

TIBI Isabelle

2^{ème} année IUT Génie Biologique

Option Analyses Biologiques et Biochimiques

IUT La Rochelle

Mise en évidence d'une activité de type
phénoloxydase chez l'huître creuse, *Crassostrea*
gigas

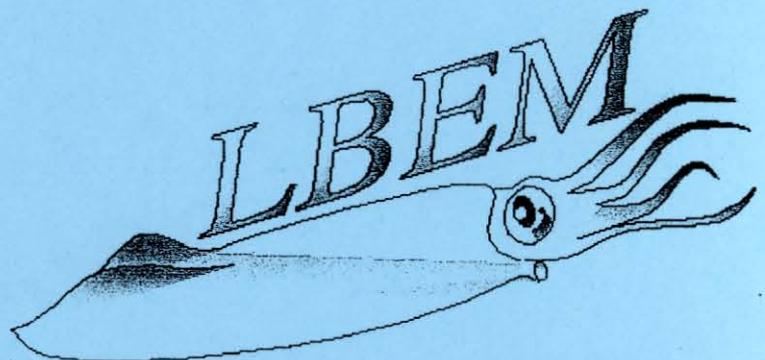


Stage effectué du 10 avril 2000 au 17 juin 2000



**IFREMER, Laboratoire de
Génétique et Pathologie**

BP 133
17390 La Trembade
Tel : 05.46.36.98.36



**Laboratoire de Biologie et
Environnement Marins**

Université de La Rochelle
av. Michel Crépeau
17042 LA ROCHELLE
Tel : 05.46.45.82.25

REMERCIEMENTS

Je remercie plus particulièrement T. Renault ,chercheur au laboratoire de Génétique et Pathologie de la station IFREMER de La Tremblade, qui m'a encadré et suivie tout au long de mon stage. Merci pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils et sa patience.

Je remercie aussi H. Guyon-Thomas, maître de conférence à la faculté de La Rochelle, pour m'avoir choisit comme stagiaire et pour sa présence via le courrier électronique et le téléphone.

Je tiens aussi à exprimer mes remerciement à Monsieur André Gérard chef du laboratoire de Génétique et Pathologie de la station IFREMER de La Tremblade qui m'a permis d'effectuer mon stage au sein de son laboratoire.

Merci, à tous le personnel de la station IFREMER de La Tremblade pour leur accueil et leur bonne humeur.

Et plus particulièrement, merci à Stéphane et Sébastien pour leur gentillesse. Sans eux ce stage aurait été, techniquement, plus difficile à réaliser.

SOMMAIRE

Introduction	1
Matériel et méthodes	4
♦ Matériel biologique	4
Larves infectées	4
Larves axéniques	4
Infection des larves axéniques par le virus de type Herpès	5
Récupération des larves et des embryons d'huîtres creuse	6
Obtention d'hémocytes d'huîtres adultes	6
♦ Dosage des protéines totales	7
♦ Evaluation de l'activité enzymatique de type phénoloxydase en densité optique	7
Recherche d'une activité de type phénoloxydase spontanée	8
Recherche de substances stimulatrices sur le système enzymatique de type phénoloxydase	8
Recherche de l'effet dose de différentes substances sur le déclenchement du système activateur	9
Recherche de substances inhibitrices du système enzymatique de type phénoloxydase	9
♦ Recherche d'une activité enzymatique de type phénoloxydase sur cellules cytocentrifugées	11
♦ Détection d'une activité de type phénoloxydase en microscopie électronique à transmission	11
Résultats	14
♦ Evaluation de l'activité de type phénoloxydase par lecture en densité optique	14
Concentration des échantillons en protéines totales	14
Evaluation de l'activité de type phénoloxydase spontanée	15
Evaluation de l'activité enzymatique de type phénoloxydase en présence des substances stimulatrices	17
Recherche de l'effet dose de différentes substances sur le déclenchement du système activateur	19
♦ Evaluation de l'activité de type phénoloxydase en présence d'inhibiteurs	20
♦ Recherche de l'activité de type phénoloxydase sur cellules cytocentrifugées	21
♦ Détection de l'activité de type phénoloxydase en microscopie à transmission	22
Discussion	25
Conclusion	30
Annexes	31

INTRODUCTION :

Les huîtres (*Bivalvia*, *Ostreidae*) sont parmi les espèces les plus importantes pour la conchyliculture mondiale du fait de leur production et de leur valeur marchande. Cependant, ces productions ont été sujettes à des fluctuations importantes au cours du temps, des maladies infectieuses étant un des facteurs limitants essentiels pour toutes les espèces exploitées commercialement. Les organismes pathogènes observés chez les huîtres sont des virus, des procaryotes, des champignons et des parasites protozoaires. En particulier des infections par des virus de type herpès sont détectées depuis le début des années 90 en France, en association à des épisodes de mortalités massives chez les larves et le naissain de différentes espèces de bivalve. (1)

Les élevages de coquillage se faisant essentiellement en milieu ouvert, l'utilisation de substances médicamenteuses pour protéger ces animaux vis à vis des maladies infectieuses reste limitée et la plupart du temps inadaptée. L'absence de mécanisme de défense spécifique chez ces espèces empêche l'utilisation de la vaccination comme moyen prophylactique. D'autre part, la sélection des populations résistantes à certaines maladies est une approche prometteuse qui a déjà donné certains résultats pour l'huître américaine, *Crassostrea virginica*. (2). Cependant, les bases des mécanismes de défense impliqués ne sont pas encore clarifiés.

Les invertébrés dont font partie les mollusques bivalves, ne possèdent pas de système immunitaire spécifique inductible adaptatif doué de mémoire. En effet, ils ne possèdent pas de cellules de type lymphocytaire. Cependant, des cellules particulières, présentes dans l'hémolymphe et dans les tissus, les hémocytes interviennent dans les mécanismes de défense chez ces animaux. Chez les mollusques, les hémocytes participent directement à l'élimination des organismes pathogènes par l'intermédiaire du processus de phagocytose. De plus, les enzymes hydrolytiques et les substances cytotoxiques produites et sécrétées par ces cellules interviennent également de manière active dans le processus de destruction extracellulaire des agents pathogènes. (3).

La recherche d'activité enzymatique comme la composition en protéines peut être la base pour détecter des activités ou des fonctions particulières pour certaines cellules. En effet, les enzymes présentes dans l'hémolymphe, associées ou non aux hémocytes, participent aux processus de dégradation des particules étrangères au cours de la phagocytose, mais interviennent également dans l'élimination d'organismes pathogènes par le biais d'activité extracellulaire dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe. La détection d'activités enzymatiques peut permettre une meilleure compréhension du rôle pris par les substances dans les mécanismes de défense et en fonction de leur distribution dans les différents types cellulaires, de définir quels sont les acteurs précis intervenant dans un processus particulier de défense.

Chez plusieurs invertébrés marins (crevettes, moules) il a été démontré que la présence d'une enzyme dans les hémocytes serait à l'origine d'un phénomène de mélanisation. Cette enzyme, la phénoloxydase active une cascade protéique. Elle transforme la L-dopa en dopaquinone qui est synthétisée en mélanine. (4) (annexe 1). Les composés ainsi formés ont un pouvoir microbicide et permettraient la formation de capsules autour de l'agent pathogène. (5). Ainsi encapsulé ce dernier serait plus facilement détruit par l'organisme.

Cette étude a pour but de mieux comprendre les mécanismes de défense immunitaire de l'huître creuse *Crassastrea gigas*. Nous chercherons à évaluer, à différents stades du développement de ces invertébrés (embryons, larves, adultes), l'expression d'une activité de type phénoloxydase (PO) susceptible d'être impliqué au cours de la réponse immunitaire chez ces mollusques bivalves marins.

Les effets de divers substances susceptibles d'induire le déclenchement du système activateur de la phénoloxydase seront observés chez ces invertébrés marins. Par conséquent, il est indispensable de définir les conditions de réaction permettant une activité phénoloxydase optimum, à partir des conditions permettant par ailleurs une bonne activation de la prophénoloxydase.

MATERIEL ET METHODES

I/ MATERIEL BIOLOGIQUE

Le terme «larve» est utilisé pour décrire le stade embryonnaire caractérisé par une vie libre hors de l'œuf. Ce stade précède la métamorphose, qui correspond chez les huîtres à l'étape de fixation (21 jours), étape au cours de laquelle la larve perd son vélum et donc son activité de nage. On parle ensuite de naissain (juvéniles).

1/ Larves infectées

Des échantillons de larves, contrôlés comme infectés par le virus de type herpès (microscopie électronique à transmission et PCR), sont conservés congelés à -20°C .

A chaque essai, la quantité de matériel (aliquots) infecté nécessaire est décongelée. Les lots principalement utilisés proviennent d'une éclosérie privée située dans la baie de Bourgneuf (Vendée). Ils sont conservés au congélateur depuis juillet 1995 (lot 95R246/29). Ces lots ont été choisis parmi d'autres lots contrôlés comme positif en microscopie électronique à transmission ou en PCR, sur la base de l'observation macroscopique de larves axéniques expérimentalement infectées par ce matériel (Séverin, 1996), à savoir la sédimentation après 48 heures d'élevage et l'observation de lésions du vélum. Donc, non seulement la présence du virus a été confirmée par l'analyse en microscopie électronique à transmission ou en PCR, mais les virions ont conservé leur virulence, c'est à dire leur pouvoir infectieux.

Cette manipulation s'effectue sur de la glace, à environ 4°C , pour éviter la dénaturation de l'enveloppe du virus qui lui confère sa virulence. On pèse 400 mg de larves entières infectées et congelées que l'on dilue dans 200 μl d'eau de mer filtrée à 0.22 μm et autoclavée. Le mélange ainsi obtenu est broyé à l'aide d'un piston Pellet en tube Eppendorf. Ce broyât est ensuite récupéré dans 10 ml d'eau de mer filtrée et autoclavée. Une centrifugation à 2500 tours pendant 10 min est effectuée à 4°C . Le surnageant ainsi obtenu est filtré à 0.45 μm , puis à 0.22 μm .

2/ Larves axéniques

La ponte, c'est à dire l'obtention d'œufs fécondés, est réalisée en conditions stériles. Les géniteurs, proviennent de l'éclosérie de l'IFREMER de Ronces les

Bains (Charente Maritime) ou de différentes entreprises ostréicoles de La Tremblade (Charente Maritime). La surface externe des valves des géniteurs matures est tout d'abord brossée sous l'eau courante, rincée à l'alcool à 70% et séchée sous hotte à flux laminaire. Ce traitement est réalisé afin d'éliminer l'épifaune.

