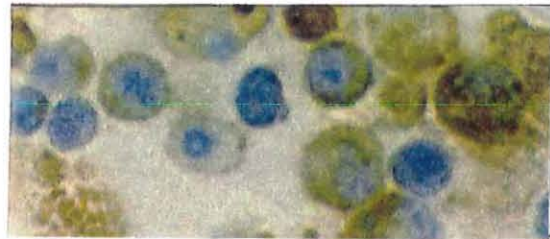
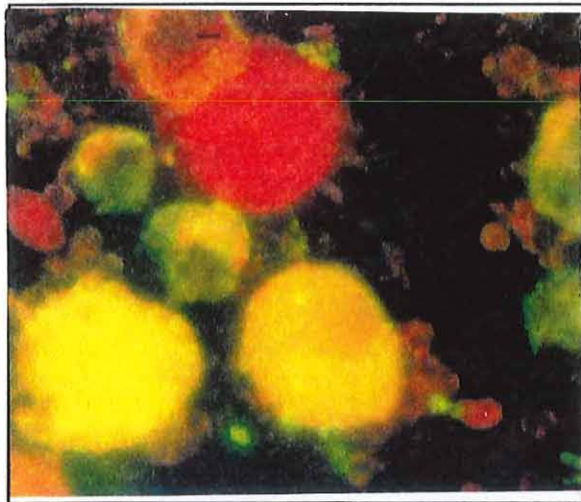


ESPIAU Benoît
Formation POST-BTS
Lycée technique St Louis
33028 BORDEAUX

Année 1998-1999

**CARACTERISATION
DES POPULATIONS HEMOCYTAIRES
DE L'HUÎTRE PLATE *Ostrea edulis*
A L'AIDE DE LECTINES**

70915
E700.ESP
C



IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 01543

**Travail réalisé sous la direction de N. COCHENNEC
IFREMER
Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Phatologie
B. P. 133. 17390 LA TREMBLADE**

REMERCIEMENTS

Je remercie Messieurs J.P. Flassch et A. Gérard pour avoir bien voulu m'accueillir au sein de la Station IFREMER de La Tremblade.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Nathalie Cochenec pour m'avoir permis d'acquérir de nouvelles connaissances théorique et pratique, pour m'avoir encadré pendant ce stage et pour m'avoir aidé à la rédaction de ce rapport.

Enfin, je remercie tout le personnel de la station pour leur aide sur le plan technique.

SOMMAIRE

RAPPELS

1. L'OSTREICULTURE FRANCAISE p. 1
2. GENERALITES SUR LES MALADIES DES ORGANISMES MARINS
3. LA BONAMIOSE
4. MECANISMES DE DEFENSE OBSERVES CHEZ LES MOLLUSQUES p. 2

INTRODUCTION

p. 3

MATERIEL ET METHODES

1. ORIGINE DES HUÎTRES p. 5
2. DETERMINATION DU NIVEAU D'INFECTION DES HUÎTRES PAR *Bonamia ostreae*
3. PURIFICATION DE *Bonamia ostreae*
4. PONCTION DE L'HEMOLYMPHE p. 6
5. PREPARATION DE COUPES HISTOLOGIQUES p. 7
 - 5.1. Coupes paraffines
 - 5.1.1. Fixation et déshydratation des tissus
 - 5.1.2. Inclusion des tissus dans un bloc de paraffine
 - 5.1.3. Réalisation des coupes paraffines
 - 5.2. Cryocoupes p. 8
6. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION
 - 6.1. Principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission
 - 6.2. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission
 - 6.2.1. Fixation des cellules p. 9
 - 6.2.2. Déshydratation des cellules
 - 6.2.3. Imprégnation et inclusion des cellules
 - 6.2.4. Coupe des bloc de résine p.10
 - 6.2.5. Contraste des coupes à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb
7. MARQUAGE PAR DES LECTINES
 - 7.1. Présentation des lectines
 - 7.1.1. Rôle des lectines
 - 7.1.2. Détermination du(es) ose(s) présents à la surface membranaire des cellules p.11

7.2. Lectines disponibles au laboratoire	
7.3. Utilisation des lectines couplées à la FITC	p.12
7.3.1. Marquage des hémocytes vivants et en sus pension	
7.3.2. Marquage d'hémocytes cyto centrifugés	
7.3.3. Marquage de tissus	
7.4. Utilisation de lectines couplées à la peroxydase	p.13
7.4.1. Marquage d'hémocytes cyto centrifugés	
8. TECHNIQUE D'IMMUNOPEROXYDASE INDIRECTE	p.14
8.1. Principe	
8.2. Immunoperoxydase indirecte sur des hémocytes cyto centrifugés	
8.3. Immunoperoxydase indirecte sur coupes histologiques	p.15
9. PREPARATION DES HEMOCYTES POUR L'ETUDE DE POPULATIONS HEMOCYTAIRE	

RESUTATS-DISCUSSION

1. OPTIMISATION DES MARQUAGES DES HEMOCYTES	p.17
1.1. Choix des solutions à utiliser pour effectuer les expériences sur les hémocytes	
1.1.1. Solutions à tester pour réaliser le prélèvement des hémocytes	
1.1.2. Solution à tester pour effectuer les lavages des hémocytes	
2. MARQUAGE DES HEMOCYTES CIRCULANTS	p.19
2.1. Lectines couplées à un fluorochrome	
2.1.1. Profil de marquage obtenu	p.21
2.2. Lectines couplées à la peroxydase	p.24
2.2.1. Profil des marquages obtenus	
2.3. Marquage du parasite <i>Bonamia ostreae</i> par les lectines couplées à la FIT	p.26
3. MARQUAGE DES HEMOCYTES AU SEIN DES TISSUS	p.29
3.1. Localisation à l'aide de lectines couplées à la FITC	
3.2. Localisation à l'aide de lectines couplées à la peroxydase	p.32
3.3. Immunoperoxydase indirecte sur coupes paraffines à l'aide d'un anticorps anti-granulocytes	
4. COMPARAISON DE POPULATIONS HEMOCYTAIRES D'HUÎTRES INFECTÉES ET NON-INFECTÉES	p.33
4.1. Comparaison de la répartition hémocytaire dans chaque population	
4.2. Type cellulaire parasité	p.34
4.3. Etude des populations hémocytaires marquées par la Concanavaline A et par Wheat germ	p.35
5. ETUDE DE LA CONSERVATION DE L'ULTRASTRUCTURE DES HEMOCYTES APRES LA PREPARATION POUR LES MARQUAGES	p.36

CONCLUSION

p.37

ANNEXES

**ANNEXE 1 : COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISEES POUR LA
PONCTION DE L'HEMOLYMPHE**

ANNEXE 2 : COMPOSITION DES FIXATEURS

**ANNEXE 3 : COMPOSITION DE LA SOLUTION DE DIAMINO-
BENZIDINE**

**ANNEXE 4 : COMPOSITION DES SOLUTIONS NECESSAIRES A LA
PREPARATION DE TISSUS POUR L'OBSERVATION AU MICROSCOPE
ELECTRONIQUE A TRANSMISSION**

ANNEXE 5 : TABLEAU DE RESULTATS DES COMPTAGES

RAPPELS

1. L'OSTREICULTURE FRANCAISE

L'ostréiculture s'est réellement développée au milieu du 19^e siècle après que des essais de captage de l'huître plate *Ostrea edulis* appelée communément Belon, soient effectués par Coste.

Contrairement à l'huître japonaise *Crassostrea gigas* qui constitue l'essentiel de la production française avec 150000 tonnes par an, la production annuelle d'*Ostrea edulis* a diminué considérablement entre les années 1970 et 1999, passant de 20000 à 1500 tonnes. Cette diminution est essentiellement due à l'apparition de deux maladies spécifiques de cette espèce : La marteillose et la bonamiose.

2. GENERALITES SUR LES MALADIES DES MOLLUSQUES BIVALVES MARINS

La conchyliculture, comme les autres productions animales est frappée par diverses maladies dont certaines sont limitatives de la quantité et/ou de la qualité de la production.

La santé des animaux est mise à mal par des bioagresseurs (parasites, champignons, virus ou bactéries) dont l'action néfaste peut-être spontanée ou induite par des pratiques zootechniques particulières. Les concentrations animales exacerbent les effets de nombreux agents pathogènes.

Peu de possibilités existent pour protéger les invertébrés marins vis-à-vis des maladies infectieuses. En effet, les traitements, pour des espèces élevées en général en milieu ouvert posent des problèmes de quantité de substances à utiliser, des fortes probabilités de recontamination et de l'accumulation des résidus dans le milieu. Ainsi, ce type d'approche pour contrôler les maladies infectieuses n'est pas une voie à privilégier.

De plus, les invertébrés ne peuvent être vaccinés car ils ne possèdent pas de réponse immunitaire spécifique. En effet, ces animaux sont caractérisés par l'absence de lymphocytes B et de lymphocytes T qui, chez les vertébrés, sont des cellules impliquées dans les réponses immunes spécifiques et qui peuvent être stimulées par la vaccination.

Donc, pour protéger les invertébrés marins d'intérêt économique des maladies infectieuses, des méthodes de diagnostics rapides, sensibles et fiables doivent être mises au point, ainsi que l'obtention de populations d'animaux résistants aux principales maladies.

3. LA BONAMIOSE

La bonamiose, maladie due au protozoaire *Bonamia ostreae* à été mise en évidence pour la première fois en 1979 lors d'épisodes de mortalités survenues à l'île Tudy en Bretagne. Depuis, cette maladie s'est propagée à tous les centres ostréicoles français, puis européens. Elle a aussi été décrite en Nouvelle-Zélande et aux Etats-Unis.

L'impact économique de la bonamiose sur la production ostréicole française a conduit l'IFREMER à développer un programme pluridisciplinaire pour l'étude de ce parasite.

Le parasite a une localisation intrahémocytaire, par suite, la maladie constitue un modèle d'étude de parasitisme intracellulaire intéressant dans la mesure où les hémocytes

INTRODUCTION

jouent un double rôle. En effet, ils sont à la fois des cellules hôtes d'un point de vue parasitologique, et les cellules effectrices des mécanismes de défenses à médiation cellulaire.

4. MECANISMES DE DEFENSE OBSERVES CHEZ LES MOLLUSQUES

Le mécanisme de défense des mollusques diffère de celui des vertébrés dans le fait qu'il ne possède pas de réponses immunitaires faisant intervenir des cellules spécialisées telles que les lymphocytes B ou T. Il en résulte donc l'impossibilité de mettre en évidence une réponse basée sur la spécificité et la mémoire chez les mollusques bivalves marins.

Les mécanismes de défense observés chez ces invertébrés semblent immédiats et non inductibles. De plus, ils sont en partie à médiation cellulaire et reposent sur l'activité des hémocytes.

"L'immunité cellulaire" des mollusques est assurée par les hémocytes, cellules véhiculées par l'hémolymphe dans un système circulatoire semi-ouvert qui les met en contact avec tous les tissus conjonctifs, et en particulier avec celui de la masse digestive et celui des filaments branchiaux, au niveau de vastes sinus.

Pour classer les types hémocytaires, les critères utilisés ont été des critères morphologiques, des critères cytochimiques, fonctionnels et antigéniques. Cependant, l'absence de critères d'identification bien établis amène une multiplicité de dénomination et de description des hémocytes. En dépit de cela, les auteurs s'accordent pour reconnaître le schéma général proposé par Cheng (1981) pour la classification des hémocytes des mollusques bivalves marins et qui distingue deux grandes catégories : Les cellules granuleuses (granulocytes) et les cellules agranuleuses (agranulocytes).

D'autres critères d'identification, comme le contenu enzymatique lysosomal des hémocytes ont été pris en compte pour caractériser les types hémocytaires chez *Ostrea edulis* (Auffret, 1985 ; Hine et Wesnay, 1994).

Enfin, les fonctions des hémocytes sont variées. Ils jouent un rôle dans le transport du calcium et des protéines nécessaires à la réparation de la coquille, dans la cicatrisation des blessures ainsi que dans le transport et la digestion des substances nutritives et des excréments. Mais, le rôle le plus important est celui joué dans la défense interne. Cette dernière semble essentiellement assurée par la phagocytose des particules étrangères ou l'encapsulation dans le cas où la taille des particules serait trop importante pour que puisse avoir lieu la phagocytose.

Le type hémocyttaire impliqué dans la phagocytose est cependant contesté par les différents auteurs qui ne sont pas unanimes. En ce qui concerne *Ostrea edulis*, Brereton et Alderman (1979) considèrent que les cellules hyalines à activité phagocytaire observées sont peut-être des granulocytes ayant perdu leurs granules du fait de leur activité métaboliques.

Néanmoins, en réponse à diverses agressions du milieu naturel, la réaction hémocyttaire, souvent inconstante, d'intensité et d'évolution variable fait toujours intervenir les granulocytes. Ces cellules sont capables en effet de phagocytose, de réactions d'englobement ou d'encapsulation et prennent toujours part au processus de cicatrisation.

L'IFREMER a initié depuis 1988, un programme de sélection de l'huître plate vis-à-vis du parasite *Bonamia ostreae*. Ce programme de sélection repose sur la reproduction expérimentale de la bonamiose au laboratoire, ceci étant possible grâce à un protocole établi de purification du parasite.

Ainsi, il a été possible de soumettre des géniteurs à une pression de sélection aboutissant à l'obtention de populations résistantes.

Cependant, la sélection des animaux résistants se fait sans connaissance des processus impliqués dans ce phénomène. Ainsi, l'intérêt d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués est renforcé, plus particulièrement en comparant au niveau cellulaire des animaux sains, sensibles et résistants.

Des travaux de ce type permettraient : de comprendre ces phénomènes d'un point de vue fondamental, de définir un ou des marqueurs de résistance, ce qui apporterait une aide au programme de sélection, et de définir des mécanismes ou des molécules associés à la résistance pour obtenir des animaux présentant des capacités accrues de résistance.

De nombreux travaux ont été réalisés pour tenter d'établir une classification des différents types cellulaires observés dans l'hémolymphe des mollusques. Plusieurs caractères ont été utilisés pour classer les hémocytes : la taille, la forme, le rapport nucléocytoplasmique, les affinités tinctoriales et la présence d'organites observés en microscopie électronique à transmission. Cependant, la classification des hémocytes est confuse, bien que différents auteurs soient d'accord pour distinguer deux types cellulaires : les granulocytes et les agranulocytes. Toutefois, le nombre de sous-populations cellulaires au sein de ces types est variable selon les auteurs. Ainsi, les caractères morphologiques des cellules à eux seuls ne semblent pas suffisants pour établir un modèle de classification des hémocytes chez les mollusques.

Certains auteurs ont recherché des marqueurs spécifiques des différents types hémocytaires. Par exemple, Yoshino *et al.* (1979) et Cheng et Downs (1988) ont rapporté que l'utilisation de lectines marquées montrait l'existence de sous-populations cellulaires chez l'huître américaine, *Crassostrea gigas*. Cheng *et al.* (1980), obtinrent des résultats similaires chez l'huître *Crassostrea virginica*.

Chez *Ostrea edulis*, les hémocytes sont actuellement classés en granulocytes, agranulocytes et petits hyalinocytes (Cochennec, 1997).

Or, chez cette huître, comme chez *Crassostrea gigas* et chez *Crassostrea virginica*, il est possible que l'utilisation de lectines, marqueurs hétérologues, permette de différencier des sous-populations hémocytaires sur un critère autre que morphologique.

En effet, les lectines sont des glycoprotéines qui reconnaissent des oses ou polysides présents à la surface membranaire des cellules et/ou à l'intérieur des cellules. Ainsi, la différenciation des cellules peut-être basée sur la composition en oses ou polysides de leur membrane plasmique.

De plus, d'après certains auteurs, les lectines pourraient jouer un rôle dans la défense immunitaire de certains organismes. En effet, elles ont été décrites comme pouvant expliquer des phénomènes d'agglutination.

