrophorèses PAGE-Natives et PAGE-SDS en conditions réduites et non réduites, immunotransfert.

ELECTROPHORESES PAGE SDS non réduites

Gel 4%, acrylamide 1,07% qsp. 100 ml:

Protogel	13,3 ml
Tris HCl 1,5 M-pH 8,9	25 ml
Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) 10%	1 ml
Temed	0,1 ml
Persulfate d'ammonium	1 ml
Eau distillée (ED)	59,7 ml

Tampon de cuve (« Running buffer »): Tampon Laemmli pH 8,3 (10X)

Tris base	14,5 g
Glycine	72 g
SDS	5 g
ED	qsp. 500 ml

Tampon d'échantillon (« Sample buffer ») (2X):

Tris HCl 0,5 M-pH 6,8	2,5 ml
Glycerol	2 ml
SDS 10%	4 ml
Bleu de bromophénol 0,1%	0,5 ml
ED	qsp. 10 ml

Préparation des échantillons:

Immunoglobulines 0,7 mg/ml	10 µl
Tampon	10 µl

Les échantillons sont préalablement dénaturés à 70°C pendant 5 minutes, puis réfrigérés sur glace, et enfin déposés dans chaque puit.

Migration (Voltage constant): Courant de 20 mA à 50 mA pendant 2 heures, puis 10 mA pendant 1 heure.

Coloration des gels

Bleu de coomassie R250	3,5 g
Ethanol pur	750 ml
Acide acétique	150 ml
ED	750 ml

Dissoudre le bleu de coomassie dans l'alcool pur puis filtrer et ajouter les autres réactifs.

Placer le gel dans la solution et laisser colorer 1 heure.

Décoloration

Acide acétique pur	50 ml
Ethanol pur	70 ml
ED	qsp. 1 l

Placer le gel dans 200 ml de solution décolorante et agiter, renouveler la solution fréquemment.

ELECTROPHORESES PAGE SDS réduites

Gel 10%, acrylamide 2,6% qsp. 10 ml:

Protogel	3,33 ml
Tris Hcl 1,5 M-pH 8,9	3,75 ml
SDS 10%	0,1 ml
Persulfate d'ammonium	50 µl
Temed	5 µl

Gel de prémigration 4%

Tampon d'échantillon (2X):

Tris Hcl 0,5 M-pH 6,8	2,5 ml
Glycerol	2 ml
SDS 10%	4 ml
Bleu de bromophénol 0,1%	0,5 ml
Solution dénaturante	1 ml
ED	qsp. 9 ml

Solution dénaturante:

β-mercaptoéthanol 1%	
Urée 5 M	
SDS 0,1%	

La préparation des échantillons, la migration et la révélation des gels sont identiques à celles effectuées lors des électrophorèses en PAGE SDS.

IMMUNOTRANSFERT

1- Tampon de cuve : Tris glycine

Tris base 2.4g
Glycine 11.53 g
ED 1 l

2- trempage des membranes et des filtres

Placer dans l'ordre : l'électrode -, le papier filtre, le gel, la membrane cellulose, le papier filtre et l'électrode +

3- Migration. Intensité constante: 200 mA pendant 4 heures

4- Coloration de la membrane au rougeponceau dans l'acide trichloroacétique dilué 1/10: 10 minutes

5- Révélation des fractions protéiques par l'anticorps

3 lavages PBS tween 20 1% : 1 minute
saturation gélatine 3% dans du PBS : 20 minutes 37 °C
3 lavages PBS tween 20 1% : 1 minute
Acm biot. 1/1000 PBS : 1 heure
3 lavages PBS tween 20 1% : 1 minute
Extravidine-POD (E2886) 1/2000 PBS : 30 minutes
3 lavages PBS tween 20 1% : 1 minute
Substrat DAB :
tris HCL 0.1M pH 7.6 15 ml
DAB 5 mg
H₂O₂ 100 µl

Annexe III: Purification des anticorps.

1- Chromatographie d'affinité sur colonne protéine A-sépharose

1- Equilibrer une colonne protéine A - sépharose CL-4B de 5 ml (Pharmacia, Uppsala, Suède) avec un tampon phosphate disodique 20 mM, pH 8.
débit 0,5 ml. min-1

2- Introduire la solution d'anticorps à purifier dans la colonne

3- Eluer avec une solution 0,1M d'acide citrique , pH 3-5,5.

3- Lire la densité optique des fractions éluées (25 ml) à la longueur d'onde de 280 nm et récolter ces fractions (25 ml).

Annexe IV: Préparation des conjugués biotinylés et fluorescents (FITC)

Conjugué à la biotine

Le dérivé N-Hydroxy Succinimide (NHS) de la biotine réagit avec les amines primaires des protéines pour former une liaison amide. Le couplage est réalisé à pH 8,5 à +4°C, en considérant un rapport molaire (initial) biotine/anticorps de 120. Après couplage, l'excès de biotine est éliminé par dialyse.

1- Préparer une solution de biotine.

Dissoudre de l'ester N-hydroxysuccinimide de biotine (Pierce Interchim) dans un tampon carbonate pH 8,5.

Ester de biotine	0,5 mg
Tampon carbonate 50 mM, pH 8,5	1 ml

2- Effectuer une dialyse de l'anticorps (dilué dans du tampon PBS pH 7,2), avec un tampon carbonate 50 mM, pH 8,5.

3- Incuber dans un tube de verre l'anticorps avec l'ester de biotine pendant 2 heures à 4°C.

Anticorps (0,5 mg.ml ⁻¹) dans le tampon carbonate 50 mM, pH 8,5	1000 µl
ester de biotine dans le tampon carbonate 50 mM, pH 8,5	120 µl

4- Dialyser le mélange contre du tampon PBS, pH 7,2 pendant une nuit à +4°C.

5- Conserver l'anticorps biotinylé stérilement (filtration 0,22 µm) à 4°C.

Conjugué à l'isothiocyanate (FITC)

1- Préparer une solution FITC de base (1 mg.ml⁻¹ de FITC).

Dissolution à 37 °C de l'isothiocyanate (FITC Sigma) dans du tampon borate de sodium .

FITC (Sigma)	10 mg
Tampon borate	10 ml

2- incuber pendant 2 heures l'anticorps (Acm ou IgG de lapin) avec la solution de marquage.

Anticorps (1 mg.ml ⁻¹) dans tampon phosphate 20 mM, pH 7,4	500 µl
Solution de base FITC diluée 1/21,7 (44 µg.ml ⁻¹)	750 µl

3- Equilibrer une colonne PD10 Sephadex G25 (Pharmacia) avec 25 ml de tampon phosphate 20 mM, pH 7,4 et 0,1% azide de sodium.

4- Ajuster le volume final de l'échantillon à 2,5 ml avec le tampon phosphate 20 mM, pH 7,4, 0,1 % azide de sodium et déposer les 2,5 ml du volume de la réaction sur la colonne PD10 (le volume mort n'est pas recueilli).

5- Eluer avec 3,5 ml de tampon phosphate 20 mM, pH 7,4 et 0,1% azide de sodium et récupérer le volume (3,5 ml) en sortie de colonne.

6- Déterminer le taux de couplage par lecture de la densité optique à 495 nm de l'échantillon.

$$\text{Taux de couplage} = DO_{495}/6,55 \cdot 10^{-2}$$

Dans le cas de l'Acm 6E11- FITC : taux de couplage = 120

Annexe V: Dosage des immunoglobulines dans les oeufs et les larves par ELISA sandwich (Acp/Acm)

1- Sérum de lapin anti-IgM de bar (1.9 mg/ml) 5 µg/ml : 1 nuit +4°C

30 µl sérum dans 5 ml PBS seul

3 rinçages PBS seul

2- Saturation 250 µl PBS Régilait 5% 1h30 37°C

3 lavages PBS seul

3- IgM purifiée de bar (ou sérum de référence S370) ou échantillons dilués dans PBS Régilait 0.5% : 1h 15 37°C agité

standard = S370 (dosé 6,05 mg/ml) dilué 1/8, 16, 32, 64, 128, 256000

1/10 = 50 µl dans 450 µl puis 10 µl de cette sol (1/10) dans 990 µl soit 1/1000

1/4000 = 100 µl (1/1000) dans 300 µl

1/8000 = dilution 1/2 ... 1/256000

Echantillons dilués 1/8, 1/16, 1/32 et 1/64 dans du PBS 0,5 % Régilait

faire une solution de base 1/4 en broyant 1g d'oeuf ou de larves dans 3 ml PBS-Régilait 0.5% (1+3). Cette suspension est alors diluée au 1/2 pour obtenir la 1^{ère} dilution de travail (1/8).