Puis, on procède à l'ouverture des huîtres avec un couteau stérilisé à l'alcool. Les animaux sont rincés successivement avec de l'eau de mer filtrée à $0,22\mu\text{m}$, autoclavée et additionnée de 0,1% Tween 80 (polyoxyéthylène Sorbitan Mono-Oléate), puis avec de l'eau de mer filtrée à $0,22\mu\text{m}$ et autoclavée. Afin d'identifier les individus mâles et femelles, des gamètes prélevés avec la pointe d'un scalpel stérile sont observés au microscope photonique en présence d'une goutte d'eau de mer. Seuls les individus possédant des gamètes en bon état (mobilité des spermatozoïdes, ovocytes en formes de poire, et peu de bactéries à l'observation au microscope) sont sélectionnés et décontaminés avec de la Bétadine (un rinçage rapide, un contact de dix minutes suivi d'un autre rinçage rapide). Après scarification de la gonade pour chaque géniteur sélectionné, les gamètes sont récupérés par aspiration à l'aide d'une pipette stérile de 5 ml. Ils sont ensuite déposés dans un Erlen Meyer contenant 300 ml d'eau de mer stérile filtrée à $0,22\mu\text{m}$ et autoclavée.

Dix ml de spermatozoïdes sont mis en contact pendant 1 heure avec 300 ml d'une suspension d'ovules. Des œufs fécondés sont ainsi obtenus. Ils sont distribués, toujours sous hotte à flux laminaire, dans des ballons contenant de l'eau de mer stérile (filtrée à $0,22\mu\text{m}$ et autoclavée), complétée en antibiotiques (1 ml par litre d'eau d'élevage des solutions suivantes : pénicilline G à 100 U/ml, streptomycine à 0.1 mg/ml, fluméquine à 0.03 mg/ml, kanamycine à 0.1 mg/ml, acide oxolinique à 0.1 mg/ml et erythromyvine à 0.1 mg/ml). Les larves axéniques sont maintenues à une température de $25-26^{\circ}\text{C}$, sans bullage et sans apport de nourriture. Elles se développent normalement jusqu'au stade D et peuvent survivre dans ces conditions plus de quinze jours après la fécondation sans apport de nourriture (algues).

3/ Infection des larves axéniques par le virus de type Herpès

Trois ballons reçoivent 3.5 ml d'un filtrat de larves infectées et filtré à $0,45\mu\text{m}$ puis $0,22\mu\text{m}$, les autres ballons reçoivent la même quantité d'eau de mer filtrée stérile pour servir de témoins négatifs. Des échantillons de filtrat sont prélevés après chaque filtration, ainsi que des échantillons de chaque ballon, pour être testés en PCR.

4/ Récupération des larves et des embryons d'huître creuse *Crassostrea gigas*

Au préalable le filtre, l'eau bidistillée filtrée à 0.22 μm , les tubes Eppendorf bleus avec les pistons Pellet adaptés sont autoclavés pour que les manipulations suivantes s'effectuent en conditions axéniques.

- ❖ filtration des six ballons de 1 litre contenant les larves ou l'Erlen Meyer de 500 ml contenant les embryons après la fécondation, avec le filtre à 0.22 μm .
- ❖ centrifugation 10 min à 2000tours/min, pour aider la sédimentation des larves ou embryons. Le culot est ensuite transféré dans un tube Eppendorf où il sera centrifugé à nouveau 10 min à 4000tours/min. Le culot est pesé.
- ❖ broyat du culot, à l'aide d'un piston Pellet, dans de l'eau bidistillée filtrée à 0.22 μm , à raison de 100 μl d'eau bidistillée pour 100mg de larves ou d'embryons.
- ❖ centrifugation 10 min à 4000tours/min, pour bien éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré pour des dosages. Le culot contenant le reste de coquille broyée, les cristaux de sels et les minéraux, est aussi récupéré. Les échantillons sont conservés au congélateur à -20°C.

5/ Obtention d'hémocytes d'huîtres adultes

Les animaux utilisés sont âgés de 2 à 3 ans et proviennent d'établissement ostréicoles de la Tremblade (Charente Maritime). Après ouverture précautionneuse des huîtres, afin de ne pas léser la membrane péricardique, l'hémolymphe est prélevée directement dans la cavité péricardique, à l'aide d'une seringue de 1 ml et d'une aiguille de 0.9 \times 25 mm. Les hémolymphe prélevées sont mélangées en tube plastique de 50 ml placé dans la glace le temps de la ponction, pour limiter l'agrégation des hémocytes. Aucune précaution de stérilité n'est suivie. Les cellules ont tendance à sédimenter rapidement et à se fixer à la paroi du tube. Il est donc nécessaire de travailler rapidement.

Pour vérifier la morphologie et la densité des cellules prélevées, on dépose 100 μl de la solution hémocytaire sur des lames histologiques. Ces lames sont cyto-centrifugées 1 min à 500 tours/min à 4°C, dans une centrifugeuse Universal 16R (Hettich). Ensuite ces lames sont colorées à l'aide d'un kit Hémacolor (Merck). Cette coloration est un dérivé rapide de la coloration de May-Grünwald. Le protocole consiste en trois bains successifs de 30 secondes dans du méthanol, dans une solution à base d'éosine et dans une dernière solution à base de bleu de méthylène. Après rinçage à l'eau courante et séchage à l'air, les lames sont montées entre lames et lamelles dans une goutte d'Eukitt (résine). On effectue la lecture des lames au microscope à immersion. Si la densité et la morphologie des cellules semblent satisfaisantes, 100 μl d'échantillon sont cyto-centrifugés

comme précédemment. On les fixe 20 min à froid (4°C) dans du liquide de Davidson (composition annexe 1-a), puis on les déshydrate successivement dans deux bains de 10 min d'éthanol 95°, puis trois bains de 10 min dans de l'éthanol absolu.

Le reste de l'hémolymphe ponctionné est centrifugé 10 min à 1500tours/min à 4°C. Le surnageant correspondant à la partie acellulaire, est à nouveau centrifugé 10 min 3500tours/min, puis congelé. Le premier culot est repris dans 1 ml de surnageant dans un tube Eppendorf puis centrifugé 10 min à 1500tours/min. On dépose une partie du culot dans 500 µl de glutaraldéhyde pour la microscopie électronique à transmission, que l'on place à 4°C pour le conserver. Le reste du culot est repris dans 200 µl d'eau bidistillée, puis centrifugé 10 min à 4000tours/min et congelé.

II/ DOSAGES DES PROTEINES TOTALES

La concentration en protéines totales contenues dans les échantillons est déterminée à l'aide d'un kit (Micro BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce). Le principe est basé sur l'interaction entre deux molécules d'acide bicinchinique (BCA) avec l'ion Cu^{2+} se traduisant par une réaction colorée pourpre, le produit obtenu étant soluble dans l'eau. Cette réaction peut être quantifiée par une lecture de la densité optique à 540 nm. La sérum albumine bovine (BSA) en solution à 1 mg/ml est utilisée comme standard. Les échantillons (surnageant de broyât d'embryons, de larves et d'hémocytes) dilués au 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 ainsi qu'une gamme étalon (sérum albumine bovine à différentes concentrations) sont déposés dans les puits d'une plaque de microtitration et mélangés avec la solution réactive. Après incubation à 37 °C pendant 30 minutes, la plaque est lue à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA (MCC/340, TITERTEK MULTISKAN) à la longueur d'onde de 540 nm.

La concentration en protéines totales de chaque échantillon étant connue, elle nous servira de référence lors de dosages plus spécifiques.

III/ EVALUATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE TYPE PHENOXYDASE EN DENSITE OPTIQUE

Chaque échantillon a été centrifugés 10 minutes à 13000 tours/min. Ainsi on obtient un nouveau surnageant purifié et un nouveau culot.

L'activation du système PO dans l'échantillon (embryons, larves, hémocytes d'huître creuse) est mesurée par la transformation de la L-dopa en dopa-

chromes que l'on détermine par spectrophotométrie à 490nm. La concentration totale des protéines sériques est déterminée par la méthode de Bradford. L'unité d'activité PO correspond à l'augmentation de la densité optique d'une unité par min et par mg de protéines. (6)

A/ Recherche d'une activité de type phénoloxydase spontanée

Protocole expérimental

Dans une microplaque de 96 puits, on distribue :

- 20 μ l d'échantillons. Les embryons de 3h sont dilués au 1/10, les larves au 1/2 et l'hémolymphe (hémocytes et partie acellulaire)
- 20 μ l de L-Dopa à 3 mg/ml, qui permet la synthèse de dopachromes grâce à la phénoloxydase
- 60 μ l de tampon cacodylate (CAC), (composition annexe 1-b)

On effectue aussi une série de témoins négatifs avec :

- 20 μ l d'échantillons
- 140 μ l de tampon cacodylate

Une lecture à 490 nm est réalisée toutes les 10 minutes à l'aide d'un lecteur ELISA.

B/ Recherche de substances stimulatrices sur le système enzymatique de type phénoloxydase

Protocole expérimental

- 20 μ l de chaque échantillon à tester sont incubés en présence de 20 μ l de substance stimulatrice (LPS, laminarine, trypsine, TPCK et divers sucres, à 1mg/ml conditionnés en Cac : isopropanol, méthanol). L'urée 6M conditionnée en Cac est testée pour sa capacité à induire l'activité enzymatique de type phénoloxydase.
- Les contrôles consistent à incuber 20 μ l d'échantillon en présence de 20 μ l de Cac.
- Après 20 min d'incubation à 20°C, 20 μ l de L-dopa (3mg/ml dans eau bidistillée) sont ajoutés comme substrat dans tous les puits et sont incubés pendant 1h à 20°C.
- Les milieux réactionnels sont dilués dans 60 μ l de Cac pour ralentir la réaction
- Les absorbances sont lues à 490nm toutes les dix minutes après l'addition de la L-dopa.

- Pour contrôler l'oxydation spontanée de L-dopa, 20 μ l de substrat de la réaction (L-dopa) sont incubés en présence de 100 μ l de Cac et sont lus en parallèle avec les autres puits de l'expérience.

Protéases exogènes / alcools :

Trypsine porcine
 TPCK Trypsine spécialement purifiée
 Urée (6M)
 Cac (témoins)
 Isopropanol
 Méthanol

glycoconjugués (carbohydrates et LPS) :

Laminarine (carbohydrates)
 Glucose (carbohydrate)
 Cac (témoins)
 LPS

C/ Recherche de l'effet dose de différentes substances sur le déclenchement du système activateur

Effet de divers activateurs: laminarine (1 mg/ml, 10mg/ml et 100 mg/ml) méthanol et isopropanol (pur, 1/2 et 1/10), sont testés à différentes concentrations.

Les contrôles sont réalisés en présence de Cac.

D/ Recherche de substances inhibitrices sur le système de type phénoloxydase

- Effet de la phénylthiourea (PTU) sur l'activité enzymatique de type PO

La PTU est un inhibiteur connu de la phénoloxydase chez les invertébrés (insectes). (7)

Protocole expérimental :

- 20 μ l des échantillons sont pré-incubés en présence de 20 μ l de 0.2mM PTU conditionnée en Cac pendant 10min avant de réagir en présence de 20 μ l de substance stimulatrice et de 20 μ l L-dopa comme précédemment.
- Cac qsp 120 μ l final.
- Dans les contrôles, la PTU est remplacée par le Cac.