Lors de ce stage, mon sujet, qui s'intègre dans le programme de pathologie associé à celui de sélection vis-à-vis du parasite *Bonamia ostreae*, a été de réaliser des marquages d'hémocytes d'*Ostrea edulis* par des lectines marqués (enzyme ou fluorochrome) afin de voir si ces dernières pourraient servir de marqueur pour différencier des sous-populations hémocytaires. De plus, leur distribution cellulaire a été étudiée chez des populations d'huîtres saines et d'huîtres parasitées.

MATERIELS
ET
METHODES

1. ORIGINE DES HUÎTRES

Les huîtres sur lesquelles nous avons travaillé sont des huîtres qui proviennent de la Baie de Quiberon (Bretagne) qui est une zone endémique pour la bonamiose.

Pour les expériences réalisées, les huîtres ont été maintenues au laboratoire dans des bacs de 500 litres.

2. DETERMINATION DU NIVEAU D'INFECTION DES HUÎTRES PAR LE PARASITE *Bonamia ostreae*

L'état d'infection de chaque huître (indemne ou infectée) est réalisé par la technique d'apposition cardiaque. Le ventricule de l'huître est prélevé, essoré sur papier filtre, puis une série d'apposition est réalisée sur lame histologique. Cet organe est choisi car les parasites présents reflètent l'état d'infection de l'animal entier.

Ensuite, les préparations sont colorées à l'aide du kit Hémacolor (MERCK).

Les différents niveaux d'infection définis sont les suivants :

- Aucun parasite détecté après 5 minutes d'observation : 0
- De 0 à 10 parasites par champs : +
- De 10 à 100 parasites par champs : ++
- Plus de 100 parasites par champs : +++

3. PURIFICATION DU PARASITE *Bonamia ostreae*

La purification de *Bonamia ostreae* s'effectue selon le protocole suivant :

- Rincer l'huître dans sa coquille avec de l'eau de mer filtrée (0,2 µm) additionnée d'1 % de Tween 80 (EMFT) ;
- Mettre l'huître sans le muscle adducteur dans un bécher contenant de l'EMFT ;
- Broyer les huîtres dans le bécher, puis finir le broyage dans un tube potter à l'aide de l'Ultra turax ;
- Filtrer le broyat successivement sur des filtres dont les pores font 300, 60, puis 25 µm de diamètre ;
- Répartir le broyat dans des gros tubes. Equilibrer puis centrifuger 30 minutes à 3500 rpm et à 8°C ;
- Préparer du sucrose 20 % (p/v) en EMFT ;
- Après la centrifugation, vider le surnageant et laver le culot avec 10 mL d'EMFT ;
- Homogénéiser et broyer la suspension à l'ultra turax ;
- Déposer les suspensions sur un coussin de sucrose 20 %. Le dépôt s'effectue avec une pompe péristaltique pour ne pas perturber l'interface avec le sucrose 20 % ;
- Centrifuger à 3500 rpm pendant 30 minutes et à 8°C. La séparation sur gradient de sucrose sépare les constituants de la suspension en fonction de leur taille.
- Vider les tubes, puis remettre le culot en suspension dans 5 mL d'EMFT et passer la suspension à l'ultra turax ;
- Préparer du sucrose 40 % (p/v) en EMFT ;
- Dans des gros tubes, déposer 25 mL de sucrose 40 %, puis, à l'aide de la pompe, déposer 12 mL de sucrose 20 % ;

- Déposer doucement le broyat et centrifuger à 3500 rpm pendant 30 minutes et à 8°C ;
- Prendre l'interface 20-40 % avec une seringue de 5mL et une aiguille rodée, et placer la dans un tube ;
- Laver doucement la suspension avec de l'EMFT (volume/volume) ;
- Centrifuger à 3500 rpm pendant 30 minutes et à 8°C ;
- Préparer les fractions de Percoll 30, 40, 50, 60, 70 %. Le Percoll a une osmolarité nulle, donc il faut l'équilibrer à l'osmolarité de l'eau de mer 1000 mOs en ajoutant 4,1 g de NaCl pour 100 mL de Percoll. Placer 2,5 mL de fractions (de 70 % à 30 %) dans un tube à l'aide d'une pompe péristaltique en essayant de ne pas perturber les interfaces ;
- A la fin de la centrifugation, vider les tubes puis diluer le culot dans 1 mL d'EMFT ;
- Mettre 1 mL de suspension par tube de gradient de Percoll ;
- Centrifuger à 3500 rpm pendant 30 minutes et à 8°C ; Le gradient de Percoll permet de séparer les constituants de la suspension en fonction de leur densité (séparation isopycnic) ;
- Récupérer à l'aide d'une seringue à aiguille rodée les interfaces 50 - 60 % et 60 - 70 % et mélanger volume à volume avec de l'EMF sans Tween 80.
- Déposer environ 1 mL de la suspension sur du sucrose 20 % (p/v) en EMF. Utiliser des tubes à fond conique.
- Centrifuger à 3500 rpm pendant 30 minutes et à 8°C ;
- Vider le surnageant, en laissant un peu de liquide dans le fond du tube et reprendre le culot dans 1 mL d'EMF ;
- « Pooler » les différentes suspensions obtenues dans un seul tube et centrifuger à 3500 rpm pendant 30 minutes et à 8°C ;
- Vider le tube et reprendre le culot dans 1 mL d'EMF en rinçant bien le tube ;
- Diluer une partie de la suspension parasitaire au 1/10 et réaliser un comptage en cellule de Mallassez ;

4. PONCTION DE L'HEMOLYMPHE

La ponction d'hémolymphe en solution SAAH (solution anti-aggrégante pour hémocytes) ou en solution d'Alsever (cf. annexe 1) s'effectue de la façon suivante :

- Mettre la solution SAAH ou d'Alsever dans un tube placé dans de la glace ;
- Placer le tube dans lequel les hémocytes seront récupérés dans la glace ;
- Ouvrir l'huître et la vider de son eau ;
- Prélever à la seringue environ 0,3 mL de solution SAAH ou d'Alsever et prélever l'hémolymphe au niveau de la cavité péricardique.
- Centrifuger la suspension d'hémocytes en SAAH ou Alsever à 1500 rpm à 4°C pendant 10 minutes ;
- Vider le surnageant et resuspendre le culot dans la solution SAAH ou Alsever afin de le laver ;
- Centrifuger à 1500 rpm à 4°C pendant 10 minutes ;
- Refaire un lavage et une centrifugation.

5. PREPARATION DE TISSUS POUR LA MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Deux techniques ont été utilisées : les coupes en paraffine et les cryocoupes.

5.1. Coupes paraffines

La technique des coupes en paraffine s'effectue en plusieurs étapes. Premièrement, le tissu est fixé et déshydraté. Les étapes suivantes consistent à inclure les tissus dans des blocs de paraffine et à les couper.

5.1.1. Fixation et déshydratation des tissus

Avant d'être inclus dans de la paraffine, les tissus sont préalablement fixés puis déshydratés.

La fixation s'effectue en plongeant le tissu dans un bain de Davidson de Carson ou de Carnoy (cf. annexe 2). Cette fixation permet d'insolubiliser et préserver les architectures des tissus en réticulant les structures des tissus.

Ensuite, les tissus fixés sont déshydratés par un bain d'une heure en éthanol 70 %, un bain d'une heure en éthanol 95 % et trois bains d'une heure en éthanol absolu. La déshydratation doit être progressive et totale. Cette étape est importante, car la paraffine est hydrophobe, et s'il reste de l'eau dans les tissus, la paraffine ne pénétrera pas bien dans tout le tissu. Ces différentes étapes s'effectuent dans un automate.

5.1.2. Inclusion des tissus dans un bloc de paraffine

L'inclusion des tissus dans un bloc de paraffine est réalisée de la façon suivante :

- Sortir les tissus imprégnés de paraffine de la machine à imprégnation ;
- Mettre un peu de paraffine chauffée dans un moule en acier ;
- Y placer le morceau de tissu, puis mettre en place le support en plastique et recouvrir le tout de paraffine chauffée ;
- Placer le moule sur une place refroidissante (-5°C) et laisser solidifier la paraffine.
- Le bloc est prêt pour la taille des coupes.

5.1.3. Réalisation des coupes paraffine

La coupe s'effectue de la façon suivante :

- Dégrossir les blocs de paraffine au microtome en réalisant des coupes de 15 µm d'épaisseur jusqu'à atteindre les tissus ;
- Les laisser refroidir sur une plaque à -5°C pendant quelques heures. La coupe est plus facile lorsque la paraffine est bien froide, car elle est plus dure.
- Placer le bloc sur le microtome et faire l'approche ;
- Faire des coupes de 2-3 µm d'épaisseur et les déposer à la surface d'un bain-marie tiède afin de les déplier ;
- Les placer sur une lame histologique ;

- Sécher les lames une nuit à l'étuve à 60°C.

5.2. Cryocoupes

Les cryocoupes sont des coupes réalisées sur des tissus congelés à basse température (-20°C).

Elles ont l'avantage, de respecter de nombreuses structures antigéniques des tissus et de ne pas trop dénaturer les molécules, ce qui n'est pas toujours le cas lorsque les tissus sont fixés puis inclus dans de la paraffine à 60°C.

Elles se réalisent de la façon suivante :

- Mettre le milieu de congélation sur le support et y déposer l'échantillon à couper ;
- Congeler l'échantillon à basse température (-20°C) et le couvrir avec le milieu de congélation ;
- Tailler les cotés du bloc contenant l'échantillon de façon à obtenir un carré ;
- Mettre le support en place et aligner le bloc avec le couteau ;
- Dégrossir le bloc par des coupes de 10 à 30 µm d'épaisseur ;
- Réaliser les coupes d'épaisseur voulue (de 2 à 5 µm) ;
- Récupérer les coupes sur une lame histologique. Les coupes, froides, se fixent par simple contact avec la lame qui est à la température ambiante.

6. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

6.1. Principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission

Dans un microscope électronique à transmission, la source de lumière est un filament de tungstène (cathode) porté à haute température, il émet des électrons au sommet d'une colonne cylindrique d'environ 2 mètres, dans laquelle est créé un vide très poussé de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} Pascals pour éviter les collisions des électrons avec l'air qui pourrait ainsi les disperser.

Les électrons sont accélérés par une anode puis transmis à travers une lentille électromagnétique pour former un faisceau d'électrons qui descend le long de la colonne. Des bobines magnétiques font converger le faisceau électronique et jouent le rôle de condenseur.

Certains électrons traversant l'échantillon sont déviés selon la densité du matériel. Les électrons déviés ne figurent pas sur l'image, donc les régions denses se distinguent comme des zones de flux d'électrons réduits.

Les grossissements utilisés dépendent de l'échantillon à observer et vont de 2500 pour une cellule entière à 200 000 pour l'observation de virus, voire même de 500 000 pour l'observation de nucléosomes.

6.2. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission.

La préparation des cellules pour l'observation au microscope électronique se fait en plusieurs étapes qui sont la fixation, la déshydratation, l'imprégnation, l'inclusion, la coupe et le contraste des coupes à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb (Reynolds).

La composition des solutions nécessaires à chaque étape est donnée en annexe 4

6.2.1. Fixation des cellules

La fixation des cellules s'effectue selon le protocole suivant :

- Fixer les cellules dans une solution de glutaraldéhyde à 3 % pendant 30 minutes à température ambiante ou 2 heures au frigo. Le glutaraldéhyde crée des pontages entre les protéines et des groupements aminés. Les cellules fixées peuvent être conservées dans le glutaraldéhyde pendant plusieurs jours à 4°C.

- Réaliser 2 lavages de 10 minutes en tampon cacodylate ;
- Post-fixer les cellules à l'acide osmique 1 % pendant 1 heure à 4°C ;
- Réaliser 2 lavages de 10 minutes en tampon cacodylate ;

Chaque étape est suivie d'une centrifugation de 10 minutes à 1500 rpm pour éviter la perte des cellules

6.2.2. Déshydratation des tissus

La déshydratation est indispensable car l'inclusion va être réalisée dans une résine hydrophobe. Par conséquent, la déshydratation doit être complète afin que la résine diffuse complètement dans tout l'échantillon à inclure.

La déshydratation est réalisée par des bains d'alcool de concentrations croissantes. Les bains sont les suivants :

- 1 bain de 10 minutes en alcool 70 % ;
- 2 bains de 15 minutes en alcool 95 % ;
- 3 bains de 20 minutes en alcool 100 % ;
- 2 bains de 15 minutes en oxyde de propylène.

6.2.3. Imprégnation et inclusion des cellules

L'imprégnation est réalisée en deux étapes qui sont les suivantes :

- Incuber les cellules 1 heure à température ambiante dans un bain d'oxyde de propylène et d'Epon (v/v) ;
- Incuber les tissus 1 heure à température ambiante dans un bain d'Epon.

Remarque : L'Epon doit être préparé au minimum 30 minutes à l'avance pour qu'il ne contienne pas de bulles d'air.

Les cellules sont incluses directement en eppendorf en ajoutant 200 µL d'Epon. Attention, il faut absolument éviter la présence de bulles d'air.

Puis, laisser polymériser la résine à 60°C pendant 24 à 48 heures.

6.2.4. Coupe des blocs de résine

La taille des blocs de résine s'effectue de la façon suivante :

- Tailler, à l'aide d'une lame de rasoir, les blocs d'Epon de façon à ce que les cellules incluses soient comprises dans une pyramide tétraédrique. Il doit y avoir le moins de résine possible autour des cellules. Le bord d'attaque et le bord supérieur doivent être parallèle pour pouvoir obtenir un ruban droit lors de la coupe.

- Ensuite, à l'aide d'un ultramicrotome (NOVA LKB), faire des coupes fines d'1 μm d'épaisseur ;

- Déposer ces coupes sur une lame et les fixer par la chaleur en plaçant la lame sur une plaque chauffante ;

- Colorer les coupes au bleu de toluidine et les observer au microscope photonique. Ces coupes permettent de vérifier la qualité de la préparation.

- Puis, si les coupes semi-fines montrent que la préparation est correcte, réaliser des coupes semi-fines de 80 à 100 nm d'épaisseur ;

- Récupérer ces coupes sur des grilles en cuivre pour pouvoir, après avoir contrasté les coupes, les observer au microscope électronique à transmission.

6.2.5. Contraste des coupes à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb

Le contraste des coupes est réalisé selon le protocole suivant :

- Déposer la grille de cuivre sur une goutte d'un mélange d'acétate d'uranyle et d'alcool 50 % (v/v) ;

- Incuber 40 minutes à température ambiante et à l'obscurité ;

- Rincer la grille par 3 bains d'alcool 25 % et 3 bains d'eau bidistillée. Les bains doivent être réalisés rapidement.

- Sécher la grille sur un papier filtre, et attendre 15 minutes, temps nécessaire pour que le séchage soit complet ;

- Déposer la grille sur une goutte de citrate de plomb pendant 15 minutes. La goutte est placée sur du parafilm placé dans une boîte de pétri dans laquelle des pastilles de potasse caustique (KOH) ont été introduites. La potasse permet d'absorber l'humidité. En effet, s'il y a de l'humidité qui se dépose sur les coupes, elle donnera un précipité, ce qui sera gênant lors de l'observation microscopique.

- Rincer la grille par 2 bains rapides d'eau distillée.

7. MARQUAGE PAR DES LECTINES

7.1. Présentation des lectines

7.1.1. Rôle des lectines

Les lectines sont des glycoprotéines qui agglutinent les cellules et/ou précipitent les complexes polysidiques.

Présentes chez les plantes, les mollusques, les invertébrés et les vertébrés, leur rôle précis au sein des organismes reste méconnu.

Cependant, il a été montré qu'elles avaient un rôle dans les réponses immunitaires non spécifiques. En effet, les lectines, présentes dans les voies circulatoires des organismes et sur certaines cellules, se fixent sur les oses ou les polyosides présents à la surface de particules antigéniques et aideraient à la phagocytose. Certaines lectines auraient aussi un rôle d'agglutinine.