3 lavages PBS tween 0.5%

4- Anticorps monoclonal anti-IgM de bar biotinylé (Acm 6E11-biot. : 0.25 µg.ml⁻¹): 1 h 37°C (agitation)

Dépôt dans chaque puit de 50 µl d'une solution d'anticorps (Acm 6E-Biot.) dilué 1:2000 dans du PBS + 0,5 % Régilait

triple lavage PBS + 0,5 % tween 20

5- Streptavidine conjuguée à la peroxydase (SA-POD Sigma) diluée 1:2500 : agitation 30 minutes à 37°C.

ajout de 25 µl d'une solution de SA-POD diluée au 1/2500 dans le tampon PBS +0,5 % Régilait

triple lavage PBS + 0,5 % tween 20

3 lavages PBS-Tween

6- Substrat : 15 à 20 minutes à l'obscurité

Dépôt de 25 µl d'une solution d'ortho phenylènediamine dihydrochloride (OPD: Sanofi Diagnostic Pasteur) dans 20 ml de tampon acétate de sodium 0,1M; acide citrique 0,1M; pH : 5,4 contenant 0.33% d' eau oxygénée (substrate buffer : Sanofi Diagnostic Pasteur).

7- Arrêt de la réaction par addition de 25 µl dans chaque puit d'une solution H₂SO₄ : 4N.

Annexe VI: Titration des anticorps anti-NP dans le sérum du bar

1- DNP-KLH (Sigma) $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$: 1 nuit +4°C

Dépôt, dans chaque puit, de 50 μl d'une solution de DNP-KLH (Sigma) diluée $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ dans du tampon PBS pH 7,4.
triple lavage PBS

2- Saturation PBS + 5 % Régilait : 1 h. 37°C

ajout de 250 μl d'une solution de PBS contenant 5% de Régilait.
triple lavage PBS

3- Echantillons: 1h30 à 37 °C.

échantillons dilués 1/200 et 1/600 dans le tampon PBS + 0,5 % Régilait
sérum de référence (LPS+) dilué 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 et 1/3200
triple lavage PBS + 0,5 % tween 20

4- Anticorps monoclonal anti-IgM de bar biotinylé (Acm 6E11-biot. : $0.25 \mu\text{g.ml}^{-1}$): 1 h 37°C (agitation)

Dépôt dans chaque puit de 50 μl d'une solution d'anticorps (Acm 6E-Biot.) dilué 1:2000 dans du PBS + 0,5 % Régilait
triple lavage PBS + 0,5 % tween 20

5- Streptavidine conjuguée à la peroxydase (SA-POD : Sigma) : 30 minutes

ajout de 50 μl d'une solution de SA-POD diluée au 1/2500 dans le tampon PBS +0,5 % Régilait
triple lavage PBS + 0,5 % tween 20

6- Substrat : 15 à 20 minutes à l'obscurité

Dépôt de 25 μl d'une solution d'ortho phenylènediamine dihydrochloride (OPD: Sanofi Diagnostic Pasteur) dans 20 ml de tampon acétate de sodium 0,1M; acide citrique 0,1M; pH : 5,4 contenant 0.33% d' eau oxygénée (substrate buffer : Sanofi Diagnostic Pasteur).

7- Arrêt de la réaction par addition de 25 μl dans chaque puit d'une solution H_2SO_4 : 4N.

ANNEXE VII: Préparation des coupes pour étude en microscopie optique

Préparation des coupes (Gabe, 1968)

1- Fixation au liquide de Davidson

Eau de mer filtrée	300 ml
Alcool 95°	300 ml
Formol	200 ml
glycérine	100 ml
Acide acétique à ajouter au moment de l'emploi	100 ml

2- Déshydratation à l'alcool éthylique puis au butanol

Bains de 4 heures dans des alcools croissants : alcool à 50°, 70°, 95° puis alcool absolu.

3- Inclusion des échantillons déshydratés dans de la paraffine

trois bains successifs dans de la paraffine (paraplast +) chauffée à 56°C.

4- Coupe des blocs au microtome .

les blocs sont coupés (sections de 8 µm d'épaisseur) à l'aide d'un microtome (Leitz) et les coupes sont déposées et étalées à chaud sur des lames histologiques

Coloration des coupes (Gabe, 1968):

Les coupes sont d'abord déparaffinées par trois bains de toluène puis réhydratées par bains dans des degrés croissants d'alcool éthylique avant d'être colorées.

Eosinate d'Azur (Giemsa)

colorer pendant 1 heure dans le mélange	
solution aqueuse d'azur A à 0,1%	4 ml
solution aqueuse d'éosine bleuâtre à 0,1%	4 ml
solution d'acide citrique 0,1M	1,2 ml
solution de phosphate disodique 0,1M	5 ml
acétone	25 ml

déshydrater par l'acétone, éclaircir par un mélange d'acétone et de toluène à parties égales, puis par deux bains de toluène.

Trichrome de Mann Dominici

Oxyder les préparations par une solution aqueuse à 0,25 % de permanganate (préparée extemporanément à partir d'une solution de réserve à 2,5%) jusqu'à l'apparition d'une teinte jaune foncée.

laver rapidement et décolorer par une solution aqueuse à 2% de bisulfite de sodium.

laver à l'eau distillée.

colorer pendant 2 à 5 minutes par la solution d'érythrosine -orange (dissoudre 0,2 g d'érythrosine jaunâtre et 0,6 g d'orange G dans 100 ml d'eau distillée, acidifier par 1 goutte d'acide acétique).

rincer à l'eau distillée.

colorer pendant 1 à 3 minutes par le bleu de toluidine (solution aqueuse à 0,5 % de bleu de toluidine).

immerger les lames dans l'eau acétifiée à 0,2% jusqu'à l'apparition d'une teinte rougeâtre des coupes.

terminer la différenciation par l'alcool à 96° jusqu'à la réapparition d'une coloration bleue dans les zones basophiles des coupes.

déshydrater par l'alcool absolu et monter les lames.

ANNEXE VIII: Préparation des coupes pour étude en microscopie électronique

Microscopie électronique

1- Fixation des échantillons au glutaraldéhyde puis postfixation à l'acide osmique

Fixation au glutaraldéhyde (1 heure)	
Glutaraldéhyde 12%	1 volume
Cacodylate 0,4M	1 volume
Eau de mer	1 volume
3 lavages (1 heure)	
Cacodylate 0,4M	1 volume
NaCl 4%	1 volume

Post-fixation		
OsO ₄ -2%		1 volume
CaCodylate 0,4M		1 volume
NaCl 10%		1 volume
3 Lavages (1 heure) au tampon cacodylate		

2- Déshydratation à l'alcool puis à l'oxyde de propylène

Bains de 15 minutes dans des solutions d'alcool éthylique de degrés croissants : alcool à 30°, 50°, 70°, 95° puis alcool absolu.

3- Inclusion des échantillons dans la résine époxy (Epon)

pré-inclusion de 2 à 4 heures dans un mélange de résine diluée au 1/3 dans l'oxyde de propylène, puis diluée ½ puis dans la résine pure.

inclusion dans la résine pure et incubation 1 nuit à l'étuve (+60°C).

4- Coupe des blocs avec un ultramicrotome (Leitz)

5- Coloration des coupes

les coupes semi-fines sont dépliées aux vapeurs de toluène, étalées sur une goutte d'eau déposée sur une lamelle de verre puis sont colorées à chaud au bleu de toluidine (70°C).

Bleu de toluidine	1g
Borate de sodium	1g
Eau distillée	qsp. 100 ml

Après coloration, les lames sont rincées à l'eau distillée puis séchées et montées..

Les coupes ultrafines sont déposées sur des grilles de microscopie électronique puis sont colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

5- Observation au microscope électronique (Jeol 1200)

réglage 70 KVA en moyenne

ANNEXE IX: Préparation des empreintes d'organes et des coupes en congélation

Empreintes d'organes

Les organes sont prélevés et délicatement pressés contre la surface d'une lame histologiques.

Séchage pendant 5 minutes

Les préparations sont déshydratées pendant 5 minutes en les recouvrant d'acétone puis congelées à -20°C.

Conservation à -20°C.

Coupes en congélation

1- Préparation des blocs

Prélever les échantillons d'organes. Dans le cas des larves, celles ci sont anesthésiées avec une solution de phénoxy-éthanol (200 ppm).

Préparer une solution d'agarose à 2,5 % en dissolvant à chaud (60 °C) l'agarose dans l'eau distillée. Laisser refroidir à température ambiante et couler dans des blocs prêts à recevoir les échantillons.

Inclure les échantillons (organes ou larves) dans les blocs d'agarose .

Congeler le plus rapidement possible les blocs dès que la consistance de l'agarose le permet : 1 heure à -70°C
Conserver les blocs à -20°C.

2- Découpage des blocs

Les blocs congelés sont découpés avec un cryotome HM505 E (Microm)
Les coupes de 8 à 10 µm. d'épaisseur sont étalées sur des lames histologiques (Starfrost)
Les lames sont conservées à -20°C.

ANNEXE X: Marquage indirect des cellules IgM⁺ sur des coupes ou des empreintes d'organes

Technique peroxydase/aminoéthylcarbazole (POD/AEC)

1- Traitement des peroxydase endogènes : 1 heure 37 °C

traitement par une solution de Phényl hydrazine (7,5 mg. l⁻¹) dans de l'eau distillée
3 Lavages PBS pH 7.2

2- Acm 6E11 1/1000 dilué dans PBS-BSA 0.5 mg ml⁻¹: 1 h

3 Lavages PBS pH 7.2

3- Anticorps anti IgG de souris conjugué à la peroxydase (POD Sigma A9044) 1/200 dans PBS pH 7.2 : 1 heure à l'obscurité

3 lavages tampon PBS pH 7.2 : 5 minutes

4- Substrat amino-éthyl carbazole (AEC) : 20 minutes

dissoudre 1 tablette (20 mg) d' amino-éthyl carbazole(AEC : Sigma) dans 2,5 ml de di-méthyl formamide (DMF Sigma D 4254).