- Les DO sont lues à 490nm toutes les dix minutes après l'addition de la L-dopa.
alcool + PTU
alcool + Cac
Cac

➤ Effet de Tropolone sur l'oxydation de la L-dopa *in vitro*

La Tropolone inhibe la phénoloxydase, mais n'a pas d'action sur le substrat de peroxydase. Le but de l'expérience est de vérifier si l'oxydation de L-dopa dans ces échantillons ne serait pas due à l'action d'une peroxydase (ascidies), (8).

Protocole expérimental :

- 20µl de l'échantillon sont pré-incubés en présence de 20µl de tropolone (16mM conditionné en Cac) pendant 10min avant l'addition de 20µl d'alcool pendant 20min.
- 20µl de L-dopa sont ajoutés au milieu réactionnel pendant 1h à 20°C.
- Cac qsp 120 µl final.
- Pour les contrôles positifs, la tropolone est remplacée par le Cac.
- Pour les contrôles négatifs, les échantillons sont préincubés en présence de tropolone et de tampon Cac à la place de l'alcool.
- Les absorbances sont lues à 490nm à temps fixes après l'addition de la L-dopa.
alcool + Tropolone
alcool + Cac
Cac + Tropolone
Cac

➤ Effet des inhibiteurs de sérines protéases (Benzamidine) sur l'activité enzymatique de type PO induite par des alcools

(ascidies : Jackson et *al.*, 1993)

- 20µl d'échantillon préparé en Cac sont pré-incubés pendant 10min à 20°C en présence de 20µl de Benzamidine (100mM) conditionné en Cac et cela avant d'ajouter 20µl d'alcool.
- Cac qsp 120 µl final.
- Les contrôles consistent à traiter les échantillons en présence de Cac à la place de l'inhibiteur de sérine protéase.
- Tous les milieux sont ensuite incubés en présence de 20µl de L-dopa et l'activité enzymatique de type phénoloxydase est évaluée comme précédemment.

alcool + Cac
alcool + Benzamidine (100mM)
Cac

IV/ RECHERCHE D'UNE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE TYPE PHENOLOXYDASE SUR CELLULES CYTOCENTRIFUGEES

Les échantillons (embryons) sont divisés dans deux tubes Eppendorf. Celui servant à la cyto centrifugation est d'abord centrifugé 8 min à 1000tours/min. On ajoute ensuite 1 ml de trypsine diluée au 1/8 dans du PBS 1100 mosm. L'action de la trypsine s'effectue toute une nuit à 4 °C. Les cellules ainsi dissociées sont cyto centrifugées sur lame histologique 1 min à 500tours/min à 4°C et colorées par le kit Hémacolor. Ainsi la dissociation et la concentration cellulaire sont appréciées par microscopie photonique. On effectue alors une fixation au Davidson sur le reste des échantillons (20 min dans le Davidson à 4°C), puis une déshydratation en éthanol : deux bains en éthanol 95% pendant 10 min et 2 bains de 10 min dans de l'éthanol absolu.

Les hémocytes d'huître adulte sont également soumis à ce type d'analyse (Matériel et méthode, I-5)

Les lames sont lavées trois fois en tampon CAC pour éliminer le reste de fixateur. Elles sont incubées une nuit à l'obscurité avec une goutte de L-Dopa ou de phénylthiourea (PTU). Les lames sont ensuite observées au microscope photonique. Les lames seront également traitées en isopropanol, en diaminobenzidine, en méthanol, en tropolone et en benzamidine.

V/ DETECTION D'UNE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE TYPE PHENOLOXYDASE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

Cette technique nécessite plusieurs étapes :

- Fixation des tissus

Il est important de fixer convenablement les tissus devant être observés en microscopie électronique à transmission, afin de préserver l'ultrastructure. La fixation est réalisée directement en glutaraldéhyde 3%, à 4°C.

- Décalcification (éventuelle)

Les échantillons de larves de 5 à 6 jours ont été fixés avec leur coquille, celle-ci doit être décalcifiée pour ne pas gêner la confection de coupes ultrafines. La décalcification est effectuée en EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid).

Les échantillons sont centrifugés 10 min à 1000 tours/min, pour concentrer les larves dans le culot. Puis, ils sont déshydratés par des centrifugations successives en éthanol : éthanol 70%, une fois 10 min ; éthanol 95%, deux fois 15 min ; éthanol absolu, trois fois 20 min (10 min d'incubation et 10 min de centrifugation à 1000 tours/min). Ensuite, ils sont partiellement réhydratés en tampon cacodylate (10 min), pour faciliter la décalcification ultérieure par l'EDTA (3% en tampon cacodylate). Les échantillons sont décalcifiés par un bain d'EDTA d'une nuit (15H à 18H). L'EDTA est ensuite éliminé par deux bains successifs de 10 min en tampon cacodylate.

- Induction des échantillons

Les témoins négatifs sont lavés avec du tampon cacodylate qui ne permet aucune induction du système enzymatique de type phénoloxydase. Ces témoins sont divisés en deux lots, certains sont traités avec la L-Dopa à 3mg/ml et les autres au phénylthioura à 2mM (inhibiteur de protéase et donc inactivateur de la prophénoloxydase).

Les échantillons à stimuler sont lavés avec du méthanol, puis divisés en deux lots comme précédemment. L'incubation des larves avec ces réactifs est d'environ 18H.

Les larves sont ensuite lavées en tampon cacodylate pour retirer l'excédent de réactif.

- Post fixation

Deux lavages de l'échantillon sont réalisés en tampon Cac (2 x 10 min à 4000 tours/min). La post-fixation est ensuite réalisée à l'acide osmique à 1% en tampon Cac pendant une heure à 4°C. L'acide osmique est alors éliminé par deux lavages successifs en tampon Cac.

- Déshydratation, imprégnation et inclusion des échantillons

L'échantillon est déshydraté car la résine, servant à l'imprégnation, est non miscible à l'eau. La déshydratation s'effectue comme précédemment. La déshydratation est achevée dans de l'oxyde de propylène : deux bains de 15 min, pour éliminer l'alcool. Ce solvant permet également de préparer l'imprégnation ultérieure en résine Epon. Le culot larvaire est alors imprégné progressivement dans un mélange 50% oxyde de propylène - 50% résine Epon pendant une heure, puis dans un autre bain de résine Epon pure pendant une heure, puis l'Epon est renouvelé et les tubes placés à l'étuve à 60°C. La polymérisation de l'Epon s'effectue à 60°C pendant 48 heures.

- Coupe des blocs

Des coupes ultra-fines sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (LKB) et d'un couteau de diamant à une épaisseur de 90 à 100nm.

- Observation des échantillons

Les coupes sont observées, non contrastées, à l'aide d'un microscope électronique à transmission (JEOL 1200 EX) à 60Kvolts.

RESULTATS

I/ EVALUATION DE L'ACTIVITE DE TYPE PHENOXYDASE PAR LECTURE EN DENSITE OPTIQUE

1/ Concentration des échantillons en protéines totales

La concentration en protéines totales a été mesurée suivant la technique décrite précédemment (II/ Dosage des protéines totales).

On observe des différences entre les deux types d'échantillons. Les concentrations en protéines des échantillons après centrifugation, à forte vitesse (14000 tours/min), (annexe n°3 : traitement des échantillons), sont plus élevées que pour les échantillons centrifugés à faible vitesse.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1 ainsi que le facteur de multiplication à titre indicatif.

Echantillonnage	Age	Concentration en protéines totales (µg/ml)	Concentration en protéines totales (µg/ml) après centrifugation 15000trs/10min		Facteur de multiplication
			culot	surnageant	
Pool A (26 huitres) Hémocytes	Adulte	203,1	825,68	1774,1	4
Pool B (36 huitres) Hémocytes	Adulte	128,6	971,32	1706,09	7,5
Pool C (36 huitres) Hémocytes	Adulte	200	337	214,33	1,7
Larves 5 (infection j+5)	9 jours	7,73	40,2		5,2
Larves 5	9 jours	12,46	47,93		3,9
Larves 4	5 jours	9,5	51,54		5,5
Larves 3	6 jours	14,95	22,85		1,5
Larves 2	6 jours	261,19	1512,54		5,8
Larves 1	5 jours	31,4	58,76		1,9
Embryons 5	3 heures	6577,38	103580		15,8
Embryons 3	3 heures	3939,3	50147		12,8
Embryons 2	3 heures	2088	40000		19,2

Tableau 1: Concentration en protéines totales des échantillon

2/ Evaluation de l'activité enzymatique de type phénoloxydase spontanée

L'unité d'activité spécifique de type phénoloxydase dans les échantillons (embryons axéniques, larves axéniques et hémocytes d'huîtres creuses adultes) correspond à l'augmentation de la densité optique d'une unité par min et par mg de protéines. Ainsi cette activité est donnée par la mesure de la DO à 490 nm à un temps t sur la concentration en protéines totales de l'échantillons testés.

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{DO (490 nm)}}{\text{Concentration en protéines totales}}$$

L'activité enzymatique de type phénoloxydase est exprimée sous forme de densité optique pour simplifier la lecture, cependant le calcul précédent permet de calculer l'activité spécifique de cette enzyme de façon plus spécifique.

Les figures 1, 2 et le tableau 2 présentent les résultats obtenus pour chaque échantillons suivant leur stade d'évolution, et cela pour les tests du protocole n°1 (activité spontanée du substrat de la L-dopa)

a/ EMBRYONS AXENIQUES (3heures) :

Le tableau annexe 4-a, présente la cinétique de l'évolution du substrat de la L-dopa de façon spontanée.

Temps (min)	Ponte 2	Ponte 3	Ponte 5	
			Témoins +	Témoins -
0	0,216	0,365	0,536	0,586
230	0,205	0,33	0,536	0,57

Tableau 2: Activité spontanée de type phénoloxydase dans les embryons

Les témoins négatifs n'ont pas été incubés en présence de L-dopa, celle-ci est remplacée par du tampon CAC.

Les échantillons d'embryons ne montrent aucune activité du système phénoxydase. En effet les valeurs de DO observées pour les échantillons sont identiques à celles observées pour le contrôle avec la L-dopa seul. La variation de DO est très faible au cours du temps, les valeurs stagnent en plateau.

b/ LARVES AXENIQUES :

Le tableau annexe 4-b, dévoile la cinétique du substrat de la L-dopa chez les larves axéniques, de façon spontanée.