7.1.2. Détermination du(es) ose(s) présents à la surface membranaire des cellules

La détermination de la nature des oses ou des polyosides présents à la surface de cellules est possible grâce à l'utilisation de lectines couplées à un fluorochrome ou une enzyme.

Une lectine est mise en contact avec des cellules. Si au sein de la membrane cellulaire, les oses ou les polyosides que reconnaît la lectine sont présents, cette dernière se fixera à la cellule.

Grâce au marquage de la lectine, il est possible de savoir si elle s'est fixée ou non sur la cellule, et d'en déduire la présence ou non du(es) ose(s) ou du(es) polyoside(s) reconnus. En réalisant l'expérience avec diverses lectines, il est possible de déterminer une liste des groupements (poly)osidiques présent au niveau de la membrane d'une cellule, et par suite, tenter de différencier des populations ou sous-populations cellulaires. .

7.2. Lectines disponibles au laboratoire

Le tableau suivant dresse les lectines dont dispose le laboratoire, ainsi que les oses ou polyosides reconnus par chaque lectine.

Lectines	Molécule couplée à la lectine	Ose(s) ou polyoside(s) reconnu(s)
Concanavaine A (Con A)	FITC Peroxydase	α -mannose ; α -glucose
Dolichos biflorus	FITC Peroxydase	α -N-acétyl- galactosamine
Arachis hypogaeae (Peanut)	FITC Peroxydase	β -galactose(1 \rightarrow 3)N-acétyl- galactosamine
Ricinus communis (RCA 120)	FITC	β -galactose
Ulex europaeus (UEA 1)	FITC Peroxydase	α -L-fucose
Triticum vulgare (Wheat germ)	FITC Peroxydase	(N-acétyl-glucosamine) ₂ ; Acide sialique
Glycine max (Soybean)	FITC Peroxydase	N-acétyl- galactosamine

7.3. Utilisation des lectines couplées à la FITC

7.3.1. Marquage des hémocytes vivants et en suspension

Le protocole mis en œuvre est le suivant :

- Après prélèvement des hémocytes par ponction cardiaque en SAAH, centrifuger à 1500 rpm pendant 10 minutes et à 4°C.
- Laver le culot en le reprenant dans du SAAH et centrifuger à 1500 rpm pendant 10 minutes et à 4°C ;
- Reprendre le culot dans du SAAH ;
- Ajouter la lectine marquée à la FITC à 2 mg/mL de façon à obtenir la concentration désirée puis ajouter du bleu Evans de telle sorte qu'il soit dilué au 1/100. Ce dernier permet de diminuer le bruit de fond en colorant en rouge les cellules sur lesquelles il n'y aura pas eu fixation de la lectine.
- Incuber 1 heure à température ambiante et sous agitation douce ;
- Centrifuger 10 minutes à 1200 rpm et reprendre le culot dans du SAAH. Réaliser 2 fois ce lavage. Il permet d'éliminer les lectines en excès qui ne se sont pas fixées sur les cellules.
- Centrifuger 10 minutes à 1200 rpm et reprendre le culot dans 100 µL de SAAH ;
- Cytocentrifuger la suspension cellulaire sur lame histologique à 500 rpm pendant une minute et à 4°C ;
- Monter les lames en tampon glycérolé et observer au microscope à épifluorescence.

7.3.2. Marquage d'hémocytes cytocentrifugés

Ce marquage est réalisé de la façon suivante :

- Ponctionner les hémocytes en solution SAAH ;
- Centrifuger à 1500 rpm pendant 10 minutes et à 4°C et resuspendre le culot en SAAH. Réaliser 2 fois ce lavage ;
- Reprendre le culot dans 100 µL de SAAH ;
- Cytocentrifuger sur lame histologique à 500 rpm pendant 1 minute ;
- Placer la lectine diluée à la concentration désirée sur le tapis cellulaire et additionnée de bleu Evans dilué au 1/100 ;
- Incuber 1 heure à température ambiante et en chambre humide ;
- Laver les lames par 2 bains de 5 minutes en SAAH ;
- Monter la lame entre lame et lamelle à l'aide de la résine Eukitt et observer au microscope à fluorescence.

7.3.3. Marquage de tissus

Le protocole utilisé pour marquer des coupes en paraffine par des lectines couplées à la FITC est le suivant :

- Déparaffiner les coupes par 2 bains de 5 minutes en xylène et 1 bain de 5 minutes en alcool 100 % ;
- Hydrater les lames par un bain de 5 minutes en eau courante puis par un bain de PBS 1X pendant 5 minutes ;
- Déposer sur la coupe 100 à 500 μL de lectines marquée à la FITC et diluées en PBS 1X ;
- Incuber 1 heure à température ambiante et en chambre humide ;
- Rincer la lame par 2 bains de 5 minutes de PBS 1X ;
- Monter les lames en tampon glycérolé et observer au microscope à fluorescence.

Remarque : Pour effectuer l'immunomarquage sur des cryocoupe, appliquer le protocole ci-dessus à partir de la seconde étape.

7.4. Utilisation des lectines couplées à la peroxydase

7.4.1. Marquages d'hémocytes cyto centrifugés

Pour réaliser un marquage d'hémocytes cyto centrifugés par des lectines couplées à la peroxydase, il faut procéder comme suit :

- Ponctionner les hémocytes en solution SAAH ;
- Centrifuger à 1500 rpm pendant 10 minutes et à 4°C ;
- Resuspendre le culot en SAAH ;
- Centrifuger à 1500 rpm pendant 10 minutes et à 4°C ;
- Reprendre le culot dans 100 μL de SAAH ;
- Cyto centrifuger sur lame histologique à 500 rpm pendant 1 minute ;
- Placer les lames dans un bain de méthanol auquel on a ajouté 0,3 % (v/v) de peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes. Ce bain permet d'inactiver les peroxydases endogènes pour ne pas qu'elles soient révélées lors de la suite de la manipulation et masquer les marquages spécifiques des oses par les lectines ;
- Laver les lames par 2 bains de 5 minutes en SAAH ;
- Placer la lectine diluée à la concentration désirée sur les cellules ;
- Incuber 1 heure à température ambiante et en chambre humide ;
- Laver les lames par 2 bains de 5 minutes en SAAH ;
- Incuber les lames 20 minutes à l'obscurité dans un bain de DAB ;
- Contre-colorer au bleu de Unna ;
- Plonger la lame dans un bain de xylène et monter la entre lame et lamelle à l'aide de la résine Eukitt et observer au microscope photonique.

Remarque : Contrairement avec les lectines couplées à la FITC, il n'est pas possible de réaliser des marquages sur hémocytes en suspension avec les lectines marquées à la peroxydase, car en suspension, l'étape d'inactivation de la peroxydase endogène n'est pas réalisable. En effet, les hémocytes en suspension dans un bain de méthanol à 0,3 % sont dégradés, sûrement à cause du peroxyde d'hydrogène.

8. TECHNIQUE D'IMMUNOPEROXYDASE INDIRECTE

8.1. Principe

L'immunomarquage indirect est une réaction immunologique qui permet de visionner à l'aide d'un anticorps l'emplacement d'une molécule "antigénique" au sein d'une cellule.

Il s'effectue en trois temps

- Dans un premier temps, on fait agir un anticorps dirigé contre l'antigène que l'on veut visionner au niveau de la cellule.

- Dans un deuxième temps, on fait agir un deuxième anticorps conjugué à la peroxydase et dirigé contre le premier anticorps.

- Dans un troisième temps, on révèle l'emplacement du complexe antigène-anticorps par une réaction enzymatique en utilisant un substrat spécifique de l'enzyme choisie. Le produit est un chromogène coloré précipitable. Nous avons utilisé au laboratoire la diaminobenzidine.

8.2. Immunoperoxydase indirecte sur des hémocytes cyto-centrifugés

La réaction d'immunoperoxydase indirecte sur des hémocytes cyto-centrifugés s'effectue selon le protocole suivant :

- Après prélèvement et rinçage des hémocytes en solution SAAH, cyto-centrifugez-les sur une lame histologique à 500 rpm pendant une minute ;

- Plonger la lame 30 minutes dans un bain de méthanol additionné de 0,3 % d'H₂O₂,

Laver la lame par 2 bains de 5 minutes en SAAH ;

- Verser 50 µL d'anticorps spécifiques dilués au 1/10 en SAAH sur le tapis cellulaire ;

- Incuber une heure à 37°C en chambre humide ;

- Rincer 2 fois 5 minutes dans du SAAH ;

- Placer sur les cellules 100 µL d'anticorps conjugués à la peroxydase dilués au 1/250 en SAAH sur le frottis cellulaire ;

- Incuber une heure à 37°C en chambre humide ;

- Rincer 2 fois 5 minutes dans du SAAH ;

- Placer la lame 20 minutes et à l'obscurité dans du DAB (cf. annexe 3) ;

- Contre-colorer au bleu de Unna par passage de la lame dans les bains suivants :

- | | |
|--|-------------------|
| - Bleu Unna | 20 secondes |
| - H ₂ O + 1 goutte d'acide acétique | quelques secondes |
| - Alcool 95 % | quelques secondes |
| - Alcool 100 % | quelques secondes |
| - Xylène | quelques secondes |

- Monter la lame entre lame et lamelle avec la résine Eukitt et observer au microscope photonique.

8.3. Immunoperoxydase indirecte sur coupes histologiques.

8.3. Immunoperoxydase indirecte sur coupes histologiques.

L'immunoperoxydase indirecte sur coupes paraffine est réalisée de la façon suivante :

- Déparaffiner les coupes histologiques par 2 bains de 5 minutes en xylène, et un bain de 5 minutes en éthanol absolu ;
- Plonger la lame dans un bain de 200 mL de méthanol additionné de 600 µL de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pendant 30 minutes à température ambiante. Ce bain permet de neutraliser les peroxydases endogènes présentes, par exemple, dans les peroxydases des cellules.
- Laver les lames par 2 bains de 10 minutes en PBS 1X ;
- Plonger la lame dans un bain de PBS 3 % lait écrémé pendant 30 minutes. Les protéines du lait écrémé permettent de saturer la coupe, ce qui permettra d'éviter une fixation aspécifique du premier anticorps.
- Déposer sur la lame 200 à 500 µL de la suspension du premier anticorps dilué en PBS au 1/5 ;
- Rincer les lames par 2 bains de 10 minutes en PBS 1X ;
- Déposer les anticorps secondaires couplés à la peroxydase et dilués au 1/250 en PBS ;
- Incuber 1 heure en chambre humide à température ambiante ;
- Rincer les lames par 2 bains de 10 minutes en PBS 1X ;
- Révéler la peroxydase par une solution de 3,3' diaminobenzidine (DAB) en PBS 0,06 % (p/v) additionné d'H₂O₂ à 0,03 % ; incuber 20 minutes à température ambiante et à l'obscurité ;
- Laver les lames 2 fois 5 minutes en PBS ;
- Contre-colorer au bleu de Unna par passage de la lame dans les bains suivants :
 - Bleu Unna 5 secondes
 - H₂O + 1 goutte d'acide acétique 10-20 secondes
 - Alcool 95 % 10-20 secondes
 - Alcool 100 % 10-20 secondes
 - Xylène 10-20 secondes
- Monter la lame entre lame et lamelle à l'aide de la résine Eukitt et observer au microscope photonique.

Remarque : Pour effectuer l'immunomarquage sur des cryocoupes, appliquer le protocole ci-dessus à partir de la seconde étape.

9. PREPARATION DES HEMOCYTES POUR L'ETUDE DE POPULATIONS HEMOCYTAIRES

L'étude de populations hémycytaires d'huîtres infectées et non infectées a été effectuée de la manière suivante :

Pour chaque huître analysée, une ponction cardiaque est réalisée, ainsi qu'une apposition cardiaque. Cette dernière nous permettra de définir l'état d'infection de l'huître.

Ensuite, à partir de chaque ponction cardiaque, 4 lames sont préparées par cyto centrifugation et seront traitées de la façon suivante :

- Une lame sera colorée à l'Hémacolor. Cette lame nous permettra de définir la répartition des 3 types cellulaires de l'hémolymphe : les granulocytes, les agranulocytes et les hyalinocytes.

- Une lame sera marquée avec la concanavaleine A couplée à la peroxydase. A partir de cette lame, nous déduirons le pourcentage de cellules marquées par cette lectine.

- Une lame sera marquée avec Wheat germ couplé à la peroxydase. Sur cette lame, on observera le pourcentage de cellules marquées par cette lectine.

- Une immunoperoxydase est réalisé sur la quatrième lame, en utilisant comme anticorps primaire, l'anticorps anti-granulocytes. Cette lame nous permettra de connaître précisément le nombre de granulocytes.

Ensuite, les lames seront observées et un comptage des 3 types cellulaires sera effectué. Au total, pour chaque lame, 100 cellules seront comptées.

Ensuite, à partir de chaque ponction cardiaque, 4 lames sont préparées par cytocentrifugation et seront traitées de la façon suivante :

- Une lame sera colorée à l'Hémacolor. Cette lame nous permettra de définir la répartition des 3 types cellulaires de l'hémolymphe : les granulocytes, les agranulocytes et les hyalinocytes.

- Une lame sera marquée avec la concanavaline A couplée à la peroxydase. A partir de cette lame, nous déduirons le pourcentage de cellules marquées par cette lectine.

- Une lame sera marquée avec Wheat germ couplé à la peroxydase. Sur cette lame, on observera le pourcentage de cellules marquées par cette lectine.

- Une immunoperoxydase est réalisé sur la quatrième lame, en utilisant comme anticorps primaire, l'anticorps anti-granulocytes. Cette lame nous permettra de connaître précisément le nombre de granulocytes.

Ensuite, les lames seront observées et un comptage des 3 types cellulaires sera effectué. Au total, pour chaque lame, 100 cellules seront comptées.

RESULTATS- DISCUSSION

1. OPTIMISATION DES MARQUAGES DES HEMOCYTES A L'AIDE DE LECTINES

On désire mettre au point une technique de marquage d'hémocytes vivants et en suspension par des lectines afin d'adapter le protocole à la cytométrie de flux.

Pour ce faire, il nous faut définir puis optimiser le protocole expérimental, ainsi que les lectines à utiliser.

1.1. Choix des solutions à utiliser pour effectuer les expériences sur les hémocytes

1.1.1. Solutions à tester pour réaliser le prélèvement des hémocytes

En général, la solution utilisée pour effectuer la ponction cardiaque des hémocytes est la solution d'Alsever. Cette solution est une solution anti-agrégante qui permet d'éviter que les hémocytes s'agrègent lors de leur prélèvement. Or, la solution d'Alsever contient du glucose qui peut modifier le marquage des hémocytes par les lectines. En effet, si on l'utilise, il est possible que le glucose contenu dans cette solution interfère avec les oses présents à la surface membranaire des hémocytes, et par suite, transforme les marquages.

La solution d'Alsever doit être remplacée par une autre solution anti-agrégante, ne devant pas contenir d'oses et, qui comme la solution d'Alsever, respecte l'osmolarité de l'eau de mer qui est de l'ordre de 1100 mOsm. Une solution répondant à tous ces critères a été testée. Cette solution est la solution nommée SAAH (Solution Anti-Agrégante pour Hémocytes). N'ayant jamais été employée au laboratoire, nous devons la tester pour voir si elle n'entraîne aucun changement dans la morphologie et la fonctionnalité des hémocytes circulant vivants.

Pour tester l'action anti-agrégante du SAAH, on a réalisé une ponction cardiaque à l'aide de cette solution. Ensuite, la suspension hémocytaire a été cyto-centrifugée, colorée avec le kit Hémacolor et observée au microscope. On utilise cette coloration car c'est celle utilisée pour l'observation morphologique des hémocytes. La morphologie d'hémocytes prélevés en Alsever, cyto-centrifugés et colorés par ce kit est montrée sur les photos n°1 et n°2. La photo n°1 correspond à des hémocytes provenant d'une huître saine, et la photo n°2 montre la morphologie d'hémocytes prélevés chez une huître infectée par *Bonamia ostreae*.