Ajouter 47,5 ml de tampon acétate 50 mM pH 5,1

Ajouter 25 µl H₂O₂ à 33% et filtrer 0,22 µm au moment de l'emploi

5- Montage glycérine et observation au microscope

Technique peroxydase/diaminobenzidine (POD/DAB)

1- Traitement des peroxydase endogènes : 1 heure 37 °C

traitement par une solution de phényl hydrazine (7,5 mg. l⁻¹) dans de l'eau distillée ou par une solution à 0,02 % d'eau oxygénée (33% volume) dans du méthanol

3 Lavages PBS pH 7.2

2- Acm 6E11 1/1000 dilué dans PBS-BSA 0.5 mg ml⁻¹: 1 h

3 Lavages PBS pH 7.2

3- Anticorps anti IgG de souris conjugué à la peroxydase (POD sigma A9044) et dilué 1/200 dans PBS pH 7.2 : 1 heure

3 lavages tampon PBS pH 7.2

4- Substrat diaminobenzidine (DAB) : 15-20 minutes

dissoudre 5 mg de DAB (sigma) dans 15 ml de tampon tris HCl 0,1M pH 7,6

Ajouter 50 µl d'eau oxygénée (H₂O₂) à 33% au moment de l'emploi et filtrer 0.22 µm

5- Laver les lames à l'eau distillée, déshydrater à l'alcool (solution d'Ethanol à 50, 70, 95 et 100°)

ANNEXE XI: Marquage FITC direct et indirect des cellules IgM⁺ sur lame

Marquage direct

1- Réhydrater les coupes : 10 minutes

1 Lavage PBS pH 7.2

2- Acm 6E11-FITC (0.5 mg m⁻¹) dilué 1/1000 dans PBS-BSA 0,5%) : 1 heure à l'obscurité

anticorps anti IgG de souris conjugué FITC (F4143 : sigma) pour le témoin

3 Lavages PBS pH 7.2

3- Montage glycérine tamponnée pour immuno fluorescence (Sanofi Diagnostic Pasteur)

4- Observation au microscope équipé pour l'épifluorescence

Longueur d'onde pour excitation 495 nm, et filtre d'arrêt pour émission à 525 nm.

Marquage indirect

1- Réhydrater les coupes : 10 minutes

1 Lavage PBS pH 7.2

2- Acm 6E11 dilué 1/1000 dans PBS-BSA 0.5 mg ml⁻¹: 1 heure

3 Lavages PBS pH 7.2

3- Anticorps anti-IgG de souris conjugué FITC (F4143: sigma) dilué 1/70 dans du PBS : 1 heure à l'obscurité

Bleu Evans 1% : 20µl

FITC (F4143) : 20 µl

Tampon PBS pH 7,2 : 1,3 ml

3 Lavages PBS pH 7.2

4- Montage glycérine tamponnée pour immuno fluorescence (Sanofi Diagnostic Pasteur)

5- Observation au microscope équipé pour l'épifluorescence

Longueur d'onde pour excitation 495 nm, et filtre d'arrêt pour émission à 525 nm.

ANNEXE XII: Séparations lymphocytaires sur solution de Ficoll d=1,077

1- Solution de Ficoll d=1,077

Milieu de séparation lymphocytaire d=1,077 MSL 2000 (Eurobio).

2- Préparation des suspensions cellulaires

Sang : le sang est prélevé sur héparine (50 UI.ml⁻¹) et dilué au 1:5 dans du tampon PBS contenant 0,5 % d'albumine bovine (tampon PBS-BSA).

Organes: les organes lymphoïdes (thymus, rein et rate) sont prélevés et dilacérés dans du tampon PBS hépariné (100 UI. ml⁻¹), puis les tissus sont alors dissociés par broyage avec un appareil de Dounce.

3- Séparation sur Ficoll

Chaque suspension cellulaire (5 ml) est déposée sur 5 ml de solution de Ficoll puis centrifugée pendant 20 minutes à 1600g dans une centrifugeuse réfrigérée à 4 °C.

Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon PBS-BSA et centrifugées à 400 g pendant 10 minutes à +4°C.

4- Récupération des cellules

A l'issue de ces lavages, les cellules sont remises en suspension dans du tampon PBS-BSA 0,5% et comptées à l'aide d'une cellule de Malassez .

ANNEXE XIII: Marquages indirect des cellules B et T en cytométrie

1- Suspension cellulaire

déposer dans des tubes de cytométrie 100 µl d'une suspension cellulaire contenant 3 à 5 10⁶ cellules.ml⁻¹ dans du tampon PBS-BSA 0.5 mg m⁻¹, pH 7,2.

2- Incuber avec 5 µl d'anticorps pendant 1 heure à +4C

Sérum polyclonal de lapin anti-IgM de bar ou anti-cellules T (dilué 1/10) ou PBS-BSA 0,5 mg.ml⁻¹ (témoin)

laver 2 fois les cellules avec 5 ml du PBS pH 7.2, et centrifuger pendant 6 minutes à 260g.

3- Ajouter le conjugué FITC anti-IgG de lapin : 1 heure à +4C

FITC anti-IgG de lapin (F0511 : sigma) dilué 1/100 dans PBS-BSA 0.5 mg m⁻¹)

laver 2 fois les cellules avec 5 ml du PBS pH 7.2, et centrifuger pendant 6 minutes à 260g.

4- Reprendre les cellules avec 500 µl de tampon PBS contenant 2% de formaldéhyde

conserver à +4C et effectuer l'analyse dans les deux jours suivant le marquage.

ANNEXE XIV: Marquages FITC direct et indirect des cellules IgM⁺ en cytométrie avec un anticorps monoclonal.

Marquage indirect FITC

1- Suspension cellulaire

déposer dans des tubes de cytométrie 100 µl d'une suspension cellulaire contenant 3 à 5 10⁶ cellules.ml⁻¹ dans du tampon PBS-BSA 0.5 mg m⁻¹, pH 7,2.

2- Incuber avec 5 µl d'anticorps pendant 1 heure à +4C

Acm 6E11 (dilué 1/10) ou PBS-BSA 0,5 mg.m⁻¹ (témoin)

laver 2 fois les cellules avec 5 ml du PBS pH 7.2, et centrifuger pendant 6 minutes à 260g.

3- Ajouter le conjugué FITC anti-IgG de souris : 1 heure à +4C

laver 2 fois les cellules avec 5 ml du PBS pH 7.2, et centrifuger pendant 6 minutes à 260g.

4-Reprendre les cellules avec 500 µl de tampon PBS contenant 2% de formaldéhyde
conserver à +4C et effectuer l'analyse dans les deux jours suivant le marquage.

Marquage direct FITC

1-Suspension cellulaire

déposer dans des tubes de cytométrie 100 µl d'une suspension cellulaire contenant 3 à 5 10^6 cellules.m⁻¹ dans du tampon PBS-BSA 0.5 mg m⁻¹, pH 7,2.

2-incuber avec 5 µl d'anticorps monoclonal (6E11) conjugué FITC: 1 heure à +4C

Acm 6E11-FITC ou FITC anti-IgG de souris dilué 1/100 (témoin)

laver 2 fois les cellules avec 5 ml du PBS pH 7.2, et centrifuger pendant 6 minutes à 260g.

3-Reprendre les cellules avec 500 µl de tampon PBS contenant 2% de formaldéhyde
conserver à +4C et effectuer l'analyse dans les deux jours suivant le marquage.

ANNEXE XV: Purification du nodavirus

1-Clarification des échantillons

Les larves virosées proviennent d'élevages effectués en 1994 . Ces larves ont été conservées à -20°C depuis cette date. Les échantillons sont décongelés et homogénéisés dans du tampon PBS ph 7,2 par broyage avec un ultraturax.

La suspension est alors clarifiée par double centrifugation à 4000 g pendant 40 min dans une centrifugeuse réfrigérée à +4°C.

Une troisième centrifugation est enfin effectuée pendant 45 minutes à 15 000 tr/minute dans une ultracentrifugeuse Beckman équipée d'un rotor SW28.

A l'issue de cette clarification, les suspensions virales présentes dans le surnageant sont alors mises au culot par une centrifugation de 3 heures dans un rotor SW28 tournant à 28000 tr/minute.

2-Gradient de saccharose 20/40%

Le culot est remis en suspension dans 1 ml de PBS 0.1X puis déposé sur un gradient de Saccharose 20/40 % (poids/poids) et centrifugé pendant 2 heures à 25 000 tr/minute avec un rotor SW41.

A l'issue de cette centrifugation une bande opalescente contenant les particules virales est récupérée à l'aide d'une seringue. Cette suspension virale est rincée avec du PBS 0.1X et mise au culot par une centrifugation de 2 heures à 41 000 tours/minute.