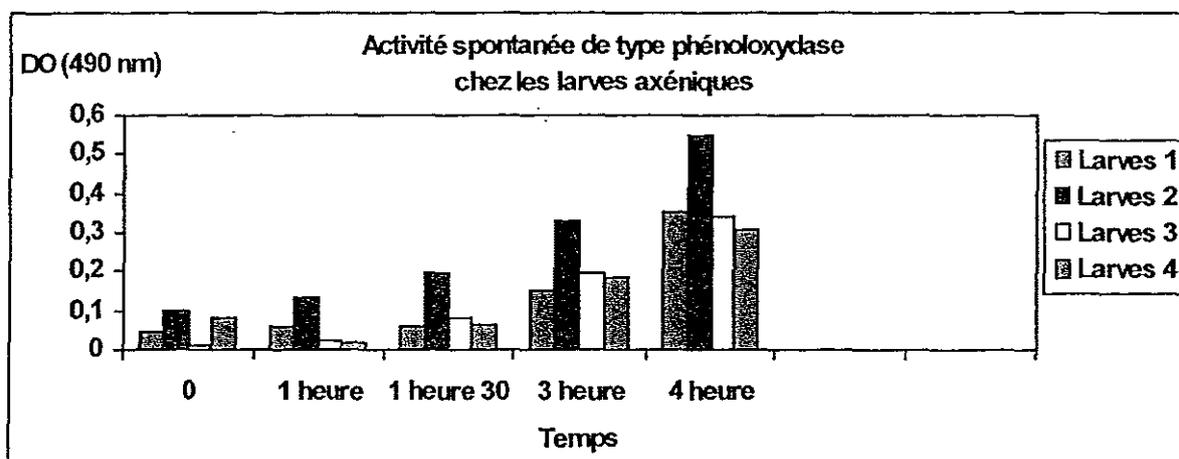


Figure 1 : L'activité du système de type phénoxydase est mesurée par la transformation de la L-dopa en dopa-chromes que l'on détermine par spectrophotométrie à 490 nm.

Une activité de type phénoxydase est détectée chez les larves axéniques. Elle augmente au cours du temps après l'ajout de L-dopa (figure 1), quel que soit l'échantillon analysé. Par ailleurs, des différences de valeur de DO sont observables entre les différentes séries de larves.

c/ HEMOLYPHE D'HUITRE ADULTE :

Deux lots d'hémocytes ont été analysés (culot cellulaire et fraction acellulaire) (annexe n° 4-c). Une activité de type phénoloxydase est détectée dans les deux fractions. Les valeurs de DO sont cependant plus importantes dans les échantillons correspondant aux culots. La cinétique effectuée montre que ces valeurs augmentent au cours du temps.

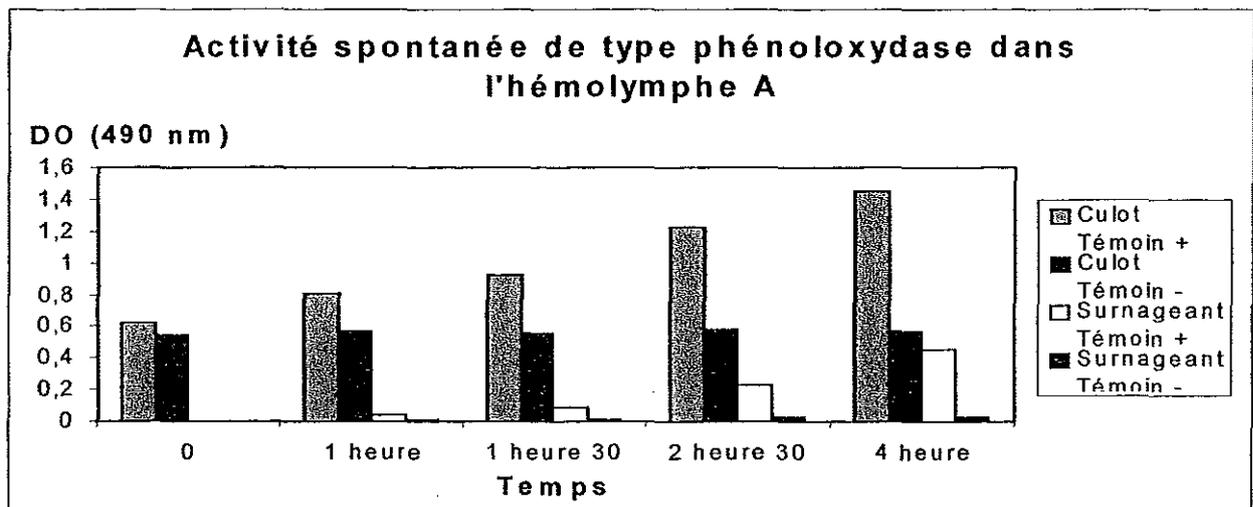


Figure 2: L'activation du système de type phénoloxydase dans l'hémolymph A est mesurée par la transformation de la L-dopa en dopa-chromes que l'on détermine par spectrophotométrie à 490 nm

Dans les témoins négatifs la L_dopa est remplacée par du tampon CAC.

Dans l'hémolymph totale du lot A, la densité optique des témoins positifs, du culot et du surnageant, augmente au cours du temps. Les témoins négatifs restent stables.

3/ Evaluation de l'activité enzymatique de type phénoloxydase en présence de substances stimulatrices

Les résultats bruts des différents essais sont donnés dans les annexes 5, 6 7 8 et 9. Le tableau 3 résume l'effet des différentes substances testées, suivant le type d'échantillon (embryons axéniques, larves axéniques et hémocytes d'huître creuse et le traitement.

Echantillon	Traitement	Activateurs					
		TPCK	Trypsine	Laminarine	Glucose	Méthanol	Isopropanol
Hémolymphhe	Totale	+	0	0	0	++	0
	Culot	0	+	0	++++ (2 mg/ml)	0	0
	Surnageant	++++	+	0	+ (100mg/ml)	0	0
Larves axéniques	Totale	0	0	0	+	0	0
	Culot	0	0	0	0	0	0
	Surnageant	0	0	0	++++	0	+
Embryons	Totale	0	0	0	0	++	++++
	Culot	+	+	0	0	++	++
	Surnageant	0	0	++++	0	++++	++++

Tableau 3: Les principaux activateurs du système phénoloxydase

« + » : différence densité optique avec le témoins négatif comprise entre 0.050 et 0.080

« ++ » : différence de DO comprise entre 0.080 et 0.120

« +++ » : différence de DO comprise entre 0.120 et 0.150

« ++++ » : différence de DO supérieure à 0.150

« 0 » : aucune différence de DO significative

« Totale » correspond aux échantillons avant la centrifugation à forte vitesse

« Culot » correspond aux culots obtenues après la centrifugation à 14000 tours/min de chaque échantillon

« Surnageant » correspond aux surnageants obtenus après la centrifugation de tous les échantillons à 14000 tours/min

Nous observons différents niveau d'activations suivant les substances. Ainsi l'isopropanol induit une réponse plus importante que la TPCK qui n'induit qu'une réponse partielle du système enzymatique de type phénoloxydase.

Ces réponses sont présentent au niveau des embryons axéniques et des hémocytes mais pas pour les échantillons de larves axéniques. Cependant en fonction du mode de préparation des échantillons il est possible d'induire ou non un effet activateur. Cependanti les alcools (méthanol et isopropanol) sont

fortement inducteur pour les échantillons d'embryons, quel que soit le traitement.

La seule substance possédant une activité stimulatrice nette pour les larves est le glucose.

4/ Recherche de l'effet dose de différentes substances sur le déclenchement du système activateur

Plusieurs substances activatrices ont été testées à différentes concentrations. Ces manipulations permettent de connaître la dose optimal induisant une activation du système enzymatique de type phénoloxydase.

Les substances testées sont :

- Le glucose
- La laminarine
- Le méthanol
- L'isopropanol

Un témoins CAC est aussi effectué en parallèle pour vérifier l'oxydation spontanée de la L-dopa sans activation du système enzymatique de type phénoloxydase.

Le tableau 4 résume les valeurs obtenues pour certaines de ces substances sur les échantillons d'embryons.

Temps	Témoin CAC	Méthanol		Isopropanol		Laminarine	
		pur	1/2	pur	1/2	10 mg/ml	100 ma/ml
0	0.248	0.311	0.270	0.467	0.247	0.268	0.274
2h30	0.247	0.413	0.292	0.730	0.254	0.299	0.350

Tableau 4 : Dose réponse de plusieurs substances activatrices sur le lot d'embryons 5

Les résultats montrent que les alcools activent mieux quand ils sont purs donc très concentrés. Le pouvoir activateur de la laminarine semble plus important quand celle-ci est concentrée.

Les tableaux 6 et 7 présentent l'effet stimulant du glucose en fonction de la dose sur des échantillons de larves axéniques et des hémocytes d'huîtres adultes.

Echantillon	Substance	Temps 0	Temps 3 heures
Surnageant d'hémolymphe B	Cac	0.034	0.070
	Glucose 100 mg/ml	0.080	0.118
Surnageant de larves 1	CAC	0.027	0.059
	Glucose 2 mg/ml	0.113	1.083
Culot d'hémolymphe B	Cac	0.033	0.066
	100 mg/ml	0.070	0.106
Culot de larves 1	Cac	0.044	0.064
	100 mg/ml	0.084	0.088

Tableau 5 : Effet du glucose à différentes doses sur l'hémolymphe B et les larves 1

Le glucose active le système enzymatique de type phénoloxydase pour des concentrations importantes.

5/ Evaluation de l'activité de type phénoloxydase en présence d'inhibiteurs Différents inhibiteurs ont été utilisés sur les échantillons.

- Le phénylthiourea (PTU) : inhibiteur de protéase
- La tropolone : inhibiteur endogène de la cascade des protéases de la phénoloxydase
- La benzamidine : inhibiteur de sérine protéase

	Culot embryons 5, dilution : 1/10			Surnageant embryons 5, dilution : 1/5			
Temps	Témoin CAC	Isopropanol	PTU + Isopropanol	Témoin CAC	Isopropanol	Tropolone + Isopropanol	Benzamidine + Isopropanol
0	0.091	0.252	0.207	0.248	0.467	0.514	0.636
1h30	0.104	0.407	0.244	0.245	0.667	0.696	0.813

Tableau 6 : Action de différents inhibiteurs sur le système de type phénoloxydase les embryons 5

Les résultats montrent que l'isopropanol augmente la DO, révélée par la transformation de la L-dopa. Mais la présence des inhibiteurs couplés à

l'activateur est associé également à une augmentation de DO. Cette augmentation est égale ou supérieure à celle observée en présence de l'activateur (isopropanol) seul.

II/ Recherche d'une l'activité de type phénoloxydase sur cellules cytocentrifugées

A/ Les hémocytes :

Des d'hémocytes cytocentrifugés traités à l'isopropanol et incubés en présence de L-dopa montrent une légère coloration brunâtre de certains granules, Mais ce marquage n'est retrouvé que sur un petit nombre de cellules. Elle est observée dans des cellules présentant des granulations irrégulières de grande taille.

Les échantillons traités en CAC ne présentent aucune pigmentation.

Des d'hémocytes cytocentrifugés ont été incubées en présence de DAB (Diaminobenzidine) et de peroxyde d'hydrogène. Les figures 3 et 4 présentent ces lames.