L'observation des lames nous permet de constater que les hémocytes ne sont pas agrégés et que leur morphologie est conservée et présente le même aspect que celle observée lors de l'emploi de la solution d'Alsever.

Au vu de ce résultat, on décide que les ponctions cardiaques seront effectuées en SAAH, lors des expériences de marquage.

1.1.2. Solutions à tester pour effectuer les lavages des hémocytes

Pour les lavages, on désire une solution modifiant peu les conditions physico-chimiques dans lesquelles sont placés les hémocytes vivants et en suspension lors de la ponction cardiaque, afin qu'ils subissent le moins de « stress » possible lors de ces manipulations.

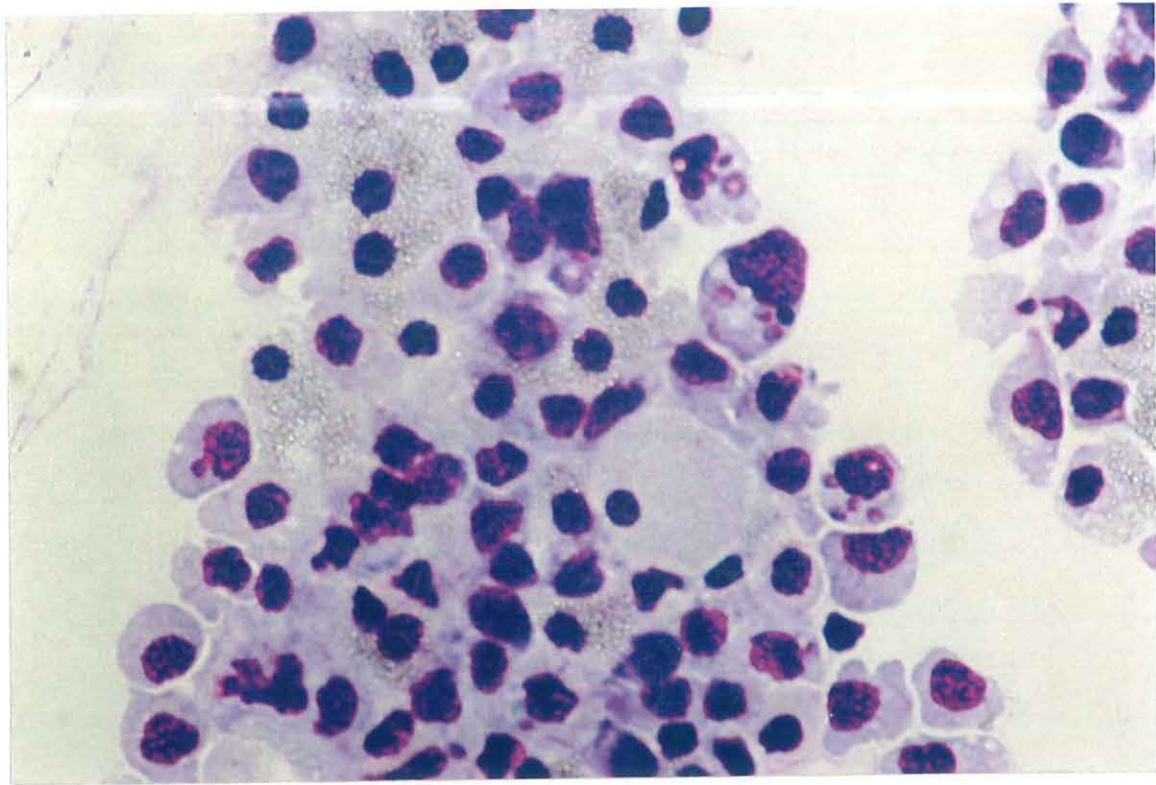


Photo n°1 : Hémocytes prélevés en Alsever chez une huître saine, cytocentrifugés et colorés avec le kit Hémacolor (x1000).

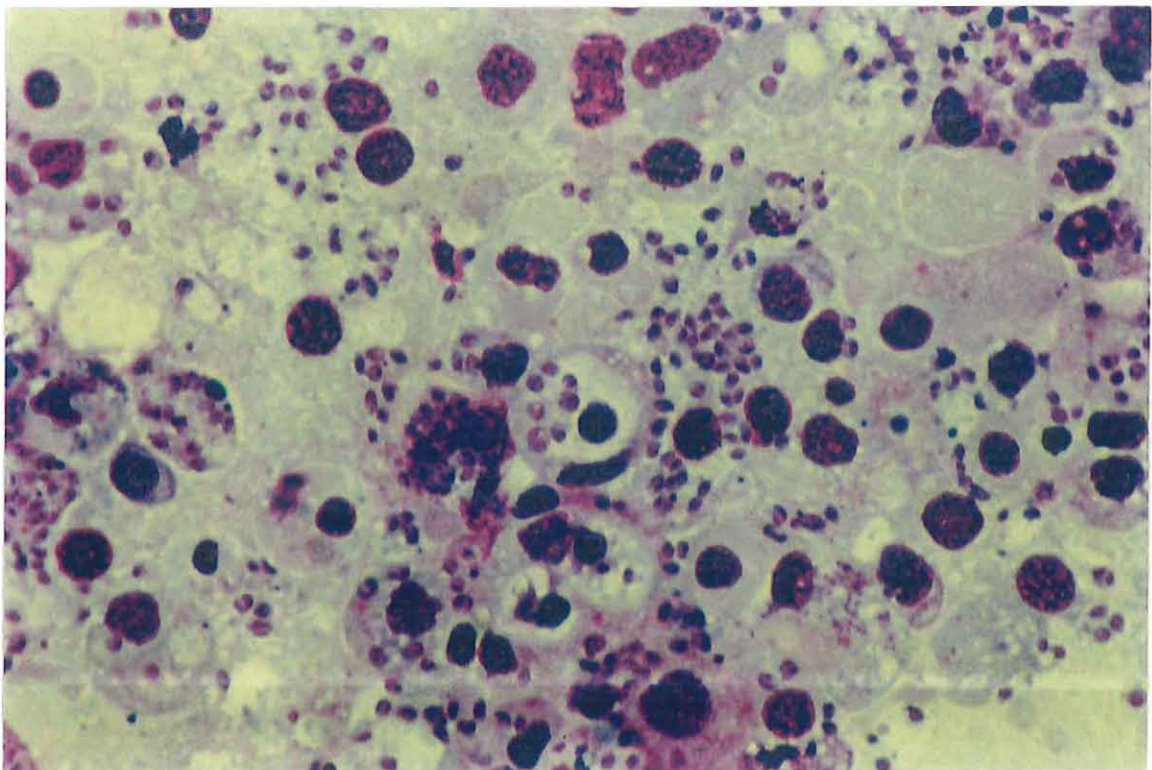


Photo n°2 : Hémocytes prélevés en Alsever chez une huître parasitée par *Bonamia ostreae*, cytocentrifugés et colorée avec le kit Hémacolor (x1000).

Deux solutions ont été testées : le PBS 1100 mOsm et la solution SAAH

- Le PBS 1100 mOsm. Le PBS 500 mOsm est couramment utilisée au laboratoire pour les lavages lors des immunomarquages d'hémocytes cytocentrifugés et fixés utilisant des anticorps monoclonaux. Cette technique nous servira pour faire des marquages de référence. Mais, son osmolarité est différente de celle de l'eau de mer, ce qui est gênant pour réaliser des marquages d'hémocytes vivants et en suspension, car on risque de les faire éclater par un choc hypotonique. Pour palier à cet inconvénient, on ajuste le tampon PBS à une osmolarité proche de 1100 mOsm. Cet ajustement peut-être effectué par ajout de glucose ou par ajout de NaCl. Cependant, l'ajout de ce sel est peut-être moins recommandé que l'ajout du glucose car une trop forte salinité du tampon pourrait perturber les hémocytes vivants.

- La solution SAAH en tant que solution de ponction cardiaque et de lavage a semblé être le meilleur compromis afin de faire subir le moins de « stress » aux hémocytes lors de leur préparation.

Les résultats obtenus pour chaque solution sont les suivants :

- Le PBS 1100 mOsm donne un marquage des hémocytes de même qualité que le marquage de référence. Cependant, cette solution ne pourra être utilisée pour le marquage par les lectines des hémocytes en suspension car elle contient du glucose. Le PBS 1100 mOsm ajusté avec du NaCl devra donc être testé ultérieurement.

- Le marquage des hémocytes observé lors de l'utilisation du SAAH donne un marquage identique à celui de référence.

Ces résultats nous permettent donc de choisir le SAAH comme solution pour laver les hémocytes lors des marquages.

2. MARQUAGE DES HEMOCYTES CIRCULANTS

Les lectines utilisées sont soit couplées à la FITC soit couplées à la peroxydase.

2.1. Lectines couplées à un fluorochrome

Le fluorochrome auquel est couplé la lectine est l'isothiocyanate de fluoréscéine (FITC).

- Marquage d'hémocytes en suspension :

En premier lieu, le marquage a été effectué en utilisant toutes les lectines à la concentration de 20 µg/mL, concentration préconisée par le fournisseur SIGMA.

Lors de l'observation microscopique en épifluorescence des marquages, nous avons constaté qu'avec Wheat germ, la Concanavaleine A, Ulex europaeus, Ricinus communis, Soybean, Peanut et Dolichos biflorus, nous obtenions un marquage intense de toutes les cellules et de nombreux débris.

Nous, en avons conclu que la concentration d'utilisation était trop importante et que ces marquages étaient aspécifiques. Nous avons testé des concentrations décroissantes afin

de définir de meilleures conditions d'affinité des lectines pour les oses ou polysides membranaires des cellules.

Après avoir marqué les hémocytes par des solutions de lectines de concentrations différentes, nous sommes parvenus, pour chaque lectine, à définir la concentration optimale d'utilisation des lectines dans ces conditions expérimentales.

- Marquage d'hémocytes cytocentrifugés non fixés :

Avec cette technique, nous avons obtenu des résultats similaires au marquage des hémocytes en suspension.

La même démarche a été réalisée, et les concentrations optimales d'utilisation des lectines dans ces conditions expérimentales ont pu être définies.

En résumé, le tableau de la page ci-après récapitule les concentrations d'utilisation des lectines utilisées pour les différents marquages, ainsi que le type de marquage observé.

Lectines	Concentration d'utilisation lors du marquage d'hémocytes cytocentrifugés (µg/mL)	Concentration d'utilisation lors du marquage d'hémocytes en suspension (µg/mL)	Type de marquage
Concanavaleine A	1	2	Marquage périphérique et marquage intracellulaire de certaines cellules
Dolichos biflorus	20	15	Marquage périphérique ou intracellulaire. La luminosité du marquage est très faible
Peanut	15	10	Marquage périphérique de très peu de cellules
Ricinus communis	20	15	Marquage périphérique ou intracellulaire de certaines cellules
Ulex europaeus	15	10	Marquage périphérique de peu de cellules
Wheat germ	1	1	Marquage périphérique et intracellulaire de certaines cellules.
Soybean	15	10	Marquage périphérique de quelques cellules et de très faible intensité.

Tableau n°1 : Concentrations en lectines à utiliser pour les marquages d'hémocytes en suspension et cytocentrifugés ; type du marquage donné par chaque lectine.

D'après le tableau, nous constatons que la concentration des lectines à utiliser est plus faible pour le marquage des hémocytes en suspension que pour le marquage des hémocytes cyto-centrifugés.

De plus, on constate que pour l'ensemble des lectines, la concentration à utiliser varie entre 10 et 20 $\mu\text{g/mL}$, sauf pour la Concanavaline A et Wheat germ dont la concentration d'utilisation est de l'ordre de 1 $\mu\text{g/mL}$.

Les résultats des marquages impliquent que les membranes des cellules marquées possèdent des résidus mannosyl, glucosyl, d'acide sialique, de (N-acétyl-glucosamine)₂, galactosyl, et dans une moindre mesure (car beaucoup moins de cellules sont marquées), de résidus N-acétyl-galactosamine, de β -galactose (1->3) N-acétyl-galactosamine et de L-fucose.

2.1.1. Profil de marquage obtenu

Au vu des marquages donnés par chaque lectine, nous avons décidé de garder la Concanavaline A, Wheat germ et Ricinus communis pour effectuer les expériences de marquage suivantes.

En effet, Les autres lectines marquent très peu d'hémocytes et semblent peu discriminantes des sous-populations hémocytaires. De plus, les lectines choisies ne reconnaissent pas les mêmes sucres et leur répartition au niveau des cellules est différente.

La photo n°3 illustre le marquage d'hémocytes vivants et en suspension par Wheat germ à 1 $\mu\text{g/mL}$. On observe que certaines cellules sont colorées en rouge, et que d'autres ont une couleur verte, orange ou jaune diffuse dans toute la cellule. La coloration de ces dernières résulte de la lumière émise par la FITC excitée revenant à un état stable, ce qui signifie que ce sont des cellules marquées par Wheat germ. Les cellules rouges sont donc les cellules qui n'ont pas été marquées. On peut noter surtout un marquage intracellulaire de certaines cellules. En outre, la distribution des récepteurs de cette lectine semble différente d'une cellule à l'autre.

La photo n°4 correspondant au marquage par Wheat germ d'hémocytes cyto-centrifugés non fixés. Comme pour la photo n°3, on constate une différence de marquage entre les cellules qui souligne l'intérêt de cette lectine.

La photo n°5, prise à partir d'une autre lame préparée comme la précédente, illustre le marquage périphérique des hémocytes par Wheat germ. En effet, sur cette photo, on observe une coloration à la périphérie des cellules.

Ainsi, le fait d'observer des cellules marquées et non marquées montre que la fixation de Wheat germ sur les hémocytes semble discriminante.

La photo n°6 correspond au marquage d'hémocytes en suspension par Ricinus communis à 15 $\mu\text{g/mL}$, et permet d'observer que le marquage des hémocytes par cette lectine est périphérique et intracellulaire. Comme Wheat germ, cette lectine donne un marquage intense à l'intérieur des cellules avec une distribution variable en fonction des hémocytes.

La photo n°7, prise à partir d'un marquage d'hémocytes en suspension par la Concanavaline A à 1 $\mu\text{g/mL}$ permet de constater que le marquage donné par cette lectine est majoritairement périphérique.

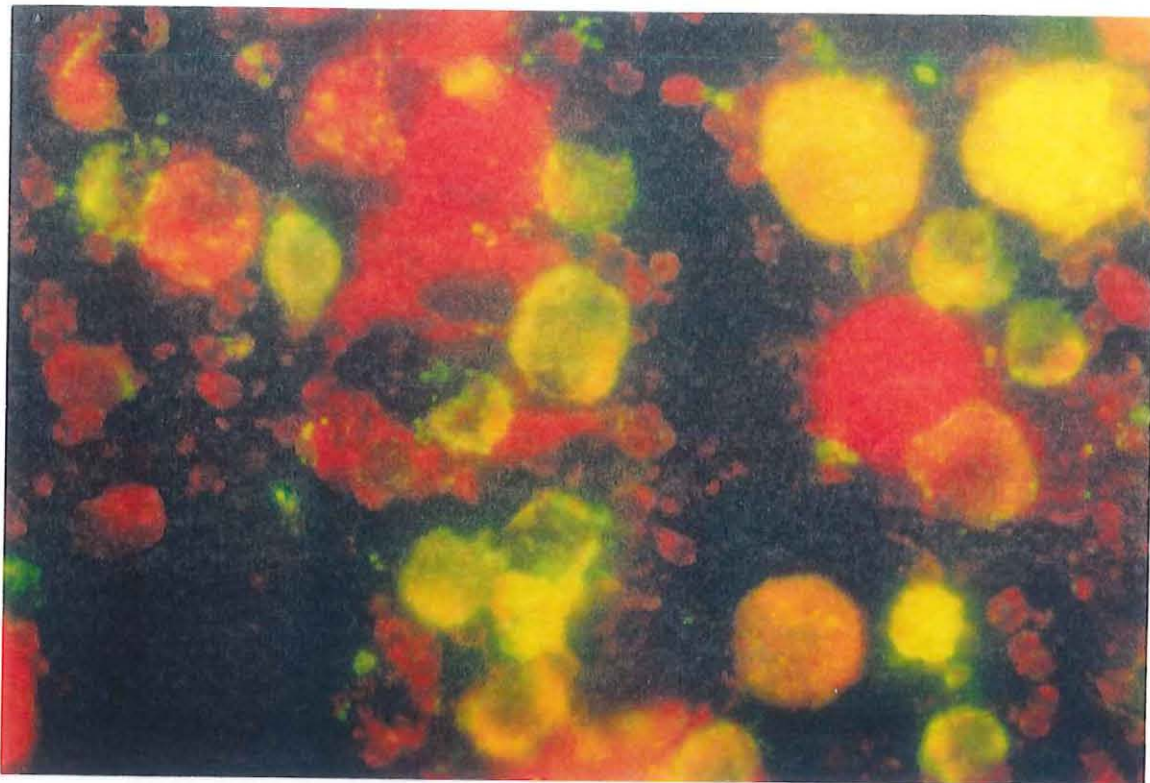


Photo n°3 : Hémocytes vivants et en suspension marqués par Wheat germ couplé à la FITC utilisé à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\times 1000$).