3-Gradient de Chlorure de Césium 28/38%

Le culot est repris dans du PBS 0,1X et la suspension est déposée sur un gradient de Chlorure de Cesium 25/38 % (poids/poids) puis centrifugée pendant 16 heures à 41 000 tours/minutes (rotor SW41).

Les particules virales sont récupérées dans la bande inférieure du gradient, et rincées avec du PBS 0,1X.

4-Détermination de la concentration de la suspension virale

La densité optique de la suspension virale pour les longueurs d'onde de 260 et 280 nm.est déterminée avec un spectrophotomètre.

longueur d'onde (nm)	280	260
Densité optique (DO)	1.35	2.02

la concentration de la suspension virale est calculée par la formule de Harlow et Lane (1988):

$$\text{Concentration virale (mg. ml}^{-1}\text{)} = 1.55 \text{ DO}_{280} - 0.76 \text{ DO}_{260}$$

Selon cette formule la concentration de la suspension virale est de 0,555 mg ml⁻¹.

ANNEXE XVI: Marquage FITC du nodavirus sur coupes

1-Lavage PBS : 5 minutes

2-Anticorps polyclonaux purifiés (IgG) de lapin anti-nodavirus 1/2500 dans PBS-BSA 0.5 mg.ml⁻¹ : 1 heure

2 Lavages PBS Tween pH 7.2 + 1 lavage PBS : 3 minutes

3-Anticorps anti-IgG de lapin conjugué FITC dilué 1/64 dans PBS : 1 heure à l'obscurité

Bleu Evans 1% : 20 µl
 FITC anti-IgG de lapin : 20 µl
 Tampon PBS pH 7.2 : 1.3 ml
 2 lavages PBS Tween + 1 lavage PBS : 3 minutes

4-lavage ED et montage Glycérine tamponnée IF

5-Observation en épifluorescence

ANNEXE XVII: Titration des anticorps sériques anti-nodavirus chez le bar

1-IgG de lapin anti-nodavirus (0.89 mg.ml⁻¹) coating 5µg.ml⁻¹: 1 nuit à +4°C
 triple lavage PBS pH 7,2

2-Saturation 250 µl PBS régilait 5% 1h30 37°C
 triple lavage PBS pH 7,2

3-Suspension de virus (4 µg.ml⁻¹) dans PBS-Rég. 0.5% : agitation 1 heure à 37°C
 triple lavage PBS pH 7,2

4-Sérum ou échantillon dilués dans PBS-Rég 0.5% : 1h à 37°C
 sérum standard positif (S825 : 17000 UI. ml⁻¹) dilué 1/400 1/800.1/1600 1/3200
 sérums à doser dilués 1/200 et 1/400 dans PBS-Rég. 0,5%.
 sérum s850 négatif 1/200 et 1/400 dans PBS-Rég. 0,5%.
 Oeufs ou larves : dilution 1/10 (60 µl dans 540 µl) puis 1/20, 1/40, 1/80
 triple lavage PBS pH 7,2

5-Anticorps monoclonal anti-IgM de bar biotinylé (Acm 6E11-biot : 0.25 µg.ml⁻¹): 1 h 37°C (agitation)

Dépot dans chaque puit de 50 µl d'une solution d'anticorps (Acm 6E-B) dilué 1:2000 dans du PBS + 0,5 % Régilait

triple lavage PBS + 0,5 % tween 20

6-Streptavidine conjuguée à la peroxydase (SA-POD : Sigma): 30 minutes

ajout de 50 µl d'une solution de SA-POD diluée au 1/2500 dans le tampon PBS +0,5 %

Réglait

triple lavage PBS + 0,5 % tween 20

7-substrat : 15 à 20 minutes à l'obscurité

Dépot de 25 µl d'une solution d'ortho phenylènediamine dihydrochloride (OPD: Sanofi Diagnostic Pasteur) dans 20 ml de tampon acétate de sodium 0,1M; acide citrique 0,1M; pH : 5,4 contenant 0.33% d'eau oxygénée (substrate buffer : Sanofi Diagnostic Pasteur).

8-Arrêt de la réaction par addition de 25 µl dans chaque puit d'une solution H₂SO₄ : 4N.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 **Abelli, L., Picchietti, S., Romano, N., Mastrolia, L. & Scapigliati, G.,** 1996. Immunocytochemical detection of thymocyte antigenic determinants in developing lymphoid organs of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol.*, **6**, 493-505.
- 2 **Ainsworth, A.J., Dexiang, C. & Greenway, T.,** 1990. Characterization of monoclonal antibodies to channel catfish, *Ictalurus punctatus*, leucocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **26**, 81-92.
- 3 **Allen, K.S,** 1983. Flow cytometry assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquacult.*, **33**, 317-328.
- 4 **Anderson, D.P.,** 1990. Immunological indicators: Effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. In: S.M. Adams (ed.), *Biological Indicators of Stress in Fish. American Fisheries Society Symposium 8*, Bethesda, MD, pp. 38-50.
- 5 **Appleyard, J., Scornik, J.C., Braylan, R.C. & Benson, N.A.,** 1983. Distinctive expression of the T4 Antigen in normal and stimulated lymphocytes. *Cell. Immunol.*, **76**, 171-188.
- 6 **Arimoto, M., Maruyama, K. & Furusawa, I.,** 1994. Epizootiology of viral nervous necrosis (VNN) in striped jack. *Fish Pathol.*, **29**, 19-24.
- 7 **Arimoto, M., Mori, K., Nakai, T., Muroga, K. & Furusawa, I.,** 1993. Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocarenx dentex* (Bloch & Schneider). *J. Fish Dis.*, **16**, 461-469.
- 8 **Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura, G. & Furusawa, I.,** 1996. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquacult.*, **143**, 15-22.
- 9 **Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroga, K. & Furosawa, I.,** 1992. Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Gyobyō Kenkyū*, **27**, 191-195.

- 10 **Arkoosh, M.R., & Kaattari, S.L.**, 1990. Quantification of fish antibody to a specific antigen by an enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: *Techniques in Fish Immunology*, SOS Publications, FITC, **1**, 15-24.
- 11 **Avtalion, R.R.**, 1981. Environmental control of the immune response in Fish. *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, **11**, 163-188.
- 12 **Avtalion, R.R. & Mor, A.**, 1990. Transfert of antibody activity from immunized mother to embryos in Tilapias. *J. Fish Biol.*, **37**, 249-255.
- 13 **Avtalion, R.R. & Mor, A.**, 1992. Monomeric IgM is transferred from mother to eggs in Tilapias. *Israeli J. Aquat.*, **44**, 93-98
- 14 **Avtalion, R.R., Wojdani, A., Malik, Z., Shahrabani, R. & Duczyminer, M.**, 1973. Influence of environmental temperature on the immune response in fish. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, **61**, 1-35.
- 15 **Barnabé, G.**, 1991. Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Lavoisier TEC & DOC. 495 pp.
- 16 **Balebona, M.C., Morinigo, M.A., Sedano, J., Martinez-Manzanares, E., Vidaureta, A., Borrego, J.J. & Toranzo, A.E.**, 1992. Isolation of *Pasteurella piscicida* from sea bass in Southwestern Spain. *Bull. Eurp. Ass. Fish Pathol.*, **12**, 168-170.
- 17 **Baudin-Laurencin, F.**, 1981. Fish vibrio strain antisera in France. International Symposium on Fish Biologics: serodiagnostics and vaccines, Leetown, W. Va., U.S.A. *Develop. Biol. Standard.*, **49**, 257-259
- 18 **Baudin-Laurencin, F. & Batellier, F.Y.**, 1986. Protection immunitaire du Turbot (*Scophthalmus maximus*) contre la vibriose. Pathology in Marine Aquaculture. Vivarès C.P., Bonami, J.R., Jaspers (eds). European Aquaculture Society, Special Publication N°9: 391-403. Bredene, Belgium.
- 19 **Baudin-Laurencin, F., Pepin, J.F. & Raymond, J.C.**, 1991. First observation of an epizootic of pasteurellosis in farmed and wild fish of the French Mediterranean coasts. In : EAFP, Vth International Conference

- "Diseases of fish and shellfish", Budapest, Hungary, August 25-29, 1991, Book of abstracts.pp. 39.
- 20 **Bellance, R. & Gallet de Saint Aurin, D.**, 1988. L'encéphalite virale du loup de mer. *Caraïbe Medical*, 105-114.
- 21 **Bienenstock, J.M.D.**, 1975. The local immune response. *Am. J. Vet. Res.*, **36**, 488-490.
- 22 **Bloch, B., Gravningen, K. & Larsen, J.L.**, 1991. Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis. Aquat. Org.*, **10**, 65-70.
- 23 **Bly, J.E. & Clem, L.W.**, 1992. Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.*, **2**, 159-172.
- 24 **Bly, J.E., Grimm, A.S. & Morris, I.G.**, 1986. Transfert of passive immunity from mother to young in a teleost fish : haemagglutinating activity in the serum and eggs of the plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **84A**, 309-313.
- 25 **Bly, J.E., Miller, N.W. & Clem, L.W.**, 1990. A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.*, **14**, 211-221.
- 26 **Bootland, L.M., Dobos, P. & Stevenson, R.M.W.**, 1990. Fry age and size effects on immersion immunization of brook trout, *Salvenilus fontinalis* Mitchell, against IPN. *J. Fish Dis.*, **13**, 113-125.
- 27 **Botham, J.W. & Manning, M.J.**, 1981. The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenic development of allograft reactivity. *J.Fish Biol.*, **19**, 403-414.
- 28 **Bourmaud, C.**, 1994. Production de sondes monoclonales anti-immunoglobulines de loup (*Dicentrarchus labrax* Linné, 1758): intérêt en immunologie fondamentale et appliquée. Thèse Université Montpellier II. Sciences et Techniques du Languedoc. 1994. pp. 255.