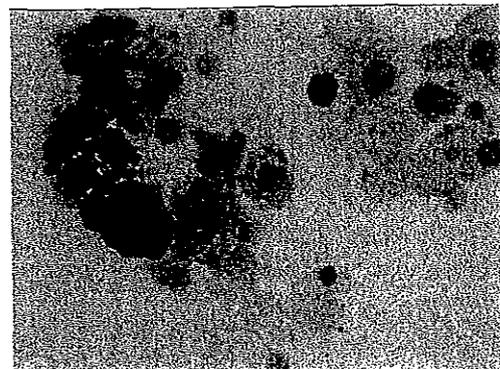
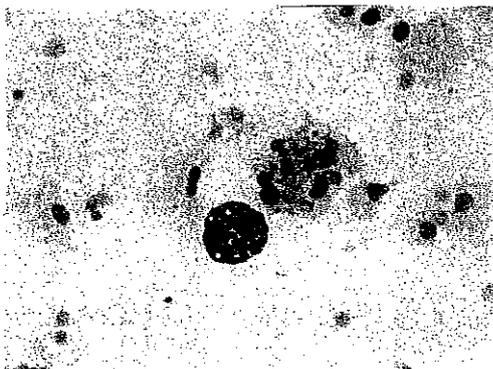


figure n°3 et 4 : Hémocytes cytocentrifugés et incubés 18H en présence de DAB et de peroxyde d'hydrogène (grossissement x120 et x200)

Les granulocytes présentent une coloration orangée. Cette coloration est visible dans tous les granulocytes.

B/ Les embryons :

Les cellules embryonnaires activées avec l'isopropanol, le méthanol et la TPCK ne présentent aucun marquage.

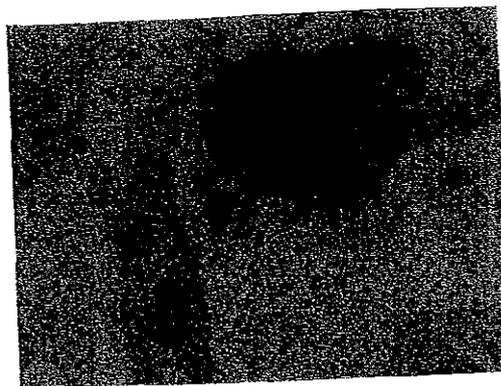
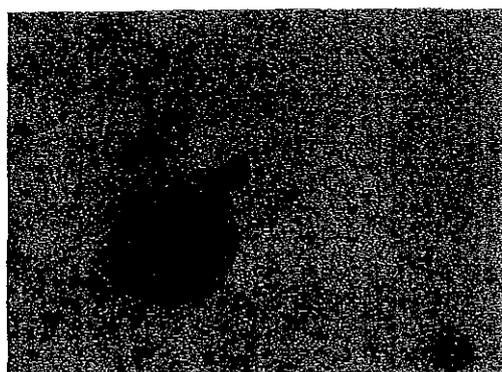


Figure n°3 et 4 : Embryons cyto-centrifugés, incubés 30 min en présence d'isopropanol puis 18H en L-Dopa, (grossissement x200).

III/ Détection de l'activité de type phénoloxydase en microscopie électronique à transmission

Des hémocytes et des embryons ont été analysés en présence de plusieurs types de substance. Ils ont été préparés soit :

- en CAC puis en L-Dopa,
- en méthanol puis en phénylthiourea,
- en méthanol et L-Dopa.

Nous disposons donc de témoins négatifs inhibés par la phénylthiourea, de témoins non induits en CAC et d'échantillons induits avec du méthanol.

A/ Les hémocytes :

Un marquage est observé dans certaines cellules et prend l'aspect de dépôts irréguliers denses aux électrons.

Ces dépôts sont observés dans des granules irréguliers de grandes tailles (figure 7).

Les hémocytes granuleux ne présentent pas de marquage particulier (figure 8).



Photo n°7 : Echantillons d'hémocytes traités en méthanol (40 min)
et en L-Dopa (18H).

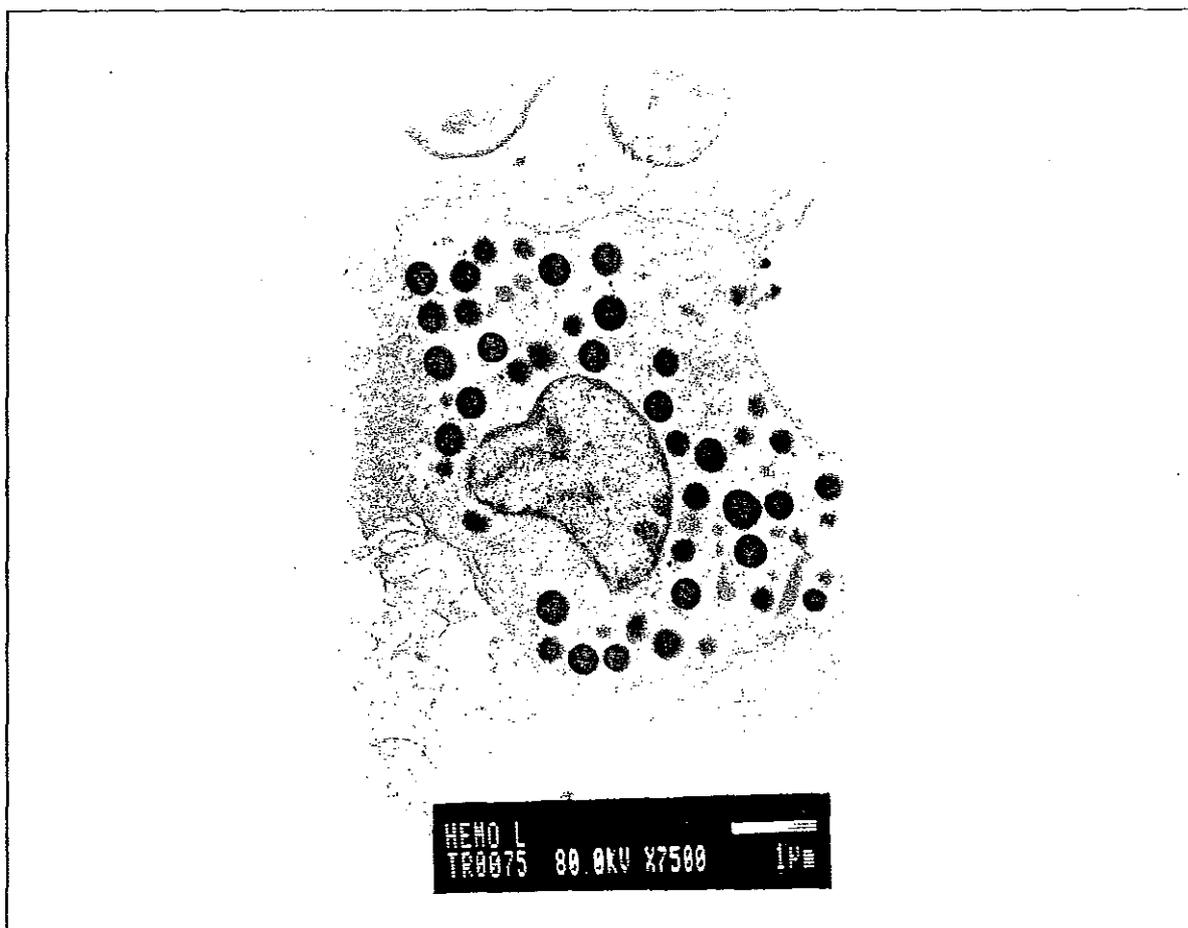


Figure n°8 : Echantillons traités en méthanol (40 min) et en phénylthiourea (18H) par microscopie électronique à transmission.

B/ Les embryons :

Les échantillons d'embryons incubés en présence de L-dopa, ne présentent aucun marquage.

Cependant, des dépôts denses aux électrons sont observables sur la face externe des embryons (figure 9).

Or, en présence de phénylthiourea, ce type de marquage n'est pas décelé (figure 10).

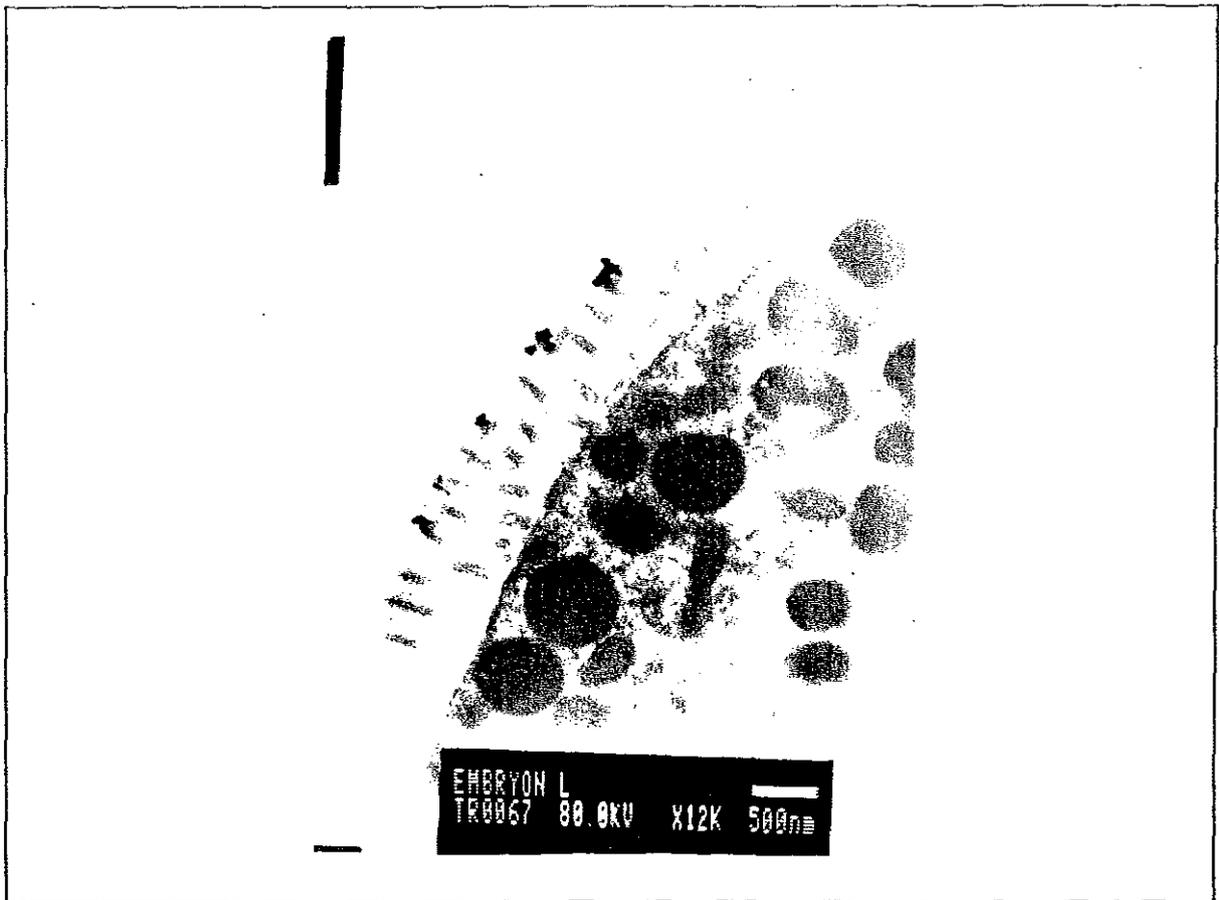


Figure n°10 : Echantillons non activés (CAC 40 min) mais incubés en L-Dopa (18H).