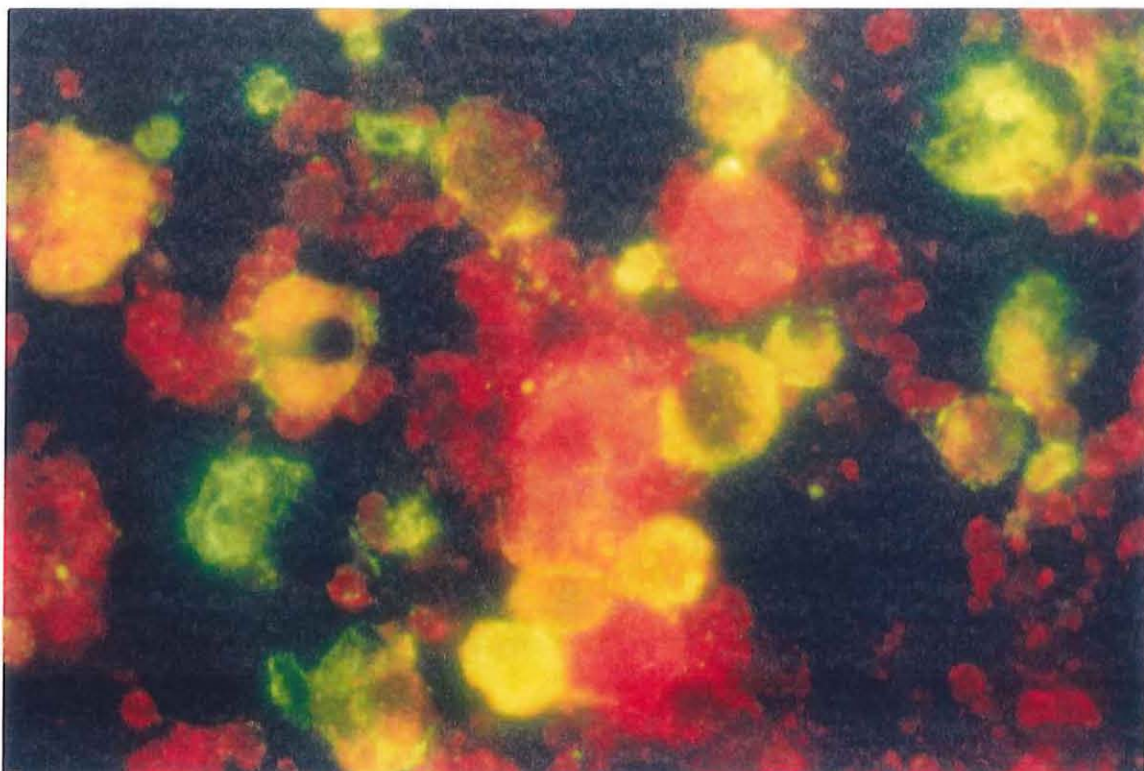
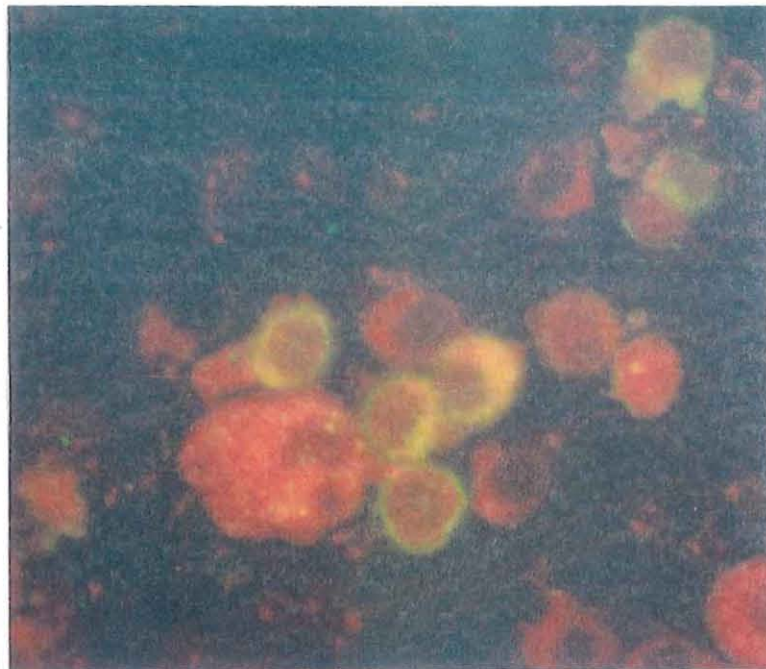
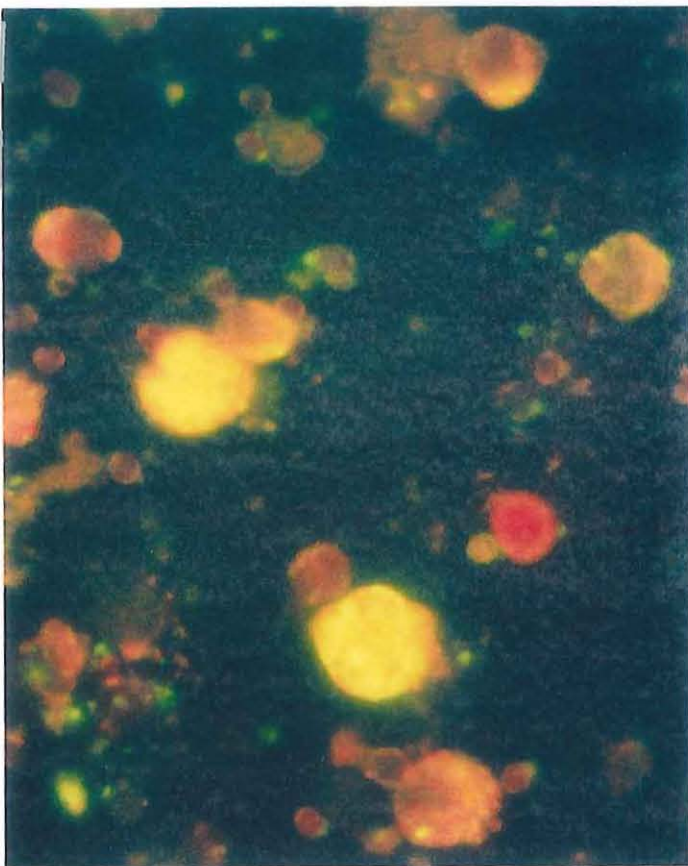


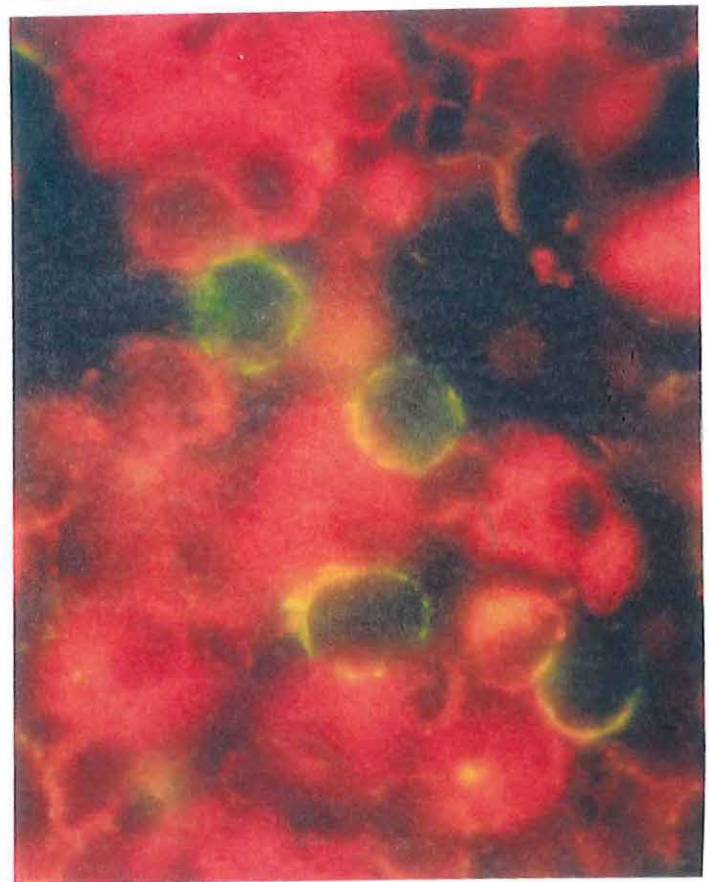
Photo n°4 : Hémocytes cytocentrifugés non fixés marqués par Wheat germ couplé à la FITC utilisé à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\times 1000$).



5



6



7

Photo n°5 : Marquage périphérique et intracellulaire d'hémocytes en suspension obtenu avec Wheat germ couplé à la FITC (x1000).

Photo n°6 : Hémocytes vivants et en suspension marqués par la Concanavalline A couplée à la FITC utilisée à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (x1000).

Photo n°7 : Hémocytes vivants et en suspension marqués par Ricinus communis couplé à la FITC utilisé à 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (x1000).

La Concanavoline A, donne des profils de marquages différents en fonction des expériences réalisées.

La photo n°8, nous montre une seule cellule marquée. Le même champ observé en lumière directe, est illustré par la photo n°9. Sur cette photo, nous pouvons voir que la cellule marquée est un agranulocyte, et que toutes celles qui ne sont pas marquées sont des granulocytes (leurs granulations brunes intracellulaires sont caractéristiques).

Par contre, la photo n°10, permet d'observer un marquage intracellulaire ténu de quelques cellules. Ce champ d'observation observé en lumière directe (photo n°11) nous permet d'observer que les cellules présentant un marquage intracytoplasmique sont des granulocytes.

Ces résultats obtenus sur cellules vivantes et en suspension peuvent correspondre à des particules phagocytées et mettent ainsi en évidence le rôle de digestion et de transport de substances nutritives suspecté chez ce type hémocytaire.

Ces résultats sont intéressants car ils semblent permettre de discriminer, avec l'utilisation de ces trois lectines, des populations et/ou sous-populations hémocytaires sur la base de leur profil de marquage différent.

Renwrantz *et al.*, 1985 et Pipe *et al.*, 1997 constatèrent aussi que la détection des oses ou polyosides reconnus par la Concanavoline A montrait différents résultats chez la moule *Mytilus edulis*.

Ces résultats devront toutefois être confirmés.

2.2. Lectines couplées à la peroxydase

Les lectines couplées à la peroxydase ont été utilisées car nous voulions localiser de façon précise le marquage. Ce marquage pourra nous permettre de préciser quel est le ou les types hémocytaires marqués, cette distinction étant plus difficile au microscope à épifluorescence.

Les lectines utilisées couplées à la peroxydase sont choisies d'après les résultats obtenus avec celles couplées à la FITC. Ce sont donc la Concanavoline A et Wheat germ. Ricinus communis n'est pas utilisé car SIGMA n'a pas pu nous le fournir à temps.

2.2.1. Profil des marquages obtenus

Lors des premiers essais des deux lectines aux concentrations définies en épifluorescence, nous avons observé que la distribution du marquage avec les lectines couplées à la peroxydase n'était pas la même qu'avec les lectines couplées à la FITC.

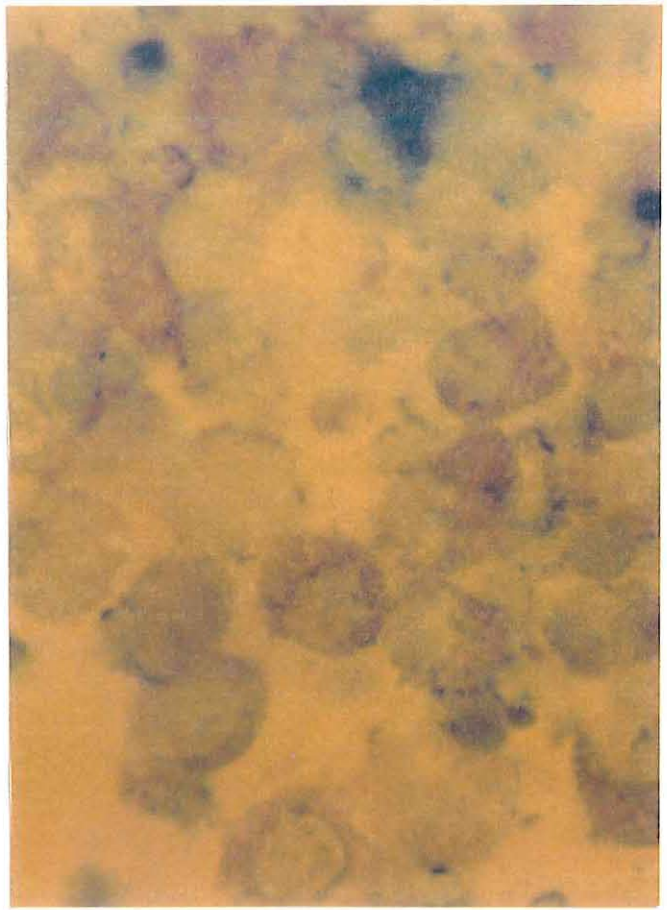
En effet, les marquages intracellulaires étaient plus nombreux et plus intenses qu'avec les lectines couplées à la FITC, ce qui avait pour conséquence de masquer les marquages périphériques membranaires seuls.