- 29 **Bourmaud, C., Romestand, B. & Bouix, G.**, 1995. Isolation and partial characterization of IgM-like seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) immunoglobulins. *Aquacult.*, **132**, 53-58.
- 30 **Breuil, G. & Haffner, P.**, 1989. A field report on vibrio disease of seabass (*Dicentrarchus labrax*) in the south of France. In *Advances in Tropical Aquaculture*, Tahiti, Feb 20- March 4, 1989. *AQUACOP IFREMER*. Actes de Colloque 9, pp. 161-169.
- 31 **Breuil, G., Bonami, J.R., Pepin, J.F. & Pichot, Y.**, 1991. Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquacult.*, **97**, 109-116.
- 32 **Breuil, G. Vassiloglou, B. Pepin, J.F. & Romestand, B.**, 1997. Ontogeny of IgM-bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level (IgM) during larval stages in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.*, **7**, 29-44.
- 33 **Brown, L.L., Iwama, G.K. & Evelyn, T.P.T.**, 1996. The effect of early exposure of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) eggs to the p57 protein of *Renibacterium salmoninarum* on the development of immunity to the pathogen. *Fish Shellfish Immunol.*, **6**, 149-165.
- 34 **Burke, J. & Rodgers, L.**, 1981. Identification of pathogenic bacteria associated with the occurrence of « red spot » in sea mullet, *Mugil cephalus* L., in south-eastern Queensland. Bacterial Haemorrhagic Septicemia in Silver Mullet (*Mugil curema*). *J. Fish Dis.*, **4**, 153-159.
- 35 **Castillo, A., Sanchez, C., Dominguez, J., Kaattari, S.L. & Villena, A.J.**, 1993. Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.*, **17**, 419-424.
- 36 **Cenini, P.**, 1984. The ultrastructure of leucocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *J. Zool.*, **204**, 509-520.

- 37 **Chantanachookhin, C., Seikai, T. & Tanaka, M.**, 1991. Comparative study of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquacult.*, **99**, 143-155.
- 38 **Charlemagne, J.**, 1990. Immunologie des poissons In: immunologie animale. Paul Pierre Pastoret, André Govaerts et Hervé Bazin (eds). Medecine-Sciences Flammarion, Paris, 1990, pp. 433-445.
- 39 **Chilmonczyk, S.**, 1983. The thymus of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Light and electron microscopic study. *Dev. Comp. Immunol.*, **7**, 159-68.
- 40 **Chilmonczyk, S.**, 1992. The thymus in Fish : development and possible function in the immune response. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 181-200.
- 41 **Comps, M; Pepin, J.F. & Bonami, J.R.**, 1994. Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquacult.*, **123**, 1-10.
- 42 **Comps, M; Trindade, M. & Delsert, Cl.**, 1996. Investigation of fish encephalitis virus (FEV) expression in marine fishes using DIG-labelled probes. *Aquacult.*, **143**, 113-121.
- 43 **Coves, D., Dewavrin, G., Breuil, G. & Devauchelle, N.**, 1992. Culture of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In *Handbook of Mariculture volume II Finfish Aquaculture*. Mc Vey (ed.) CRC Press, pp. 3-20.
- 44 **Cowell, R.R. & Grimes, D.J.**, 1984. Vibrio disease of marine fish populations. *Helgolander Meeresunters*, **37**, 265-277.
- 45 **Cuchens, M.A. & Clem, L.W.**, 1977. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells. *Cell. Immunol.*, **34**, 219-230.
- 46 **De Koning, J. & Kaattari, S.**, 1992. An improved salmonid lymphocyte culture medium incorporating plasma for *in vitro* antibody production and mitogenesis. *Fish Shellfish Immunol.*, **2**, 275-285.

- 47 **Delucas, D., Wilson M. & Warr, G.W.**, 1983. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdeni*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *Europ. J. Immunol.*, **13**, 546-551.
- 48 **Demoury, N.**, 1987. Fonctionnement du centre aquacole de Gravelines. *Thèse Vétérinaire Nantes*. 1987, pp. 153.
- 49 **Dick, P.T. & Dixon, D.G.**, 1985. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *J. Fish Biol.*, **26**, 475-481.
- 50 **Djilali, S., Boulouis, H.J. & Montagutelli, X.**, 1987. Les marqueurs des lymphocytes chez les animaux domestiques. I Les lectines mitogènes et les lectines non mitogènes. *CIMID*, **10**, 187-204.
- 51 **Dogget, T.A. & Harris, J.E.**, 1987. The ontogeny of gut-associated lymphoid tissue in *Oreochromis mossambicus*. *J. Fish Biol.*, **31**, 23-27.
- 52 **Doggett, T.A. & Harris J.E.**, 1991. Morphology of the gut associated lymphoid tissue of *Oreochromis mossambicus* and its role in antigen absorption. *Fish Shellfish Immunol.*, **1**, 213-227.
- 53 **Dorin, D., Cire, M.F.L & Vernier, J.M.**, 1993. Endocytosis and intracellular degranulation of heterologous protein by eosinophilic granulocytes isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* posterior intestine. *Biol. Cell*, **79**, 219-224.
- 54 **Du Pasquier, L.**, 1993. Phylogeny of B-cell Development. *Current Opinion in Immunology*, **5**, 185-193.
- 55 **Du Pasquier, L. & Flajnik, M.F.**, 1990. Expression of MHC class II antigens during *Xenopus* development. *Dev. Immunol.*, **1**, 85-95.
- 56 **Du Pasquier, L., Weiss, N. & Loor, F.**, 1972. Direct evidence for immunoglobulins on the surface of thymus lymphocytes of amphibian larvae. *Europ. J. Immunol.*, **2**, 366- .

- 57 **Egusa, S.**, 1980. Disease problems in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, culture: a review. *International Council for the Exploration of the Sea*, Contribution n°9 of the Special Meeting on Diseases of Commercially Important Marine Fish and Shellfish, October 1-3, Copenhagen 20pp.
- 58 **Ellis, A.E.**, 1977. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reactivity. In: Salomon J.B., Horton J.D. (eds) *Developmental immunobiology*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 225-277.
- 59 **Ellis, A.E.**, 1980. Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Dis.*, **3**, 413-426.
- 60 **Ellsaesser, C.F., Bly, J.E. & Clem, L.W.**, 1988. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. The thymus of the channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.*, **12**, 4787-799.
- 61 **Ellsaesser, C.F., Miller, N.W., Cuchens, M.A., Lobb, C.J. & Clem, L.W.**, 1985. Analysis of channel catfish peripheral blood leukocytes by bright-field microscopy and flow cytometry. *Trans. Am. Fish Soc.*, **114**, 279-285.
- 62 **Esteban, M.A., Meseguer, J., Garcia Ayala, A. & Agulleiro, B.**, 1989. Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): An ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.*, **52**, 407-419.
- 63 **Estevez, J., Leiro, J., Santamarina, M.T., Dominguez, J. & Ubeira, F.M.**, 1994. Monoclonal antibodies to turbot (*Scophthalmus maximus*): immunoglobulin characterization and applicability in immunoassays. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **41**, 353-366.
- 64 **Etlinger, H.M., Hodgins, H.O. & Chiller, J.M.**, 1976. Evolution of the lymphoid system. I. Evidence for lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses. *J. Immunol.*, **116**, 1547-1553.

- 65 **Evans, D.L., Smith, E.E. & Brown, F.E.**, 1987. Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). VI. Flow cytometric analysis. *Dev. Comp. Immunol.*, **11**, 95-104.
- 66 **Evelyn, T.P.T.**, 1971. First record of vibriosis in Pacific salmon cultured in Canada and taxonomic status of the responsible bacterium, *Vibrio anguillarum*. *J. Vet. Res. Board Canada*, **28**, 517-525.
- 67 **Evenberg, D., de Graaff, P., Fleuren, W. & van Muiswinkel, W.B.**, 1986. Blood changes in carp (*Cyprinus carpio*) induced by ulcerative *Aeromonas salmonicida* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **12**, 321-330.
- 68 **Fange, R.**, 1982. A comparative study of lymphomyeloid tissue in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, **2**, 23-33.
- 69 **Fange, R. & Pulsford, A.**, 1985. The thymus of the angler fish, *Lophius piscatorius* (Pisces: Teleostei) A light and electro, microscopic study. *Fish Immunol.*, , 293-311.
- 70 **Faulmann, E., Cuchens, M., Loob, C., Miller, N. & Clem, L.W.**, 1983. An effective culture system for studying *in vitro* mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. *Transac. American Fish. Soc.*, **112**, 673-679.
- 71 **Firth, G.A.**, 1977. The normal lymphatic system of the domestic fowl. *Vet. Bull.*, **47**, 167-179.
- 72 **Fuda, H., Hara, A., Yamazaki, F. & Kobayashi, K.**, 1992. A peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of Chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Dev. Comp. Immunol.*, **16**, 415-423.
- 73 **Frazier, J.A.**, 1974. The ultrastructure of the lymphoid follicle of the chick bursa of Fabricius. *Acta. Anat.*, **88**, 387-395.
- 74 **Frerichs, G.N., Rodger, H.D. & Peric, Z.**, 1996. Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. gen. Virol.*, **77**, 2067-2071.