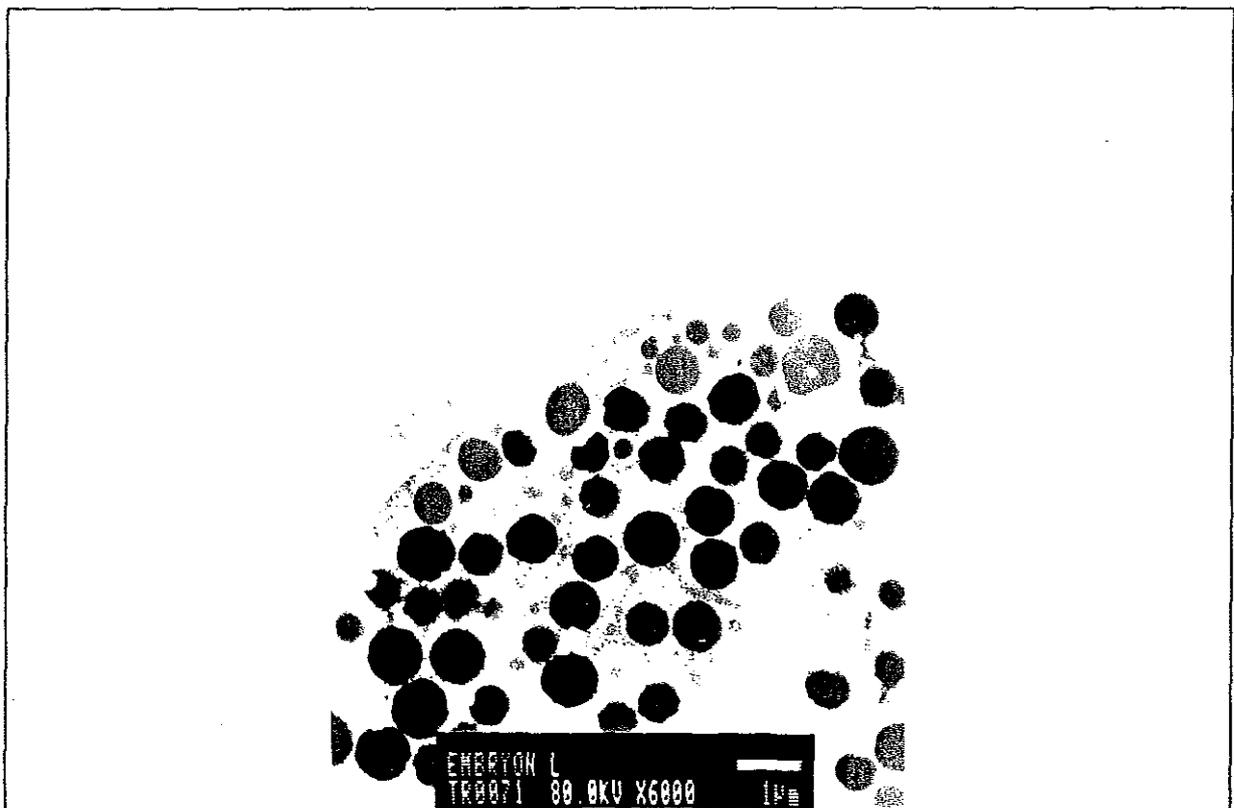


Figure n°9 : Echantillons traités en présence de phénylthiourea (18H).

DISCUSSION

Recherche de l'activité de type phénoloxydase par lecture en DO à 490 nm :

Une activité spontanée de type phénoloxydase est observée dans les échantillons de les larves axéniques et d'hémocytes. La DO à 490 nm, représentant la quantité de substrat utilisé, augmente au cours du temps (voir annexes 4-a et 4-b). On peut ainsi suspecter la présence d'une enzyme de type phénoloxydase dans les échantillons analysés. Nos résultats sont en accord avec les expérience de Soderhall et Smith qui mettent en évidence la présence d'une activation spontanée chez les crustacés (). Cependant pour les échantillons d'embryon, les valeurs de DO restent stables et égales au témoin négatif (absence de L-dopa) (voir annexe 4-c). Dans les broyât d'embryons cette activité enzymatique ne semble pas s'exprimer.

Les différents tests effectués avec des activateurs montrent qu'il est possible d'induire une activation du système. De plus, l'action du système de type phénoloxydase, dépend de la nature de l'échantillon et surtout de son traitement. L'activation de l'enzyme de type phénoloxydase a été réalisé par certaines protéases. Les travaux antérieurs utilisaient de la trypsine pour activer le système prophénoloxydase. Des expériences effectuées chez les arthropodes ont mis en évidence la faculté de la TPCK a induire une production d'activité maximale de type phénoloxydase en quelques minutes (). Ainsi nous avons montré que la TPCK, (fraction purifiée de la trypsine), active le surnageant des hémocytes, mais ne donne aucune réponse pour les autres traitements. De plus, elle active le pool B mais pas le pool C. Ce résultat peut s'expliquer par la différence entre les lots. Les adultes proviennent d'un milieu naturel ouvert (changement de températures, bactéries, virus). Ces facteurs peuvent donc avoir induit une réponse immunitaire chez les individus du pool B dont le système enzymatique de type phénoloxydase serait plus facilement activable que celui du pool C.

Les alcools ont été utilisés pour stimuler le système enzymatique comme cela a été réalisés auparavant par Preston (), Fisher () et Asadan (). Pour les embryons, dont l'activité spontanée n'avait pas était détecté lors des premiers tests, le méthanol et l'isopropanol semblent être les meilleures activateurs pour les embryons 3 et 5. Ces alcools possèdent un effet inducteur important, mais l'isopropanol induit une réponse supérieure à celle obtenue pour les témoins CAC dans toutes les manipulations, alors que le méthanol semble posséder un effet inducteur plus aléatoire. Il faut cependant noté que le méthanol a été défini comme un inhibiteur de l'activité phénoloxydase chez *M edulis* (). De même, la laminarine n'induit une réponse détectable que sur le surnageant des embryons 5.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Ratcliff et al. (), qui ont montré que l'activation du système endogène a été produite par la laminarine. Ces différences entre pools peuvent s'expliquer par la nature même des embryons axéniques. En effet, les embryons 3 ont donné des larves qui ont sédimenté précocement après 5 jours, alors que les embryons 5 ont donné des larves actives à J+9. Ainsi, on peut suspecter une différence au niveau basale du système de type phénoloxydase, dans chaque échantillon.

Il est important aussi de noter que toutes les valeurs de DO montrant une induction du système enzymatique, sont atteintes très rapidement entre 0 et 1 heure et ne varient plus ensuite. Donc des cinétiques sur des temps très rapprochés ne semblent pas nécessaire.

La recherche d'un effet dose dépendant de certaines substances activatrices (annexe 9 et 11) révèle que les activateurs stimulent, globalement, plus le système quand ils sont concentrés. Ainsi les alcools être purs et la laminarine à 100 mg/ml ont des effets stimulateur important. Il faut remarquer que les expériences ont été effectuées avec des alcools purs, alors que toutes les autres substances ont été utilisées à des concentrations de 1 mg/ml. Ainsi la mauvaise activation du système par certains activateurs peut être expliquée par leur trop faible concentration.

Le glucose ne répond pas à ce schéma car il active les échantillons à des concentrations spécifiques : 100 mg/ml pour le surnageant des hémocytes centrifugés ou non à grande vitesse et 2 mg/ml pour le culot des hémocytes remis en suspension après une centrifugation à 14000 tours/min, et le surnageant des larves axéniques donne une très bonne réponse à 2 mg/ml alors que le surnageant répond à une concentration de 100 mg/ml (annexe 9)

L'évaluation de l'activité de type phénoloxydase en présence d'inhibiteur révèle une faible inhibition par la phénylthiourea (PTU) (annexe 10). La PTU est un inhibiteur de la phénoloxydase, connu chez les insectes et chez les ascidies (), qui inhibe les protéases de la cascade enzymatique, donc il y a bien une activité type phénoloxydase en petite quantité chez les embryons.

La tropolone inhibe la phénoloxydase, mais n'a pas d'action sur le substrat de peroxydase, la benzamidine est un inhibiteur de sérine protéase. Le but de ces expériences était de vérifier si l'oxydation de la L-dopa n'était pas due à l'action d'une peroxydase. Les résultats semblent montrer qu'il y a effectivement une activité peroxydase dans ces échantillons. En effet, on obtient une réponse plus forte en présence des inhibiteurs que sans ceux-ci. On pose ainsi deux hypothèses :

-Un inhibiteur endogène de la cascade d'activation pourrait exister chez l'huître comme chez les insectes () et ainsi l'ajout de tropolone ou de benzamidine leverai cette inhibition, expliquant l'augmentation de DO.

-Une compétition entre la peroxydase et la phénoloxydase, en effet l'activité peroxydase détectée en présence de tropolone devrait être égale à celle détectée sans. Or, en présence de tropolone l'activité est plus forte (annexe 11). La phénoloxydase étant inhibée, la peroxydase serait activée.

On peut ainsi voir la nécessité de lever cette inhibition spontanée pour pouvoir activer le système type phénoloxydase.

L'expérience avec de la PTU a été réalisée sur une gamme de dilution des échantillons. On peut ainsi observer qu'une dilution au 1/10 donne une meilleure réponse qu'une dilution au 1/2, donc la phénoloxydase serait diluée mais la substance inhibitrice aussi ce qui provoquerait une réponse plus intense de cette enzyme.

Recherche d'une activité de type phénoloxydase sur cellules cytocentrifugées :

Les hémocytes incubés en présence d'isopropanol donne une réponse faible. Ainsi il semble que l'activité enzymatique de type phénoloxydase soit réduite dans ce type d'échantillon. Les résultats peuvent s'expliquer par le pourcentage de granulocytes dans l'hémolymphe qui dépend de la saison et du stade de maturation de l'huître. En effet la phénoloxydase se retrouve essentiellement dans les granulocytes.

Par ailleurs la possibilité de détecter une activité peroxydase dans les granulocytes, montre que le processus de préparation des échantillons est approprié pour rechercher des activité de type phénoloxydase.