Dans un premier temps, nous avons pensé que ce marquage intracellulaire devait résulter de la perméabilisation de la membrane due au bain de méthanol + H₂O₂ réalisé lors de la préparation du marquage des hémocytes cyto-centrifugés par les lectines couplées à la peroxydase. Ce bain est nécessaire car il permet d'inactiver la peroxydase endogène des cellules.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué le marquage d'hémocytes cyto-centrifugés et non fixés par les lectines couplées à la FITC, en ajoutant un bain de

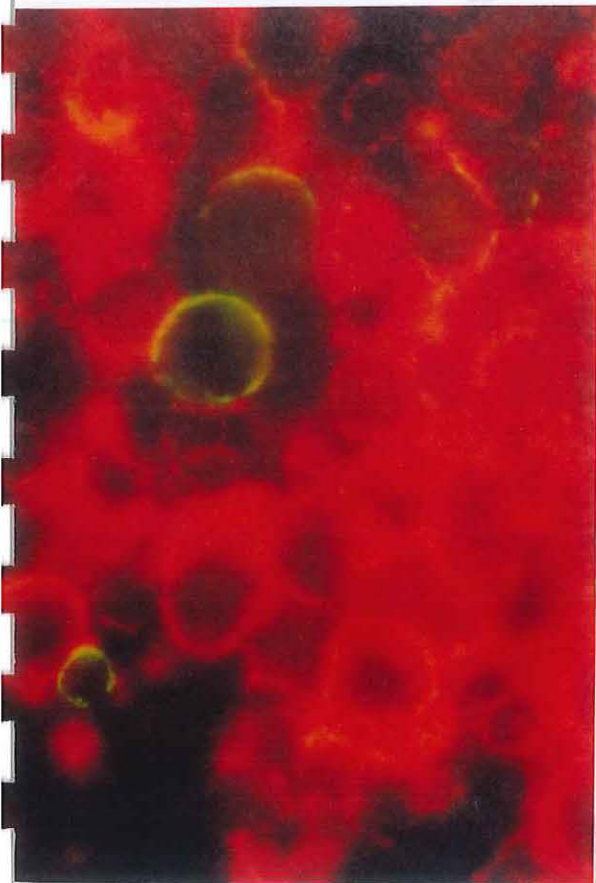


8

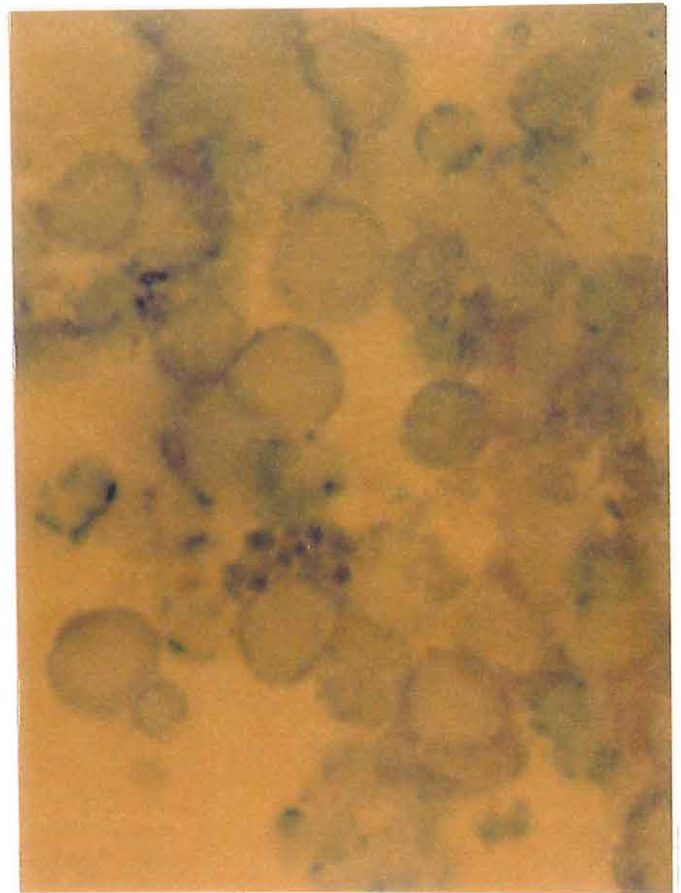


9

Photos n°8 et 9 : Agranulocyte marqué par la Concanavaline A couplée à la FITC et observé en épifluorescence (8) et en lumière directe (9) (x1000).



10



11

Photo n°10 et 11 : Agranulocytes et granulocytes marqués par la Concanavaline A couplée à la FITC et observés en épifluorescence (10) et en lumière directe (11) (x1000).

méthanol + H₂O₂ lors de la préparation des hémocytes. L'observation des lames nous a permis de constater que le marquage reste inchangé malgré cette préparation.

Nous avons ensuite émis l'hypothèse que le marquage intracellulaire pouvait être dû à une mauvaise inactivation de la peroxydase endogène des hémocytes. Cette peroxydase étant ensuite révélée par le substrat spécifique de l'enzyme couplée à la lectine : la DAB. Pour vérifier l'état d'inactivation de la peroxydase endogène, nous effectuons un témoin négatif sur lequel on ne fait pas agir les lectines. Sur la lame témoin négatif, on constate qu'aucune cellule n'a été colorée par le produit de la réaction enzymatique de la peroxydase avec le peroxyde d'hydrogène. On en conclut que le marquage intracellulaire n'est pas dû à une mauvaise inactivation de la peroxydase endogène. Ces résultats restent difficiles à interpréter.

De plus, nous avons constaté qu'en utilisant les concentrations définies lors de l'utilisation de lectines couplées à la FITC, toutes les cellules étaient marquées. En effet, en observant la photo n°13 qui correspond au marquage d'hémocytes cyto-centrifugés par la Concanavaleine A utilisée à la concentration de 1 µg/mL, on peut constater une coloration marron intense d'un grand nombre de cellules.

Nous avons diminué les concentrations jusqu'à l'obtention d'un marquage plus discriminant. Ce dernier est obtenu lorsque la Concanavaleine A est utilisée à 0.5 µg/mL. Les résultats sont montrés sur la photo n°14 sur laquelle nous pouvons observer que certaines cellules possèdent juste la coloration du noyau due au Bleu de Unna et ne sont donc pas marquées par la Concanavaleine A. Ce profil de marquage est différent de celui obtenu pour la Concanavaleine A couplée à la FITC puisqu'un grand nombre de granulocytes sont marqués de manière nette et intracellulaire. Une hypothèse pour expliquer ces résultats est que les cellules utilisées pour ces différentes expériences proviennent d'huîtres différentes. Il se pourrait que la distribution inégale des marquages corresponde à un état de différenciation et/ou d'activation distincte des huîtres utilisées.

Wheat germ utilisé à 0.1 µg/mL donne aussi un marquage discriminant qui est montré sur la photo n°15, et qui correspond à une distribution surtout intracellulaire des granulocytes.

*2.3. Marquage du parasite *Bonamia ostreae* par les lectines couplées à la FITC*

Comme la technique de marquage des hémocytes par les lectines couplées à la FITC a été optimisée en définissant les conditions d'utilisation, on décide d'étudier la composition en oses ou polyosides de la membrane du parasite *Bonamia ostreae*. Cette expérience a été effectuée à partir d'une suspension de *Bonamia ostreae* purifié. Le marquage est réalisé sur $2,2 \cdot 10^7$ parasites par lame.

Les parasites sont non fixés.

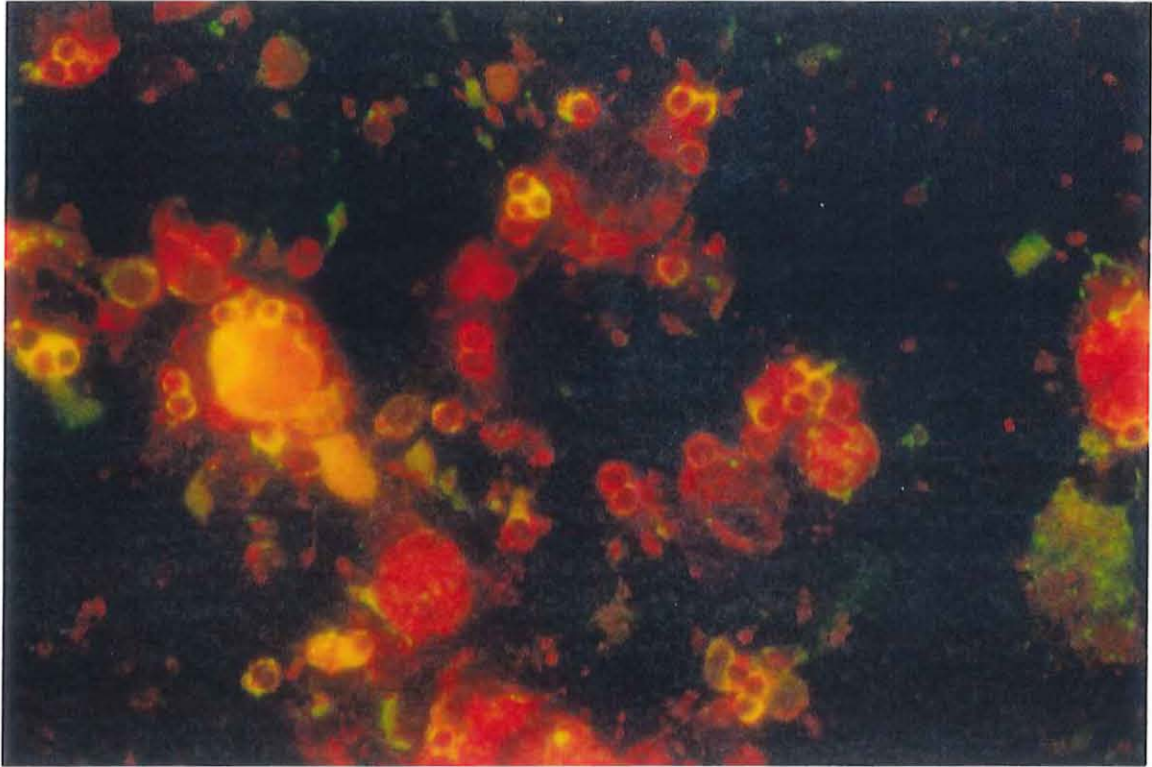
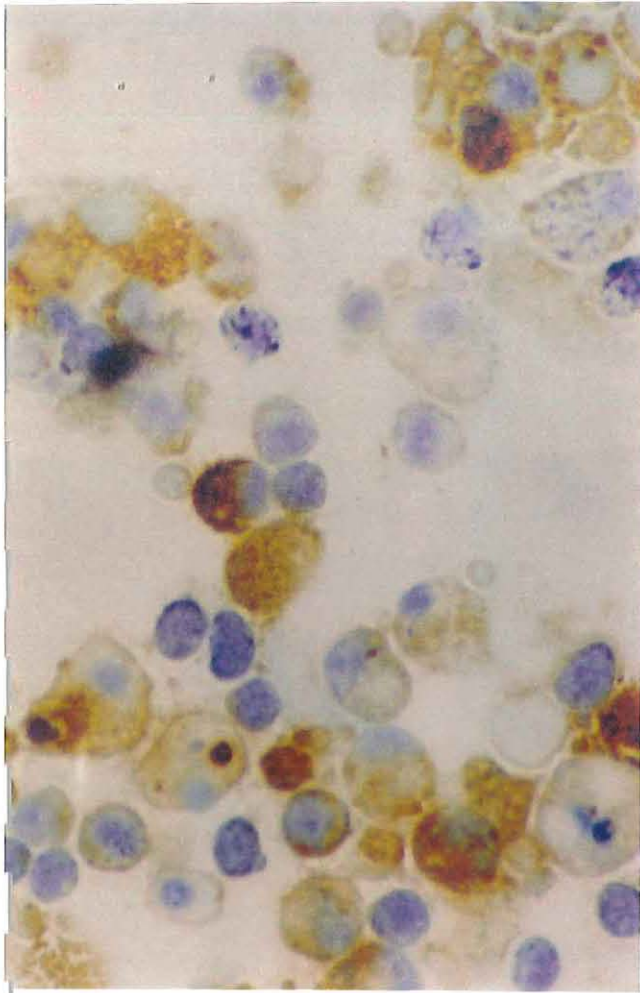
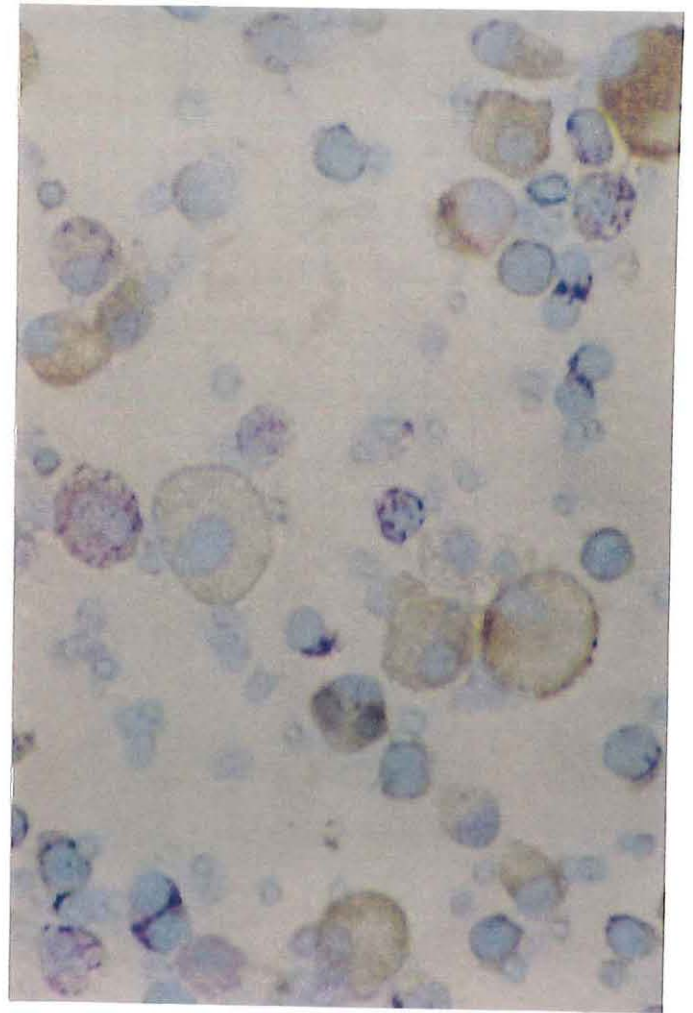


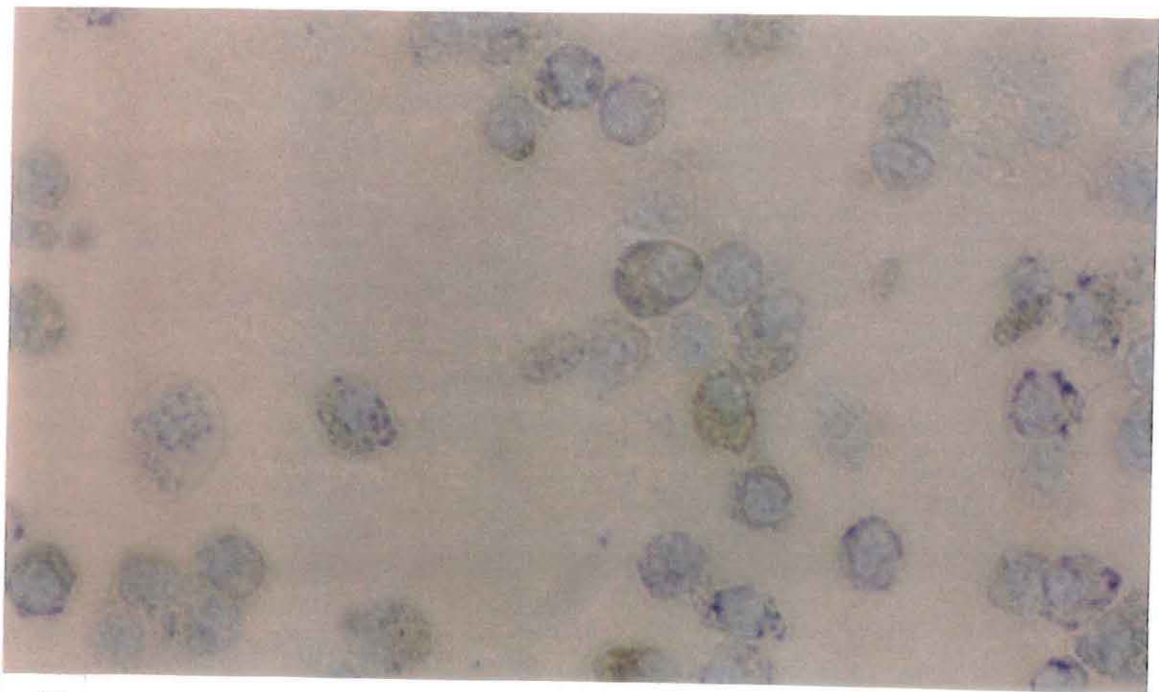
Photo n°12 : Marquage du parasite *Bonamia ostreae* cytocentrifuge, non fixe par Wheat germ couplé à la FITC utilisé à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (x1000).