- 75 **Gabe, M.**, 1968. Techniques histologiques. Masson et Cie, éditeurs, 1968, Paris. pp.1113.
- 76 **Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breitmayer, V., Nicolas, J.L., Gauthier, M., and Christen, R.**, 1995. Small-subunit rRNA Sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla of the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 139-144.
- 77 **Gebbers, J.O & Laissue, J.A.**, 1989. Immunologic structures and functions of gut. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **131**, 221-238.
- 78 **Giorgetti, G. & Ceschia, G.**, 1994. Pasteurellosis in the Mediterranean area: expérences from Italy. In: third International Marine Biotechnology Conference: Program, abstracts and list of participants. p. 63. Tromsøe University, Tromsøe (Norway).
- 79 **Glazebrook, J.S. & Heasman, M.P.**, 1992. Diagnosis and control of picorna-like virus infections in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. In: .Diseases in Asian *Aquaculture I* (ed. by I.M. Shariff, R.P. Subasinghe & J.R. Arthur), pp. 267-272. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- 80 **Glazebrook, J.S., Heasman, M.P. & de Beer, S.W.**, 1990. Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *J. Fish Dis.*, **13**, 245-249.
- 81 **Grace, M.F. & Manning, M.J.**, 1980. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. 1836. *Dev. Comp. Immunol.*, **4**, 255-264.
- 82 **Hart, S., Wrathmell, A.B., Harris, J.E. & Grayson, T.H.**, 1988. Gut immunology in fish : a review. *Dev. Comp. immunol.*, **12**, 453-480.

- 83 **Harlow, E. & Lane, D.**, 1988. Immunoassay. In : *Antibodies a laboratory manual* (ed. by Ed Harlow & David Lane), pp. 553-612. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- 84 **Hayman, J.R. & Lobb, C.J.**, 1993. Immunoglobulin in the eggs of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.*, **17**, 241-248.
- 85 **Imagawa, T., Hashimoto, Y., Kon, K. & Sugimura, M.**, 1990. Vascularisation and related distribution of leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.) head kidney. *J. Fish Biol.*, **37**, 357-366.
- 86 **Imagawa, T., Hashimoto, Y., Kon, K. & Sugimura, M.**, 1991. Immunoglobulin containing cells in the head kidney of carp (*Cyprinus carpio* L.) after bovine serum albumin injection. *Fish Shellfish Immunol.*, **1**, 173-185.
- 87 **Ingram, G.A.**, 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection. A review. *J. Fish Biol.*, **16**, 23-60.
- 88 **Ingram, G.A. & Alexander, J.B.**, 1979. The immunoglobulin of the brown trout, *Salmo trutta* and its concentration in the serum of antigen-stimulated and non-stimulated fish. *J. Fish Biol.*, **14**, 249-260.
- 89 **Josefsson, S. & Tatner, M.F.**, 1993. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata* L.) *Fish Shellfish Immunol.*, **3**, 35-39.
- 90 **Kaattari, S.L.**, 1992. Fish B lymphocytes: defining their form and function. *Ann. rev. Fish Dis.*, 161-180.
- 91 **Kaattari, S.L.**, 1994. Development of a piscine paradigm of immunological memory. *Fish Shellfish Immunol.*, **4**, 447-457.
- 92 **Kawahara, E. Inarimori, T., Urano, K., Nomura, S. & Takahashi, Y.**, 1993. Transfert of maternal immunity of white spotted char (*Salvelinus leucomaenis*) against furunculosis. *Nippon Suisan Gakk*, **59**, 567.

- 93 **Kearny, J.F. & Lawton, A.R.**, 1975. B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J. Immunol.*, **117**, 447-457.
- 94 **Kendall, M.D.**, 1981. The cells of the thymus. In *The thymus gland*, Kendall, M.D. (ed.), Academic Press, London, pp. 63-83.
- 95 **Kitamura, D., Kudo, A., Schaal, S., Muller, W., Melchers, F. & Rajewsky, K.**, 1992. A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell*, **69**, 823-831.
- 96 **Klempau, A.E. & Cooper, E.L.**, 1983. T-lymphocyte and B-lymphocyte dichotomy in anuran amphibians: I. T-lymphocyte proportions, distribution and ontogeny, as measured by E-rosetting, Nylon wool adherence, postmetamorphic thymectomy, and non-specific esterase staining. *Dev. Comp. Immunol.*, **7**, 99-110.
- 97 **Klesius, P.**, 1990. Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **24**, 187-195.
- 98 **Klesius, P.**, 1992. Immune system of channel catfish: an overture on immunity to *Edwardsiella ictaluri*. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 325-338.
- 99 **Koumans-Van Diepen, J.C.E., Harmsen, E.G.M. & Rombout, J.H.W.M.**, 1994. Immunocytochemical analysis of mitogen responses of carp (*Cyprinus carpio* L.) peripheral blood leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **42**, 209-219.
- 100 **Koumans-Van Diepen, J.C.E., Taverne-Thiele, J.J., Van Rens, B.T.T.M. & Rombout, J.H.W.M.**, 1994. Immunocytochemical and flow cytometric analysis of B cells and plasma cells in carp (*Cyprinus carpio* L.); an ontogenetic study. *Fish Shellfish Immunol.*, **4**, 19-28.

- 101 **Kobayashi, K., Hara, A., Takano, K & Hirai, H.**, 1982. Studies on subunit components of immunoglobulin M from a bony fish, the chum salmon (*Onchorhynchus keta*). *Molecular Immunol.*, **19**, 95-103.
- 102 **Lamers, C.H.J. & De Haas, M.J.H.**, 1985. Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). *Cell Tissue Res.*, **242**, 491-498.
- 103 **Lanfranchi, A. & Fabiani, O.**, 1995. Ultrastructural characterization of the different classes of lymphocytes in the peripheral blood of *Mugil cephalus* L. (Teleostei, Pisces). *Fish Shellfish Immunol.*, **5**, 1-3.
- 104 **Lewis, D.H.**, 1985. Vibriosis in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.*, **8**, 539-545.
- 105 **Lillehaug, A., Sevatdal, S. & Endal, T.**, 1996. Passive transfer of specific maternal immunity does not protect Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry against yersiniosis. *Fish Shellfish Immunol.*, **6**, 521-536.
- 106 **Lloyd-Evans, P.**, 1993. Development of the lymphomyeloid system in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Dev. Comp. Immunol.*, **17**, 501-514.
- 107 **Lobb, C.J.**, 1986. Preferential expression of catfish light chain immunoglobulin isotypes in a teleost Fish. *J. Immunogenetics*, **13**, 19-28.
- 108 **Lobb, C.J. & Clem, L.W.**, 1981. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. X. Humoral immunoglobulins of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*. *Dev. Comp. Immunol.*, **5**, 271-282.
- 109 **Lobb, C.J. & Clem, L.W.**, 1982. Fish lymphocytes differ in the expression of surface immunoglobulin. *Dev. Comp. Immunol.*, **6**, 473-479.
- 110 **Lobb, C.J. & Clem, L.W.**, 1983. Distinctive subpopulations of catfish serum antibody and immunoglobulin. *Molecular Immunol.*, **8**, 811-818.
- 111 **Lobb, C.J. & Olson, M.O.J.**, 1988. Immunoglobulin light chain classes in a teleost fish. *J. Immunol.*, **132**, 8191-1923.

- 112 **Lopez-Ruiz, A., Esteban, M.A. & Meseguer, J.**, 1992. Blood cells of the gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.): light and Electron microscopic studies. *Anat. Rec.*, **234**, 161-171.
- 113 **LoPresto, C.J., Schwarz, L.K. & Burnett, K.G.**, 1995. An *in vitro* culture system for peripheral blood leucocytes of a Sciaenid fish. *Fish Shellfish Immunol.*, **5**, 97-107.
- 114 **Luft, J.C., Clem, L.W. & Bly, J.E.**, 1991. A serum-free culture medium for channel catfish *in vitro* immune responses. *Fish Shellfish Immunol.*, **1**, 131-139.
- 115 **Mananos, E., Zanuy, S., Le Menn, F., Castillo, M. & Nunez, J.**, 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. 1. Induction, purification and partial characterization. *Dev. Comp. Biochem.*, **107B**, 205-216.
- 116 **Marsden, M.J. & Secombes, C.J.**, 1993. Proliferative responses of T and B cells from immunized rainbow trout to antigens of *aeromonas salmonicida*. In: *Europ. assoc. Fish Pathol.*, Brest, 1993. comm. orale.
- 117 **Marsden, M.J., Hamdani, S.H. & Secombes, C.J.**, 1995. Proliferative responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, T and B cells to antigens of *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.*, **5**, 199-210.
- 118 **Matsubara, A., Mihara, S. & Kusada, R.**, 1985. Quantification of yellowtail immunoglobulin by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 921-925.
- 119 **Meseguer, J., Esteban, M.A. & Agulleiro, B.**, 1991. Stroma cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). An ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.*, **54**, 299-309.
- 120 **Meseguer, J., Lopez-Ruiz, A. & Esteban, M.A.**, 1994a. Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Histochemistry*, **102**, 37-44.