Les embryons n'ont pas de marquage. On peut ici mettre en cause le méthanol qui est un bon activateur en lecture de DO mais il s'agit aussi d'un solvant qui lave les cellules. On peut donc imaginer que la phénoloxydase disparaît lors du lavage. Cependant les hémocytes incubés 18h en présence de diaminobenzidine et de peroxyde d'hydrogène (DAB) présentent une coloration orangée située à l'intérieur des granulocytes. Le DAB étant un activateur de la peroxydase, on peut conclure à une activité assez intense de cette enzyme chez les hémocytes d'huître creuse

Des tests supplémentaires pour rechercher une activité peroxydase (DAB) sur dans les cellules embryonnaire, et une induction avec d'autres substances (TPCK et urée) pour les hémocytes aurait été de bons compléments d'information, pour confirmer ou infirmer les résultats observés en densité optique.

Détection de l'activité de type phénoloxydase en microscopie électronique à transmission :

Dans les hémocytes d'huître adulte, la présence de dépôts denses aux électrons est observé. Pour les échantillons traités avec un activateur (le méthanol) et le substrat de la phénoloxydase (la L-dopa), on peut supposer que ces dépôts correspondent à l'accumulation de produits de dégradation de la L-dopa. Mais ces dépôts sont situés dans les granules de cellules à granulation de grandes tailles irrégulières. Ces cellules hétérogènes peuvent être rapprochées des cellules pigmentaires cardiaques ou cellule « brunes ». Les cellules « brunes » sont observés dans les tissus conjonctifs des oreillettes cardiaques. Elles semblent intervenir dans la phagocytose et la dégradation post phagocytaire.

Dans les embryons la présence de dépôts dense aux électrons est retrouvée à la périphérie de l'enveloppe externe. Ces dépôts sont retrouvée sur les échantillons traités avec de la L-dopa mais pas sur les témoins négatifs. On peut donc interpréter ce dépôts comme une accumulation de produit de dégradation de la L-dopa.

On peut supposer que la présence de cette enzyme à un stade si précoce du développement, permettrait à l'embryons de survivre dans le milieu extérieur. Ces activité enzymatiques disparaissent chez les larves. On peut donc supposer que ce système n'est pas produit directement par l'embryon, mais correspondrais à des produits d'origine maternelle consommés lors du développement embryonnaire.

CONCLUSION

L'immunité des invertébrés marins restant chez les mollusques bivalves marins, comporte un grand nombre de zones inexplorées. La recherche de l'existence d'un système de type phénoloxydase chez les huîtres *Crassostrea gigas* a été abordé au cours du stage.

En basant nos recherches sur ce système nous avons rencontré certaines difficultés : réalisation de ponte dans des conditions axéniques, quantité de matériel faible, et réponse à l'activation du système réduite.

Cependant il a été possible de détecter une activité de type phénoloxydase à différents stade de développement de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : hémocytes d'adultes, larves et embryons axéniques.

Cette mise en évidence fut possible grâce à la mise au point d'une technique rapide de recherche de l'activité enzymatique de type phénoloxydase, en microplaque et une lecture sur lecteur ELISA.

Cette technique a permis de mettre la fonction activatrice ou inhibitrice de certaines substances, ceci démontrant une modulation du système. Cette possible inhibition du système nous ait donné par les tests effectués sur les dilutions d'échantillons ce qui provoque une augmentation de la réponse et par l'activation du système par des substances inhibitrices. Il est donc possible d'envisager l'existence d'un système de régulation endogène du système enzymatique de type phénoloxydase détectée.

Les débris de la dégradation du substrat de la L-dopa présent à la surface externe des embryons et l'activation marquée en lecture de DO (pour de nombreuses substances), démontrent un système enzymatique actif

Cependant l'absence de ces débris au niveau larvaire pose l'hypothèse d'une possible transmission maternelle. Quant aux adultes ces dépôts se retrouvent sur des cellules particulières et pigmentées. Ainsi, la recherche de l'activité de type phénoloxydase dans des broyât de cellules « brunes » cardiaques est à envisager.

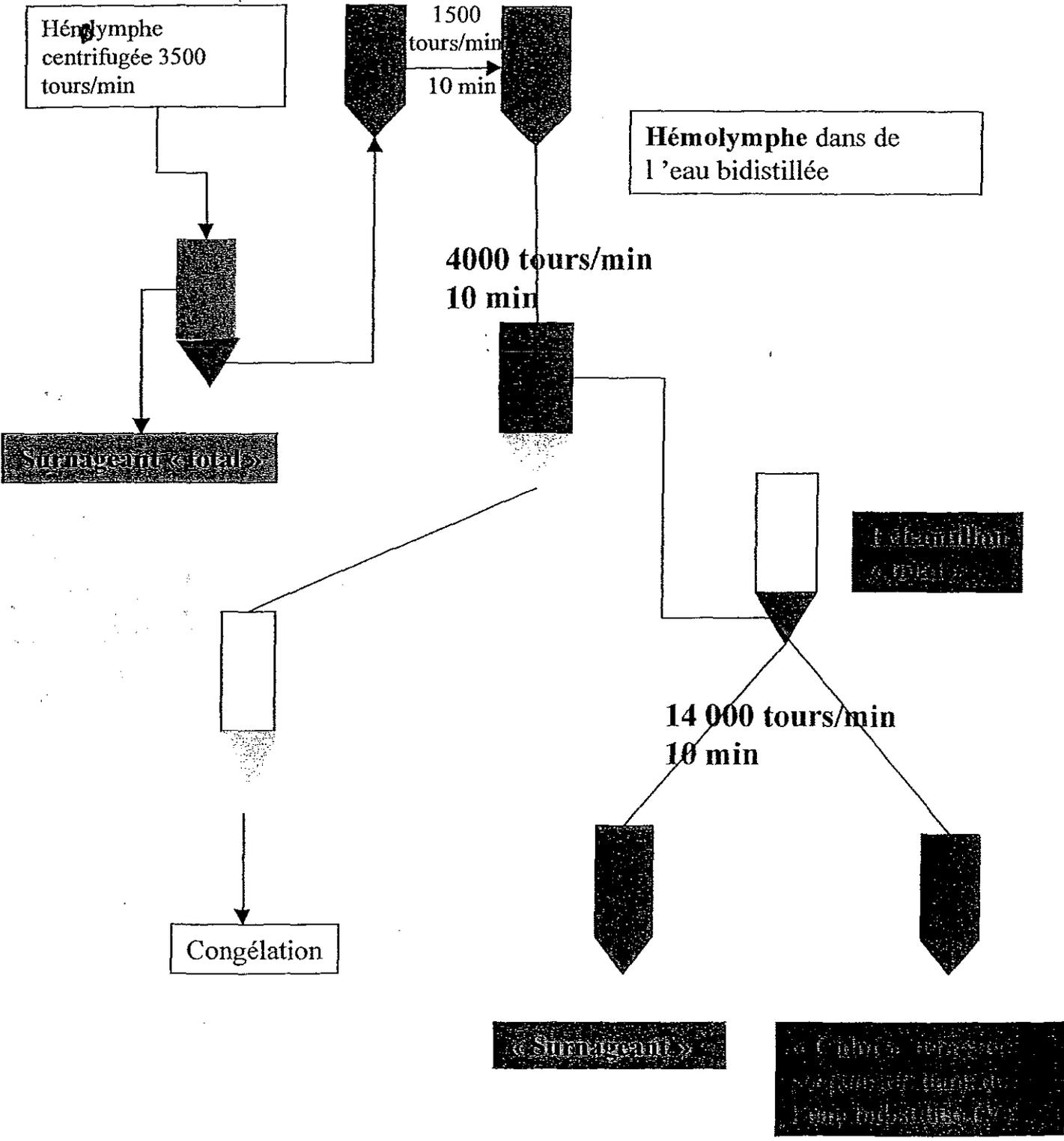
BIBLIOGRAPHIE

- (1) RENAULT T., Le DEUFF R., COCHENNEC N. and MAFFART P. (1994). Herpesvirus associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France. Comparative study. *Revue Med. Vet.*
- (2) HASKIN H. and Ford S.E. (1979). Development of resistance to *Murchinia nelsoni* mortality in laboratory-reared and native oyster stocks in Delaware Bay. *Marine Fish. Rev* 41 :54-63
- (3) CHENG T.C. (1996). Hemocytes : forms and functions. In *Biology, Culture and Management of the Eastern oyster*. Univ ; Maryland press, College Park

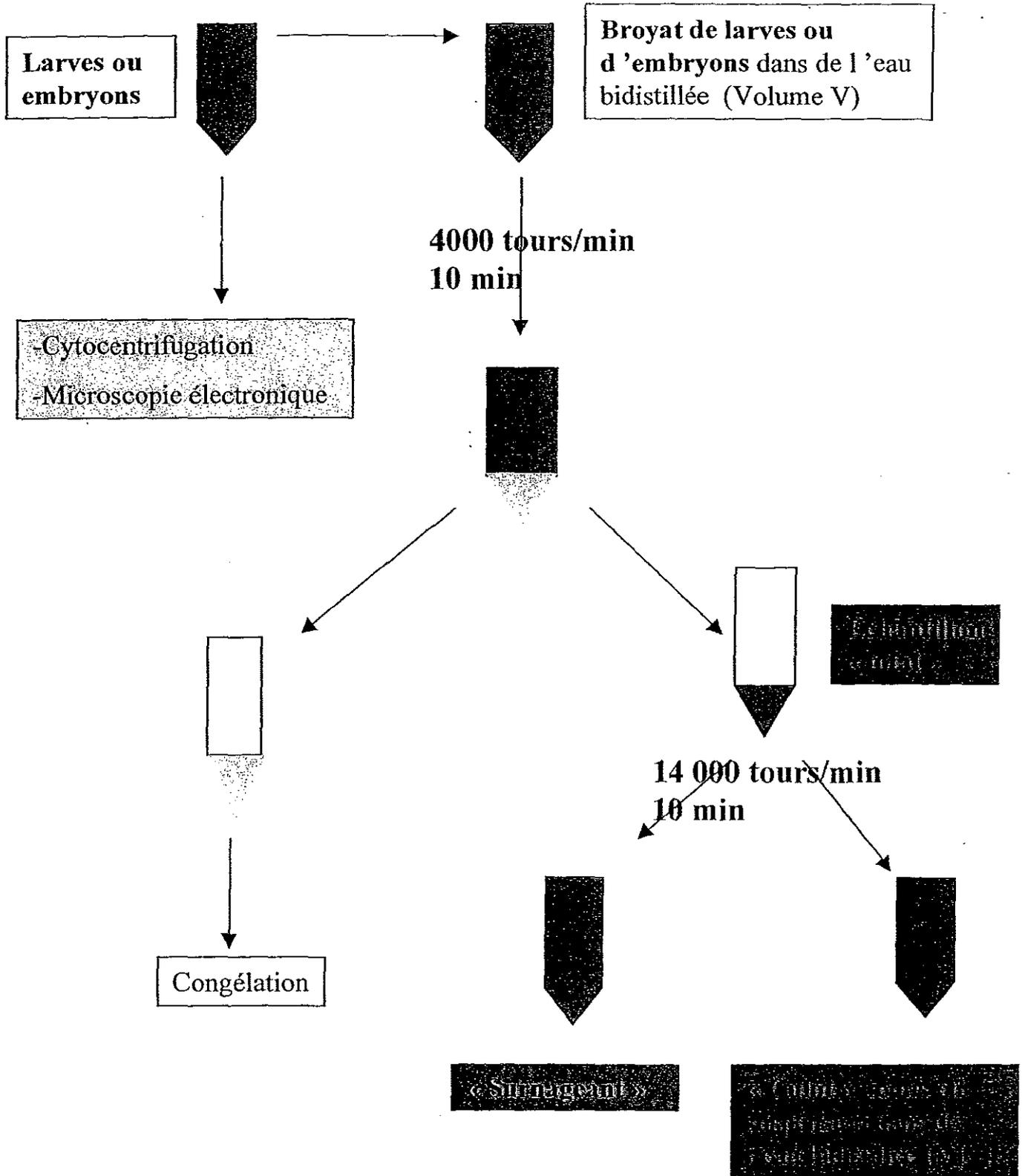
FISHER W.S. (1986): Structure and functions of oyster hemocytes. In *immunity in Invertebrates* (M. Brehélin, ed.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- (4) SODERHALL K., CERENIUS L. (1998): Role of the prophenoloxdase, activating system in invertebrate immunity current. *Opinion in immunology*. 10 :23-28
- (5) RODRIGUEZ LEON J., (1994): Contribution à l'étude du système immunitaire de la crevette péneide *Penaeus japonicus*. Thèse univ. D'Auvergne, univ Blaise Pascal.
- (6) ASOKAN R., ARUMUGAM M., MULLAINAHAN P. (1997): Activation of the prophenoloxdase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Dev Comp Immunol* :21 (1), 1-2
- (7) CHERQUI A. (1994): Etude de la prophénoloxdase de *Locusta migratoria*: purification, caractéristique et contrôle de sa transformation en phénoloxdase. Thèse univ Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc.
- (8) JACKSON D. ,SMITH V.J., PEDDIE C.M. (1993): In vitro phenoloxdase activity in the blood of *Ciona intestinalis* and other ascidians ; 17(2) :97-108.
- (9) PRESTON J.W. and TAYLOR R.L. (1970): Observation on the PO system in the hemolymph of the cockroach *leucophaea maderae*. *Journal of insect physiologie* :16, 1729-1744