13



14



15

Photo n°13 : Hémocytes cyto-centrifugés marqués par la Concanavaline A couplée à la peroxydase utilisée à 1 µg/mL (x1000).

Photo n°14 : Hémocytes cyto-centrifugés marqués par la Concanavaline A couplée à la peroxydase utilisée à 0,5 µg/mL (x1000).

Photo n°15 : Hémocytes cyto-centrifugés marqués par la Wheat germ couplée à la peroxydase utilisée à 0,1 µg/mL (x1000).

Les lectines utilisées, ainsi que les résultats du marquage sont résumés dans le tableau suivant :

Lectines	Marquage de <i>Bonamia ostreae</i>
Concanavoline A	Faible marquage périphérique de tous les parasites
Wheat germ	Marquage périphérique de quelques parasites
Ricinus communis	Pas de marquage

Tableau n°2 : Résultats des marquages de *Bonamia ostreae* par différentes lectines

La photo n°12 illustre le marquage du parasite par Wheat germ. Elle nous permet de constater que ce marquage est périphérique et que tous les parasites ne sont pas marqués.

Le fait que Wheat germ ne marque pas tous les parasites pourrait résulter d'une composition en oses de la membrane différente selon l'état de maturité de *Bonamia ostreae*.

Les résultats conférés dans le tableau impliquent la présence de résidus mannosyl, glucosyl, d'acide sialique et de (N-acétyl-glucosamine)₂ à la périphérie du parasite.

Ces résultats sont intéressants car ils montrent la présence d'oses ou polyosides à la périphérie des parasites et, par leur intermédiaire peut-être, ils pourraient jouer un rôle important dans les phénomènes de phagocytose de ce parasite par les hémocytes.

3. MARQUAGES DES HEMOCYTES AU SEIN DES TISSUS

3.1. Localisation à l'aide de lectines couplées à la FITC

- Sur coupes paraffine :

Les marquages obtenus sont très différents d'une lectine à l'autre.

En effet, avec Ricinus communis utilisé à 10 µg/mL, on observe un marquage d'hémocytes au sein du tissu conjonctif (cf. photo n°16 et 17), et au niveau des vésicules d'exocytoses des cellules à mucus. Ces résultats sur les cellules à mucus confirment que ces cellules peuvent jouer un rôle dans le système de défense primaire au niveau des épithéliums en contact avec le milieu en pouvant agglutiner des particules étrangères.

Avec Wheat germ et la Concanavoline A à 1 µg/mL, nous observons aussi un marquage des hémocytes (cf. photos n°18,19 et 20). Enfin, pour les autres lectines on observe que tous les tissus ne sont pas marqués.

Les marquages obtenus avec la Concanavoline A, Wheat germ et Ricinus communis pourraient être intéressants pour étudier la répartition des différents types cellulaires au sein des tissus de populations saines infectées mais aussi résistantes.

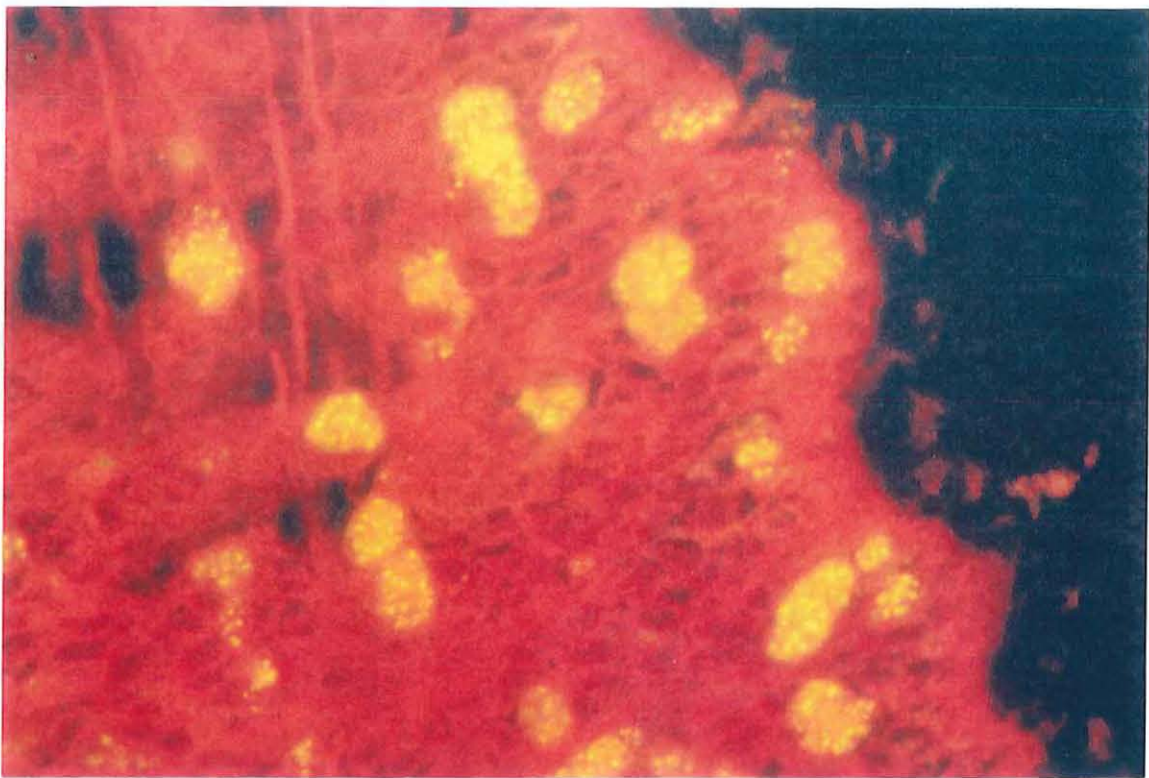


Photo n°16 : Vésicules d'exocytose de cellules à mucus marquées par Ricinus communis couplé à la FITC et utilisé à 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (x1000).

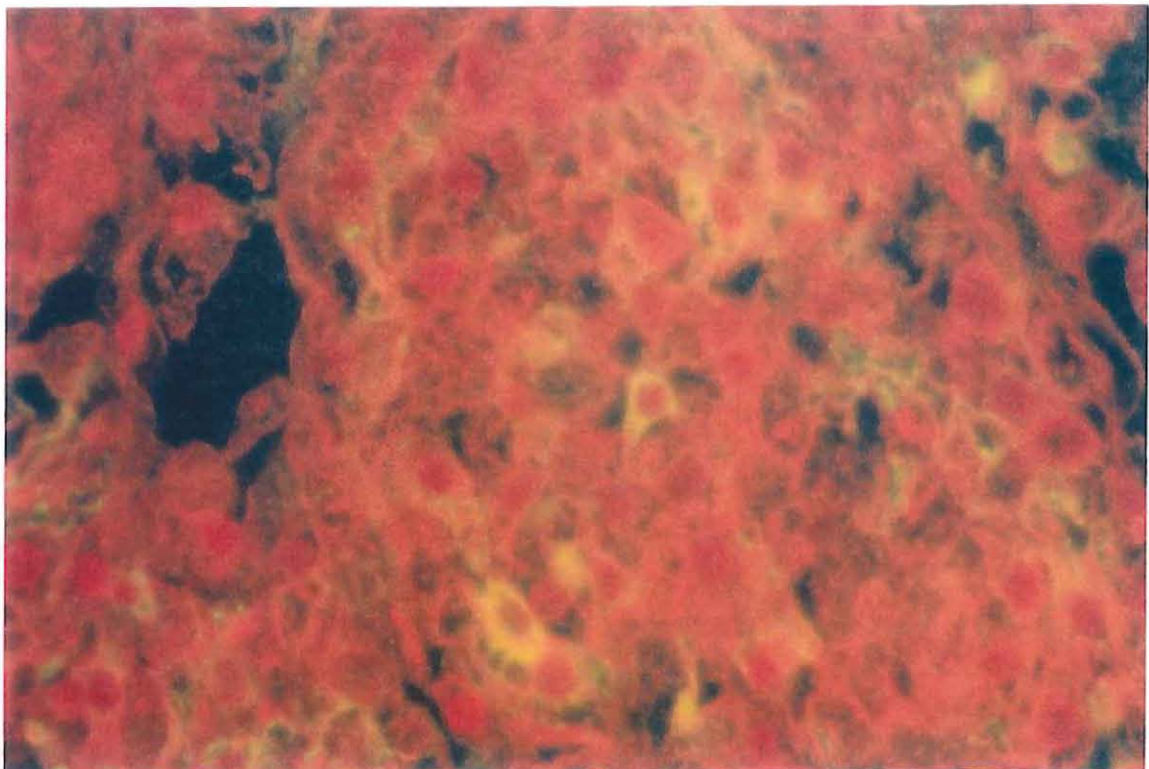
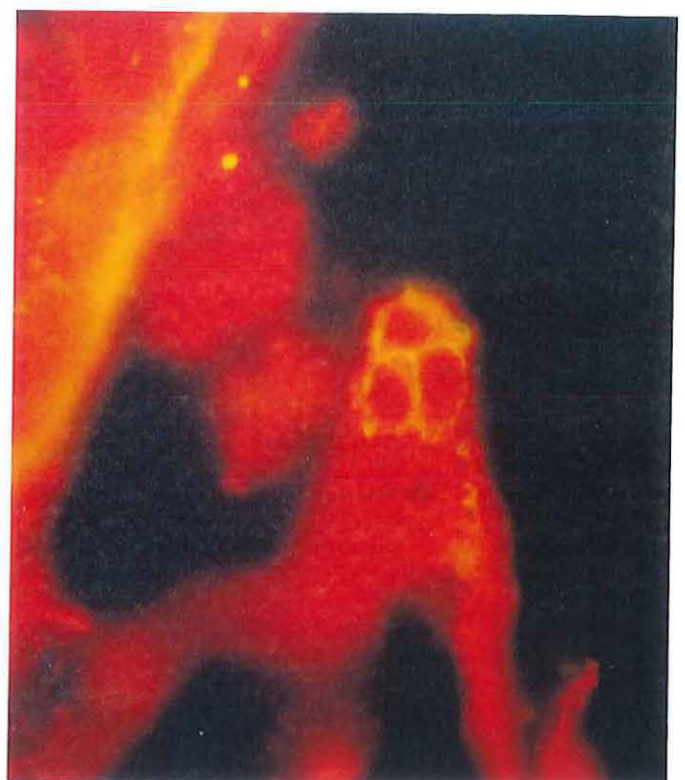


Photo n°17 : Hémocytes sur coupe paraffine marqués par Ricinus communis couplé à la FITC utilisé à 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (x1000).



18

19

Photos n°18 et 19 : Hémocytes sur coupe paraffine marqués par la Concanavoline A couplée à la FITC utilisé à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (x1000).

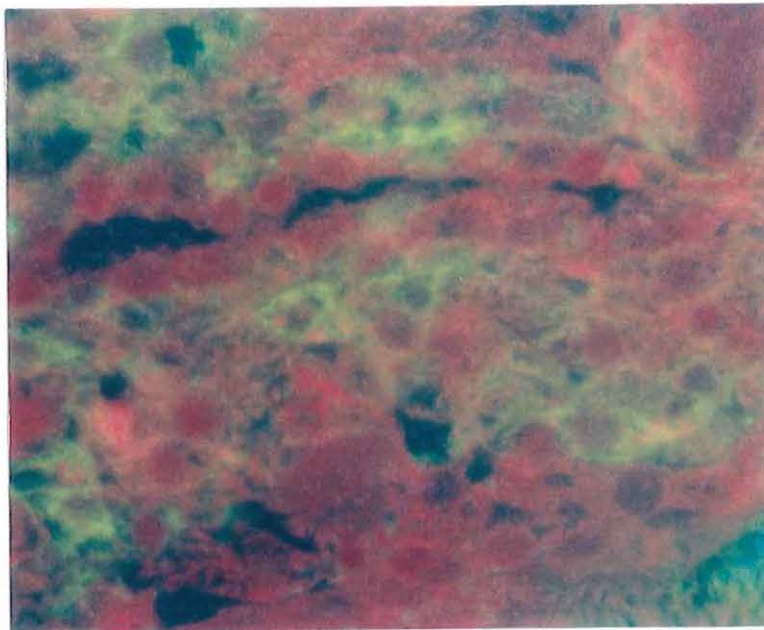


Photo n°20 : Hémocytes sur coupe paraffine marqués par la Wheat germ couplé à la FITC utilisé à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (x1000).

- Sur cryocoupes :

Suite aux résultats précédents, nous avons décidé d'effectuer ces marquages sur des cryocoupes. Les cryocoupes permettent de moins dénaturer certaines molécules car elles sont faites sur des tissus congelés non fixés et non inclus.

Les marquages obtenus nous montrent que les lectines se sont fixées à tous les niveaux de la coupe et ceci, quelle que soit la concentration en lectine utilisée.

Cette observation peut s'expliquer par le fait que les membranes de toutes les cellules contenant des glycoprotéines et des glycolipides sur leur couche externe soit plus accessible qu'en coupe paraffine. Il est donc probable que les lectines se fixent plus aisément sur ces oses liés aux lipides et protéines, ce qui pourrait expliquer le fait que l'on retrouve des lectines fixées à tous les niveaux de la coupe.

De plus, nous avons essayé de diminuer le bruit de fond en saturant la coupe par une solution de PBS 3 % SAB. La saturation ne s'effectue pas en PBS 3 % lait écrémé car il pourrait modifier les marquages par l'apport de glucose et de galactose sur les coupes.

Sur la coupe saturée, on constate que le bruit de fond est légèrement diminué par rapport à la même coupe non saturée. Cependant la diminution du bruit de fond n'est pas suffisante pour interpréter les marquages.

3.2. Localisation à l'aide de lectines couplées à la peroxydase.

Les lectines couplées à la peroxydase ont été testées sur des coupes histologiques afin de voir si la distribution du marquage est du même type que celui donné par les lectines couplées à la FITC.

Les résultats sont similaires à ceux obtenus avec les lectines couplées à la FITC.

Le rôle de défense immunitaire est joué par les hémocytes qui passent du compartiment circulatoire au compartiment tissulaire. On peut suspecter lors d'une infection que la répartition hémocytaire au niveau des tissus soit modifiée, et que des hémocytes peuvent être recrutés au niveau du site d'infection pour lutter contre le parasite.

Sminia et Van der Knapp (1987a) considèrent en effet que des changements rapides des concentrations hémocytaires dans le système circulatoire des mollusques sont le résultat d'échanges entre le compartiment tissulaire et l'hémolymphe.

Le marquage des hémocytes par les lectines sur des coupes histologiques pourrait se révéler intéressant pour savoir s'il y avait une recrudescence d'un ou de plusieurs types d'hémocytes au niveau des tissus infectés chez une huître parasitée, et si les hémocytes passent des tissus à l'hémolymphe. Cependant, il faut poursuivre le travail engagé et tenter d'améliorer la technique de marquage sur coupes par les lectines

3.3. Immunoperoxydase indirecte sur coupes paraffines à l'aide d'un anticorps anti-granulocytes

Comme avec les lectines le marquage ne nous a pas permis de localiser et de quantifier facilement les hémocytes, on utilise la technique d'immunoperoxydase indirecte

car on dispose au laboratoire d'un anticorps monoclonal qui marque spécifiquement les granulocytes. C'est cet anticorps que nous avons utilisé comme anticorps primaire pour la réaction d'immunoperoxydase indirecte sur coupe paraffine.

D'après l'observation des lames, on constate que cette technique permet de localiser quelques granulocytes au sein des tissus de l'huître, cependant, la comparaison de la localisation des hémocytes chez des huîtres infectées et chez des huîtres non infectées n'a pu être. En effet, le nombre de granulocytes observables sur une coupe de tissu d'huître saine ou parasitée est minime quelque que soit les tissus observés et nous n'avons pas pu réaliser de comptage.