- 121 **Meseguer, J., Lopez-Ruiz, A. & Esteban, M.A.**, 1994b. Melanomacrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. *Cell Tissue Res.*, **277**, 1-10.
- 122 **Meseguer, J., Esteban, M.A., Munoz, J. & Lopez-Ruiz, A.**, 1993. Ultrastructure of the peritoneal exudate cells of seawater teleosts, seabream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Cell Tissue Res.*, **273**, 301-307.
- 123 **Meseguer, J., Esteban, M.A., Garcia Ayala, A., Lopez-Ruiz, A. & Agulleiro, B.**, 1990. Granulopoiesis in the head kidney of the seabass (*Dicentrarchus labrax L.*): An ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.*, **53**, 287-296.
- 124 **Miller, N.M. & Clem, L.W.**, 1984. Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens. *J. Immunol.*, **133**, 2356-2359.
- 125 **Miller, M.J., Sizemore, R.C. & Clem, L.W.**, 1985. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity : the cellular requirement for *in vitro* antibody responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.*, **34**, 2884-2888.
- 126 **Miller, M.J., Bly, J.E., Van Ginkel, F., Ellsaesser, C.F. & Clem, L.W.**, 1987. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.*, **11**, 739-747.
- 127 **Mor, A. & Avtalion, R.R.**, 1988. Evidence of transfert of immunity from mother to eggs in Tilapias. *Israeli J. Aquac.*, **44**, 22-28.
- 128 **Mor, A. & Avtalion, R.R.**, 1990. Transfert of antibody activity from immunized mother to embryos in Tilapias. *J. Fish Biol.*, **37**, 249-255.

- 129 **Morgan, J.A.W., Pottinger, T.G. & Rippon, P.**, 1993. Evaluation of flow cytometry as a method for quantification of circulating blood cell populations in salmonid fishes. *J. Fish Biol.*, **42**, 131-141.
- 130 **Mori, K., Nakai, T., Nagahara, M., Muroga, K., Mekuchi, T. & Kanno, T.**, 1991. A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redbanded grouper. *Gyobyō Kenkyū*, **26**, 209-210.
- 131 **Mori, K., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K. & Furosawa, I.**, 1992. Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, **187**, 368-371.
- 132 **Mulero, V., Esteban, M.A., Munoz, J. & Meseguer, J.**, 1994. Non-specific cytotoxic response against tumor target cells mediated by leucocytes from seawater teleosts, *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural study. *Arch. Histol. Cytol.*, **57**, 351-358.
- 133 **Munday, B.L., Langdon, J.S., Hyatt, A. & Humphrey, J.D.**, 1992. Mass mortality associated with a viral induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquacult.*, **103**, 197-211.
- 134 **Mushiake, K., Nakai, T., Muroga, K., Sekiya, S. & Furosawa, T.**, 1993. Viral nervous necrosis virus (VNN) of striped jack: effects of plasma antibody level of spawners and spawning conditions on the occurrence of the disease in their offsprings. *Suisanzoshoku*, **41**, 327-332.
- 135 **Mushiake, K., Nishizawa, T., Nakai, T., Furuzawa, T. & Muroga, K.**, 1994. Control of VNN in striped jack : Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, **29**, 177-182.
- 136 **Mushiake, K., Arimoto, M., Furosawa, T., Furosawa, I., Nakai, T. & Muroga, K.**, 1992. Detection of antibodies against striped jack nervous

- necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **583**, 2351-2356.
- 137 **Nakai, T., Nguyen, H.D., Nishizawa, T., Muroga, K., Arimoto, M. & Ootsuki, K.**, 1994. Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer. *Fish Pathol.*, **29**, 211-212.
- 138 **Nagae, M., Fuda, H., Kawamura, H. & Yamauchi, K.**, 1993. Changes in serum immunoglobulin M (IgM) concentrations during early development of Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) as determined by sensitive ELISA technique. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106A**, 69-74.
- 139 **Nakanishi, T.**, 1986. Ontogenetic development of the immune response in the marine teleost *Sebastiscus marmoratus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 473-477.
- 140 **Navarro, V., Quesada, J.A., Abad, M.E., Taverne, N. & Rombout, J.H.W.M.**, 1993. Immuno(cyto)chemical characterisation of monoclonal antibodies to gilthead sea bream (*Sparus aurata*) immunoglobulin. *Fish Shellfish Immunol.*, **3**, 167-177.
- 141 **Nishimura, H., Akamatsu, N., Ikemoto, M., Kawai, K., Miyazawa, H., Fujimoto, S. & Kusuda, R.**, 1995. Monoclonal antibody against yellowtail thymic lymphocyte recognizing a lymphocytic subpopulation. *Fish. Sci.*, **61**, 181-185.
- 142 **Nishizawa, T., Mori, K., Nakai, T., Furosawa, T. & Muroga, K.**, 1993. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquatic Org.*, **18**, 103-107.
- 143 **Nguyen, H.D., Mekuchi, K., Imura, K., Nakai, T., Nishizawa, T. & Muroga, K.**, 1994. Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery reared juvenile Japanese flounder. *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, **60**, 551-554.

- 144 **Office International des Epizooties** , 1995. Viral encephalopathy and retinopathy. In: Diagnostic manual for aquatic animal diseases. *Office international des Epizooties (OIE eds)*, Paris, 1995. Chapter 8, pp. 85-90.
- 145 **Olsen, Y.A. & Press, C.McL.**, 1997. Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and the localization of immunoglobulin in the egg. *Fish Shellfish Immunol.*, **7**, 81-91.
- 146 **O'Neill, J.G.**, 1989. Thymic development in two species of marine teleost; an Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum* Boulanger, and a warmwater sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus). *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.*, **2**, 83-93.
- 147 **Ortiz-Muniz, G. & Sigel M.M.**, 1971. Antibody synthesis in Lymphoid Organs of two marine teleosts. *Res. J. Reticuloendot. Soc.*, **9**, 42-52.
- 148 **Ourth, D.D, Ratts, V.D. & Parker, N.C.**, 1991. Bactericidal complement activity and concentration of immunoglobulin M, transferrin, and protein at different ages of channel catfish. *J. Aquatic Anim. Health*, **3**, 274-280.
- 149 **Padros, F. & Crespo, S.**, 1996. Ontogeny of the lymphoid organs in the turbot *Scophthalmus maximus*: a light and electron microscope study. *Aquacult.*, **144**, 1-16.
- 150 **Pacha, R. & Kiehn, E.D.**, 1969. Characterization and relatedness of marine vibrios pathogenic to fish : physiology, serology, and epidemiology. *J. Bacteriol.*, **100**, 1242-1247.
- 151 **Palenzuela, O., Sitja-Bobadilla, A. & Alvarez-Pellitero, P.**, 1996. Isolation and partial characterization of serum immunoglobulins from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, **6**, 81-94.

- 152 **Pilström, L. & Petersson, A.**, 1991. Isolation and partial characterization of immunoglobulins from cod (*Gadus morhua* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, **15**, 143-152.
- 153 **Pottinger, T.G. & Pickering, A.D.**, 1992. The influence of social interaction on the acclimatation of rainbow trout, *Onchyrhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *J. Fish Biol.*, **41**, 435-447.
- 154 **Press, C.Mcl., Dannevig, B.H. & Landsverk, T.**, 1994. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and non lymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, **4**, 79-94.
- 155 **Quentel, C. & Obach, A.**, 1990. La composition cellulaire des organes hématopoiétiques du Bar (*Dicentrarchus labrax* L.). *Ichthyophysiol. Acta*, **13**, 59-70.
- 156 **Quesada, J., Villena, M.I. & Navarro, V.**, 1994. Ontogeny of the sea bass spleen (*Dicentrarchus labrax*): A light and electron microscopic study. *J. Morphol.*, **221**, 161-176.
- 157 **Razquin, B.E., Castillo, A., Lopez-Fierro, P., Alvarez, F., Zapata, A., & Villena, A.J.**, 1990. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno- and enzyme-histochemical study. *J. Fish Biol.*, **36**, 159-173.
- 158 **Reilly, P. & Mulcahy, M.F.**, 1993. Humoral antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) immunised with extracts derived from the ectoparasitic caligig copepods, *Caligus elongatus* (Nordmann, 1832) and *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer, 1838). *Fish Shellfish Immunol.*, **3**, 59-70.
- 159 **Reitan, L.J. & Thuvander, A.**, 1991. *In vitro* stimulation of salmonid leucocytes with mitogens and with *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.*, **1**, 297-308.