- (10) FISHER C.W. and BRADY U.E. (1983) :Activation properties and collection of haemolymph of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75 C, 111-114
- (11) ASADA N. , FUKUMITSU T. , FUJIMOTO K. et MASUDA K. (1993) : Activation of proPO with 2-propanol and other organic compounds in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23 :515-519.
- (12) COLES J.A. and PIPE R.K. (1994) :Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis* *Fish & Shellfish Immunology*, 4 : 337-352.
- (13) RATTCLIFF NA., LEONARD C. and ROWLEY A.F. (1984) : ProPO activation : nonself recognition and cell cooperation in insect immunity. *Science*, 226 :557-559.

Annexe n°3-b: Traitement des hémocytes



Annexe n°3-a: Traitement des larves et des embryons



Essai 2 , 50µl de CAC au total

Echantillon	Hémolymphe C (dilution 1/3)		Larves axéniques 1 (pure)		Oxydation spontanée de la L-Dopa
	TEMPS (min)	CAC	TPCK	CAC	
0	0,004	0,015	0,006	0,039	0,009
20	0,006	0,019	0,006	0,037	0,009
40	0,019	0,033	0,009	0,035	0,021
60	0,032	0,054	0,014	0,041	0,032
70	0,035	0,06	0,016	0,043	0,035
80	0,04	0,069	0,018	0,045	0,04
90	0,048	0,077	0,02	0,047	0,046
100	0,06	0,091	0,025	0,053	0,05
110	0,07	0,102	0,031	0,063	0,052
120	0,079	0,114	0,037	0,073	0,055
130	0,08	0,111	0,034	0,058	0,08
140	0,08	0,111	0,034	0,058	0,08
150					
160					
170	0,118	0,156	0,053	0,08	0,083
180					
190					
200					
210	0,132	0,164	0,064	0,082	0,112
48H 4°C	0,246	0,29	0,119	0,135	0,141

HEMOLYMPHE:

6 µl Echantillon
 14 µl eau bidistillée
 20 µl TPCK
 attente 40 min
 20 µl L-Dopa
 60 µl CAC

Larves axéniques

20 µl échantillon
 20 µl TPCK
 attente 40 min
 20 µl L-Dopa
 60 µl CAC

ESSAI 4 (Surnageant), PLAQUE 1: 60 µl de CAC au total

Trypsine (DO 490nm)

Echantillon	C	CS	3	5	5i	3e	5e
Temps (min)							
0	0,283	0,048	0,007	0,008	0,006	0,093	0,101
20	0,328	0,024	0,012	0,012	0,014	0,088	0,105
40	0,364	0,056	0,011	0,014	0,013	0,082	0,102
60	0,432	0,029	0,016	0,026	0,021	0,081	0,12
70	0,448	0,038	0,013	0,018	0,012	0,081	0,133

TPCK

Echantillon	C	CS	3	5	5i	3e	5e
TEMPS (min)							
0	0,418	0,038	0,022	0,012	0,01	0,089	0,085
20	0,484	0,02	0,03	0,015	0,019	0,088	0,086
40	0,525	0,044	0,026	0,018	0,018	0,076	0,085
60	0,581	0,025	0,032	0,029	0,025	0,072	0,087
70	0,612	0,032	0,024	0,021	0,014	0,073	0,098

CAC

Echantillon	C	CS	3	5	5i	3e	5e
Temps (min)							
0	0,402	0,03	0,009	0,042	0,014	0,103	0,135
20	0,427	0,027	0,014	0,046	0,025	0,1	0,131
40	0,449	0,041	0,015	0,049	0,025	0,099	0,135
60	0,474	0,032	0,021	0,068	0,034	0,104	0,133
70	0,485	0,037	0,018	0,053	0,022	0,107	0,146

Laminarine

Echantillon	C	CS	3	5	5i	3e	5e
Temps (min)							
0	0,208	0,017	0,017	0,018	0,01	0,1	0,122
20	0,24	0,014	0,019	0,021	0,017	0,097	0,122
40	0,259	0,022	0,019	0,024	0,018	0,097	0,122
60	0,299	0,017	0,022	0,032	0,024	0,102	0,126
70	0,309	0,018	0,019	0,027	0,015	0,102	0,133

LPS

Echantillon	C	CS	3	5	5i	3e	5e
Temps (min)							
0	0,309	0,055	0,045	0,058	0,032	0,106	0,122
20	0,336	0,041	0,052	0,062	0,047	0,104	0,14
40	0,349	0,063	0,049	0,063	0,045	0,102	0,145
60	0,388	0,047	0,054	0,081	0,055	0,108	0,143
70	0,399	0,054	0,047	0,067	0,038	0,109	0,155

Glucose

Echantillon	C	CS	3	5	5i	3e	5e
Temps (min)							
0	0,172	0,047	0,05	0,043	0,055	0,117	0,133
20	0,192	0,046	0,059	0,048	0,065	0,117	0,134
40	0,205	0,056	0,055	0,052	0,047	0,118	0,151
60	0,232	0,049	0,062	0,072	0,048	0,119	0,154
70	0,242	0,053	0,054	0,059	0,025	0,118	0,161

méthanol

Echantillon	C	CS	3	5	5i	3e	5e
Temps (min)							
0	0,342	0,052	0,038	0,031	0,021	0,113	0,154
20	0,36	0,036	0,044	0,035	0,039	0,117	0,163
40	0,369	0,061	0,042	0,039	0,04	0,111	0,134
60	0,37	0,043	0,049	0,055	0,053	0,111	0,158
70	0,376	0,05	0,042	0,044	0,034	0,109	0,175

Isopropanol

Echantillon	C	CS	3	5	5i	3e	5e
Temps (min)							
0	0,159	0,066	0,052	0,028	0,062	0,107	0,124
20	0,165	0,037	0,064	0,033	0,026	0,132	0,136
40	0,176	0,071	0,058	0,039	0	0,112	0,134
60	0,187	0,042	0,068	0,056	0,004	0,111	0,127
70	0,191	0,053	0,055	0,047	0	0,1	0,153

NNEXE N° 10-a

PTU sur embryons 5

CAC (DO 490nm)

Echantillon	5 avt centri		5 ap centri		auto oxydation L-DOPA
	1/2	1/10	1/2 pure		
0	0,091	0,091	0,768	0,821	0,054
30 min	0,092	0,092	0,766	0,787	0,049
1h	0,092	0,081	0,789	0,772	0,057
1h30	0,086	0,104	0,753	0,761	0,039
2h	0,082		0,766		0,055
2h30	0,096		0,736		0,058
3h					
3h30	0,083		0,762		0,072
4h	0,096		0,753		0,087
4h30					
5h					
1 nuit (4°C)	0,091		0,726		

ISOPROPANOL

Echantillon	culot		surnageant	
	1/2	1/10	1/2 pure	
0	0,115	0,252	0,747	0,928
30 min	0,115	0,281	0,784	0,936
1h	0,114	0,362	0,749	0,989
1h30	0,096	0,407	0,831	1,055
2h	0,087		0,877	
2h30	0,121		0,737	
3h				
3h30	0,127		0,956	
4h	0,115		0,73	
1 nuit (4°C)	0,121		0,83	

PTU + ISOPROPANOL

Echantillon	5 avt centri		5 ap centri	
	1/2	1/10	1/2 pure	
0	0,162	0,207	1,06	0,982
30 min	0,168	0,226	1,206	0,982
1h	0,163	0,212	1,031	1,017
1h30	0,156	0,244	1,048	1,059
2h	0,148		1,095	
2h30	0,169		0,925	
3h				
3h30	0,152		1,067	
4h	0,164		0,738	
4h30				
5h				
1 nuit (4°C)	0,17		1,016	

ANNEXE N° 10-b-2

METHANOL

Echantillon	3 avt centri culot				3 surnageant
	pure	1/2	1/10	1/10	pure
Temps (heures)					
0	1,28		0,109	0,116	0,614
30 min	1,245		0,119	0,098	0,66
1h				0,091	0,669
1h30	1,221		0,109	0,107	0,672
2h					
2h30					
3h					
3h30					
4h					
4h30					
5h					
1 nuit (4°C)	1,23		0,12		

PTU + METHANOL

Echantillon	3 avt centri culot				3 surnageant
	pure	1/2	1/10	1/10	pure
Temps (heures)					
0	1,068	0,856	0,123	0,061	0,648
30 min	1,165	0,869	0,142	0,054	0,705
1h				0,048	0,72
1h30	1,17	0,874	0,13	0,052	0,721
2h					
2h30					
3h					
3h30					
4h					
4h30					
5h					
1 nuit (4°C)	1,163	0,894	0,172		

20 µl échantillons 20 µl inhibiteur 10 min 20 µl activateur 45 min 20 µl L-DOPA 60 µl CAC	20 µl échantillons 20 µl activateur 45 min 20 µl L-DOPA 60 µl CAC
---	---