- 160 Renault, T. Haffner, P., Baudin-Laurencin, F., Breuil, G. & Bonami, J.R., 1991. Mass mortality in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bull. Europ. Assoc. Fish Pathol.*, **11**, 68-73.
- 161 Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **17**, 208-212.
- 162 Richards, R.H. & Roberts, R.J., 1979. Bactériologie des téléostéens. In: *Pathologie du poisson*, Roberts R.J. (ed.), Maloine, Paris, 1979, pp.184-204.
- 163 Rodriguez, P.N.S., Hermesen, T.T., Rombout, J.H.W.M., Egberts, E. & Stet, R.J.M., 1995. Detection of MHC class II transcripts in lymphoid tissues of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, **19**, 483-496.
- 164 Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D., 1989. Immunologie fondamentale et appliquée. *MEDSI*. Mc Graw-Hill Healthcare Group. 2e édition 1989. 338 pp.
- 165 Romestand, B., Breuil, G., Bourmaud, C.A.F., Coeurdacier, J.L. & Bouix, G., 1995. Development and characterisation of monoclonal antibodies against seabass immunoglobulins (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758). *Fish Shellfish Immunol.*, **5**, 347-358.
- 166 Romestand, B., Dragesco, A., Breuil, G., Coste, F. & Bouix, G., 1993. An ELISA technique for rapid diagnosis of vibriosis in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquatic org.*, **15**, 137-143.
- 167 Romestand, B. & Trilles J.P., 1984. Nomenclature et cytologie descriptive des éléments figurés du sang et des organes hématopoiétiques du bar (*Dicentrarchus labrax*). *Rec. Méd. Vét.*, **160**, 833-840.
- 168 Sailendri, K., Muthukkaruppan, V.R., 1975. Morphology of lymphoid organs in a cichlid teleost *Tilapia mossambica* (Peters). *J. Morphol.*, **147**, 109-122.

- 169 **Sanchez, C., Dominguez, J. & Coll, J.**, 1989. Immunoglobulin heterogeneity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, **12**, 459-465.
- 170 **Sanchez, C. Lopez-Fierro, P., Zapata, A. & Dominguez, J.**, 1993. Characterisation of monoclonal antibodies against heavy and light chains of trout immunoglobulin. *Fish Shellfish Immunol.*, **3**, 237-252.
- 171 **Scapigliati, G., Mazzini, M., Mastrolia, L., Romano, N. & Abelli, L.**, 1995. Production and characterisation of a monoclonal antibody against the thymocytes of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) (Teleostea, Percichthyidae). *Fish Shellfish Immunol.*, **5**, 393-406.
- 172 **Scapigliati, G., Romano, N., Pichiatti, S., Mazzini, M., Mastrolia, L., Scalia, D. & Abelli, L.**, 1996. Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalisation of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays. *Fish Shellfish Immunol.*, **6**, 383-401.
- 173 **Schiewe, M.H., Trust, T.J. & Crosa, J.H.**, 1981. *Vibrio ordalii* sp. nov.: a causative agent of vibriosis in fish. *Curr. Microbiol.*, **6**, 343-348.
- 174 **Secombes, C.J. & Manning, M.J.**, 1980. Comparative studies of the immune system of fishes and amphibians: antigen localization in the carp *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.*, **3**, 399-412.
- 175 **Secombes, C.J., Van Groningen, J.J.M., Van Muiswinkel, W.B. & Egberts, E.**, 1983. Ontogeny of the immune system in carp (*Cyprinus carpio* L.). The appearance of antigenic determinants on lymphoid cells detected by mouse anti-carp thymocyte monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.*, **7**, 455-464.
- 176 **Shors, S.T. & Winston, V.**, 1989. Neutralizing antibodies for infectious hematopoietic necrosis virus in eggs of steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Am. Vet. Res.*, **50**, 232-234.

- 177 **Sin, Y.M., Ling, K.H. & Lam, T.J.**, 1994. Passive transfert of protective immunity against ichthyophthiriasis from vaccinated mother to fry in tilapias, *Oreochromis aureus*. *Aquacult.*, **120**, 229-237.
- 178 **Sizemore, R.C., Miller, N.W., Cuchens, M.A., Lobb, C.J. & Clem, L.W.**, 1984. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity : the cellular requirements for *in vitro* mitogenic responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.*, **133**, 2920-2994.
- 179 **Sniezko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E & Boone, J.G.**, 1964. Pasteurella species from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J. Bacteriol.*, **88**, 1814-1815.
- 180 **Sorensen, U.B.S. & Larsen, J.L.**, 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 593-597.
- 181 **Takemura, A.**, 1993. Changes in an immunoglobulin M (IgM)-like protein during larval stages in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquacult.*, **115**, 233-241.
- 182 **Tatner, M.F.**, 1986. The ontogeny of humoral immunity in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **12**, 93-105.
- 183 **Tatner, M.F. & Findlay, C.**, 1991. Lymphocyte migration and localisation patterns in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, studied using the tracer sample method. *Fish Shellfish Immunol.*, **1**, 107-117.
- 184 **Temmink, J.H.M. & Bayne, C.J.**, 1987. Ultrastructural characterization of leucocytes in t-he pronephros of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.*, **11**, 125-137.
- 185 **Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magarinosz, B. & Barja, J.L.**, 1991. Pasteurellosis in cultures guilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquacult.*, **99**, 1-15.

- 186 **Van der Heijden, M.H.T., Booms, G.H.R., Tanck, M.W.T., Rombout, J.H.W.M. & Boon, J.H.**, 1995. Influence of flumequine on in vivo mitogen responses of European eel (*Anguilla anguilla*) lymphoid cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **47**, 1-2.
- 187 **Van Diepen, J.C.E., Wagenaar, G.T.M. & Rombout, J.H.W.M.**, 1991. Immunocytochemical detection of membrane antigens of carp leucocytes using light and electron microscopy. *Fish Shellfish Immunol.*, **1**, 47-57.
- 188 **Van Rees, E.P., Dijkstra, C.D. & Sminia, T.**, 1990. Ontogeny of the rat immune system: an immunocytochemical approach. *Dev. Comp. Immunol.*, **14**, 9-18.
- 189 **Vilain, C., Wetzel, M.C., DuPasquier, L., Charlemagne, J.**, 1984. Structural and functional analysis of spontaneous anti-nitrophenyl antibodies in three cyprinid fish species: carp (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) and tench (*Tinca tinca*). *Dev. Comp. Immunol.*, **8**, 611-622.
- 190 **Verburg-van Kemenade, B.M.L., Groeneveld, A., van Rens, B.T.T.M. & Rombout, J.H.W.M.**, 1994. Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). *J. Exp. Biol.*, **187**, 143-158.
- 191 **Vigneulle, M., Breuil, G., Ceschia, G. & Blanch, A.**, 1993. Vaccination trials of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against two serotypes of *Vibrio anguillarum*. In *EAFP VIth International Conference Disease of Fish and Shellfish*, European Association of Fish Pathologists, eds. Book of abstracts. CNEVA, Brest, pp.66.
- 192 **Warr, G.W.**, 1982. Behavior of unreduced polymeric and monomeric immunoglobulins in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Molecular Immunol.*, **19**, 75-81.
- 193 **Warr, G.W.**, 1983. Immunoglobulin of the toad fish, *Spheroides glaber*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **76B**, 507-514.

- 194 **Waterstrat, P.R., Ainsworth, A.J. & Capley, G.**, 1988. Use of a discontinuous Percoll gradient technique for the separation of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), peripheral blood leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, **11**, 289-294.
- 195 **Weiss, E & Avtalion, R.R.**, 1977. Regulatory effect of temperature and antigen upon immunity in ectothermic vertebrates. II. Primary enhancement of anti-hapten antibody response at high and low temperatures. *Dev. Comp. Immunol.*, **1**, 93-104.
- 196 **West, P.A. & Colwell, R.R.**, 1984. Identification and classification of vibriionaceae. An overview. In: *Vibrios in the environment*, Cowell R.R. (ed.). John Wiley & sons, New York, pp. 285-363.
- 197 **Yousif, A.N., Albright, L.J. & Evelyn, T.P.T.**, 1995. Immunological evidence for the presence of an IgM-like immunoglobulin in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 109-115.
- 198 **Yoshikoki, K. & Inoue, K.**, 1990. Viral nervous necrosis in hatchery-reared and juvenile of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, **13**, 69-77.
- 199 **Zapata, A.**, 1979. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.*, **3**, 55-65.
- 200 **Zapata, A.**, 1981. Lymphoid organs of teleost fish. I. Ultrastructure of the thymus of *Rutilus rutilus*. *Dev. Comp. Immunol.*, **5**, 427-436.
- 201 **Zapata, A.**, 1983. Phylogeny of the fish immune system. *Bull. Inst. Pasteur*, **81**, 175-186.
- 202 **Zettergren, L.D.**, 1982. Ontogeny and distribution of cells in B lineage in the american leopard frog, *Rana pipiens*. *Dev. Comp. Immunol.*, **6**, 311-320.

SARL LA GOUTTE D'ENCRE
34 000 MONTPELLIER - FRANCE
04-67-65-30-96