4. COMPARAISON DE POPULATIONS HÉMOCYTAIRES D'HUÎTRES INFECTÉES ET NON-INFECTÉES

Afin d'étudier au niveau cellulaire les mécanismes impliqués lors d'une infection par *Bonamia ostreae* on décide d'étudier la répartition des hémocytes circulants prélevés chez des huîtres infectées et chez des huîtres non infectées, en utilisant des lectines.

Les résultats brut des comptages sont donnés en annexe 5

4.1. Comparaison de la répartition hémocytaire dans chaque population d'huîtres.

La moyenne des comptages des populations hémocytaires de chaque huître sont montré dans le tableau suivant :

	Population hémocytaire provenant d'huîtres saines	Population hémocytaire provenant d'huîtres parasitées
Pourcentage d'agranulocytes	52±18	52±15
Pourcentage de granulocytes	46±18	47±15
Pourcentage de petits hyalinocytes	1±1	1±0,7

Tableau n°3 : Pourcentage des populations cellulaires colorées avec le kit Hémacolor.

D'après ce tableau, on observe que la population hémocytaire provenant d'huîtres saines est composée de 53 % d'agranulocytes et de 46 % de granulocytes, et que celle provenant d'huîtres parasitées se compose de 53 % d'agranulocytes et de 47 % de granulocytes.

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différence de la répartition hémocytaire entre des huîtres saines et des huîtres parasitées.

De plus, l'état d'infection de l'huître ne modifie pas ces proportions.

Des comptages réalisés précédemment sur des populations hémocytaires provenant d'huîtres saines et d'huîtres parasitées avaient montré des différences.

En effet, le pourcentage de granulocytes était supérieur à celui des agranulocytes chez les huîtres saines, alors que chez les huîtres parasitées, c'était les cellules agranuleuses qui prédominaient (Cochennec, 1997).

Cette différence dans ces résultats pourrait s'expliquer par le fait que lot analysé est très infecté (prévalence d'environ 50 %) alors que les résultats décrits ci-dessus étaient rapportés chez des huîtres beaucoup moins infectées (environ 20 %).

L'absence de différence de pourcentage de chaque type cellulaire entre les populations saines et infectées pourrait être due au fort taux d'infection de ce lot. De plus, il est aussi probable que des huîtres aient pu être considérées comme saines alors qu'elles étaient en fait dans les tous premiers stades de l'infection par *Bonamia ostreae*.

4.2. Type cellulaire parasité

D'après les comptages établis à partir des observations des populations hématocytaires, on constate que 12 % des agranulocytes et 1,6% des granulocytes sont parasités. Ces résultats confirment la phagocytose du parasite par les deux types cellulaires. Cependant, les cellules agranuleuses sont les plus parasitées. Hine et Wesnay (1994b) ont décrit des résultats semblables chez l'huître *Triostrea chilensis* infectée par *Bonamia sp.*

Pour expliquer cette différence d'infection des deux types cellulaires, l'hypothèse suivante a été émise : les granulocytes seraient capables de détruire le parasite *Bonamia ostreae* après la phagocytose, alors qu'il se développe à l'intérieur des cellules agranuleuses.

Cette hypothèse a été supportée par l'obtention de résultats expérimentaux qui ont montré que les granulocytes ont une activité enzymatique plus importante que les agranulocytes et que leur proportion est plus importante chez des huîtres résistantes que chez des huîtres saines.

De plus, plusieurs auteurs (Cheng, 1981 ; Moore et Gelder, 1983 ; Auffret, 1986 ; Cheng 1990 ; Pie 1990b) ont montré que cette capacité des granulocytes à phagocyter était probablement liée à la présence d'un grand nombre de lysosomes contenant des enzymes hydrolytiques capables de lyser les particules phagocytées.

4.3. Etudes des populations hémyocytaires marquées par la Concanavaline A et par Wheat germ

Les résultats des différents comptages réalisés sont conférés dans le tableau suivant :

	Population d'huîtres saines			Population d'huîtres infectées		
	Pourcentage des cellules totales marquées	Pourcentage des granulocytes marqués par rapport aux granulocytes totaux	Pourcentage des agranulocytes marqués par rapport aux agranulocytes totaux	Pourcentage des cellules totales marquées	Pourcentage des granulocytes marqués par rapport aux granulocytes totaux	Pourcentage des agranulocytes marqués par rapport aux agranulocytes totaux
Concanavaline A	87 \pm 23	68 \pm 26	72 \pm 3	93 \pm 5	68 \pm 16	78 \pm 5
Wheat germ	64 \pm 22	56 \pm 18	47 \pm 10	66 \pm 11	56 \pm 17	70 \pm 16***

*** significatif au seuil de 5 %

Dans un premier temps, nous pouvons constater que la Concanavaline A marque un nombre total de cellules plus important que Wheat germ. En effet, 87 % des cellules sont marquées par la Concanavaline A, alors que seulement 64 % sont marquées par Wheat germ.

Pour la Concanavaline A, nous observons qu'il n'y a pas de différence de pourcentage de cellules marquées entre la population provenant d'huîtres saines et celle provenant d'huîtres parasitées.

Par contre, pour Wheat Germ, l'observation des marquages de chaque type cellulaire, nous permet de noter que le nombre de cellules agranuleuses marquées est plus important chez les huîtres parasitées que chez les huîtres saines.

Ces résultats nous permettent de déduire que globalement la composition en oses de la membrane cellulaire semble rester inchangée quel que soit l'état d'infection des populations d'huîtres. Ces oses semblent donc être constants au sein des différents types hémyocytaires. La lectine Wheat germ quant à elle permet, d'après ces résultats, de noter une distribution différente des sucres au niveau des hémyocytes dans les populations saines et infectées.

De plus, on constate que le marquage n'est pas discriminant d'un type cellulaire (lors de l'utilisation de lectines couplées à la peroxydase).

Nous avons montré que les oses reconnus par les deux lectines testées étaient aussi présents à la surface membranaire de *Bonamia ostreae*, et notamment ceux reconnus par Wheat germ. Il est donc probable que la phagocytose du parasite par les différents types cellulaires soit facilitée par la présence de ces sucres et peut-être par leur intermédiaire, la présence dans l'hémolymphe de lectines circulantes. Leur présence a d'ailleurs été

rapportée par de nombreux auteurs dans l'hémolymphe de différents bivalves marins (Chintala *et al.*, 1994).

Comme le nombre de cellules marquées par Wheat germ augmente lorsque l'huître est parasitée, on peut penser que la distribution du (N-acétyl-glucosamine)₂ et de l'acide sialique peut-être induite par la présence du parasite.

Le rôle opsonisant et suspecté des lectines dans le cadre de la Bonamiose devra être étudié en réalisant *in vitro* des expériences d'inhibition de ces lectines par différents sucres.

5. ETUDE DE LA CONSERVATION DE L'ULTRASTRUCTURE DES HEMOCYTES APRES LA PREPARATION POUR LES MARQUAGES

Afin de savoir si la structure des hémocytes était conservée après les différentes étapes de préparation pour réaliser des marquages, en particulier après les lavages, nous avons voulu réaliser des observations au microscope électronique à transmission.

L'observation a porté sur des hémocytes prélevées en Alsever, des hémocytes prélevées en SAAH, et des hémocytes prélevés en SAAH ayant subi les étapes de préparation des marquages par les lectines.

Les hémocytes prélevés en Alsever donneront l'ultrastructure de référence des hémocytes.

Les observations de coupes semi-fines colorées par du bleu de toluidine montre que le nombre d'hémocytes prélevés est très faible, et qu'il est « contaminé » par un nombre important de spermatozoïdes. Nous avons décidé que la suite de la préparation pour l'observation au microscope électronique à balayage ne serait pas faite.

Cependant, l'observation des coupes semi-fines nous a permis d'observer que la morphologie est la même pour les trois échantillons et que la structure membranaire ne semble pas modifiée. Le protocole utilisé pour les cellules vivantes et en suspension et la solution antiaggrégante semble donc bien adaptée pour ce type de marquage.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

CONCLUSION

Les résultats obtenus en marquant les hémocytes avec des lectines ne permettent pas de différencier les trois populations hémocytaires chez *Ostrea edulis*, définies en microscopie photonique.

Cependant, les travaux utilisant ces marqueurs seront poursuivis en cytométrie de flux. En effet, le protocole de marquage des hémocytes vivants et en suspension ayant été optimisé avec les lectines couplées à la FITC, il pourra être possible d'étudier leur distribution et leur présence chez un grand nombre d'individus.

La cytométrie de flux permettra peut-être de montrer que les lectines pourraient différencier des sous-populations hémocytaires et de remettre en question les résultats obtenus car la technique de comptage qui a été utilisée n'est pas une technique répétable, car la lecture des lames est souvent dépendante de l'opérateur. D'autre part, c'est une technique lourde à mettre en œuvre et qui limite le nombre d'échantillon analysés.

Les travaux concernant l'étude de la localisation des hémocytes au sein des tissus par le marquage de coupes à l'aide de lectines seront eux aussi poursuivis. En effet, nous avons constaté que quelques lectines permettaient de marquer des hémocytes, mais très discrètement.

Les prochains travaux auront pour but d'essayer d'optimiser les marquages, et de définir un système de quantification des hémocytes au sein des tissus afin de comparer la distribution de ces cellules dans les différents compartiments hémolymphatique ou tissu.

Enfin, d'autres travaux seront effectués pour mieux comprendre le rôle des lectines dans les mécanismes de défense d'*Ostrea edulis*. Pour cela, des études de la phagocytose du parasite *Bonamia ostreae* par les hémocytes en présence et en absence de lectine seront réalisées *in vitro* et auront pour but de montrer si ces glycoprotéines favorisent ou pas la phagocytose.



ANNEXES

COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISEES POUR LA PONCTION DE L'HEMOLYMPHE

- Composition de la solution SAAH :

- Eau distillée	150 mL
- Tris	4,84 g
- HCl 1 N	30 mL
- NaCl	4 g
- EDTA	2 g
Ajuster le pH entre 7,6 et 7,8	

- Composition de la solution d'Alsever :

- NaCl	22,3 g
- Citrate de sodium	8 g
- Glucose	20,8 g
- EDTA	3,36 g
- H ₂ O	1000 mL
Ajuster le pH entre 7 et 7,5	

COMPOSITION DES FIXATEURS

- Fixateur de Davidson :

- Eau de mer filtrée	1200 mL
- Alcool à 95°	1200 mL
- Formol	300 mL
- Glycérine	400 mL
- Acide acétique	à 10 % au moment de l'emploi

- Fixateur de Carnoy :

- Alcool absolu	6 volumes
- Chloroforme	3 volumes
- Acide acétique	1 volume

A préparer extemporanément ou à l'avance, mais dans ce cas, préserver à l'abri de la lumière.

- Liquide de Carson :

- Eau distillée	900 mL
- Formol	100 mL
- Na ₂ HPO ₄ , 2 H ₂ O	23,8 g
- NaOH	4,2 g

Ajuster le pH à 7,2-7,4

COMPOSITION DE LA SOLUTION DE DIAMINOBENZIDINE

La diaminobenzidine est un chromogène utilisé pour révéler de la peroxydase. Cette solution contient du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est le substrat de l'enzyme.

La réaction enzymatique catalysée par la peroxydase est la suivante :



La diaminobenzidine réduite est un chromogène incolore qui se colore et précipite à l'endroit de la réaction lorsqu'il est oxydé.

La composition de la solution de diaminobenzidine préparé pour la révélation de la peroxydase est la suivante :

- PBS 1X	50 mL
- H ₂ O ₂	150 µL
- DAB (3,3' diaminobenzidine)	25 mg

COMPOSITION DES SOLUTIONS NECESSAIRES A LA PREPARATION DE TISSUS POUR L'OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

La composition des solutions nécessaires à la préparation de tissus pour la microscopie électronique à transmission est la suivante :

- Glutaraldéhyde 3 % :

- Glutaraldéhyde 25 %	2,5 mL
- Cacodylate de sodium 0,4 M	5 mL
- NaCl 10 %	3,5 mL
- H ₂ O distillée	9 mL

- Tampon cacodylate :

- Cacodylate de sodium 0,4 M	10 mL
- NaCl 10 %	4 mL
- H ₂ O distillée	6 mL

Ajuster le pH à 7,4.

- Acide osmique 1 % :

- OsO ₄ 4 %	1 volume
- Cacodylate de sodium 0,4 M	1 volume
- NaCl 10 %	1 volume
- H ₂ O distillée	1 volume

Cette solution ne se garde que quelques jours. Quand l'OsO₄ 4 % vire au rose ou noircit, il faut le jeter.

- Résine Epon :

Epon 812 (g)	24,64	18,48	12,32	9,24	6,16	3,0
DDSA (g)	12,4	9,3	6,2	4,65	3,1	1,5
MNA (g)	12,4	9,3	6,2	4,65	3,1	1,5
DMP ₃₀ (g)	0,6	0,45	0,3	0,225	0,15	0,075

Le mélange à choisir dépend de la quantité de résine à préparer.

- Acétate d'uranyle 5 % (p/v) :

A mélanger avec de l'eau distillée bouillie.

Centrifuger 15 minutes à 14000 rpm avant de le mélanger volume à volume avec l'alcool 50 %. Ceci, pour éviter de déposer des agrégats sur les coupes.

- Citrate de plomb (Reynolds) :

- Citrate de plomb	0,04 g
- H ₂ O	10 mL
- NaOH 10 N	0,1 mL

Centrifuger 15 minute à 13000 rpm avant utilisation. Ceci, pour éviter de déposer des agrégats sur les coupes.

TABLEAUX DE RESULTATS DES COMPTAGES

Les résultats des comptages des hémocytes d'huîtres parasitées sont répertoriés dans le tableau suivant :

Hémacolor			Concanavaleine A						Wheat germ						Anticorps antigranulocytes		
<i>A</i>	<i>G</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>Am</i>	<i>G</i>	<i>Gm</i>	<i>P</i>	<i>Pm</i>	<i>A</i>	<i>Am</i>	<i>G</i>	<i>Gm</i>	<i>P</i>	<i>Pm</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>P</i>
77	23	0	7	57	0	35	1	0	22	39	8	30	1	0	48	52	0
46 (2)	53	1	0	33	1	66	0	0	38	31 (2)	4	25	2	0	51	49	0
74 (4)	24	2	8 (1)	58	0	34	0	0	5	54	7	33	1	0	51	49	0
59	41	0	5	67	0	28	0	0	29	43	8	20	0	0	54	46	0
48 (3)	52	0	1	41	1	51	0	0	22	31	17	30	0	0	-	-	-
42 (3)	58	0	14	53	3	30	0	0	39	28	10	23	0	0	38	62	0
57 (10)	43	0	7	47	2	44	0	0	10	47	10	33	0	0	49	51	0
51 (15°)	49 (3)	0	1	65	0	33	0	1	29 (7)	27 (7)	3	39	2	0	19	91	0
61 (4)	38	1	-	-	-	-	-	-	29	29	17	25	0	0	45 (2)	55 (1)	0
58 (10)	42	0	0	77 (12)	0	23	0	0	31	51	7	11	0	0	79	21	0
30 (4)	70 (4)	0	5	42 (9)	14	39	0	0	-	-	-	-	-	-	35 (11)	65 (4)	0

(n) : nombre de cellules parasitées

Les résultats des comptages des hémocytes d'huîtres saines sont répertoriés dans le tableau suivant :

Hémacolor			Concanavoline A						Wheat germ						Anticorps antigranulocytes		
<i>A</i>	<i>G</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>Am</i>	<i>G</i>	<i>Gm</i>	<i>P</i>	<i>Pm</i>	<i>A</i>	<i>Am</i>	<i>G</i>	<i>Gm</i>	<i>P</i>	<i>Pm</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>P</i>
14	85	1	9	4	59	28	0	0	5	5	65	25	0	0	3	97	0
74	26	0	10	52	3	32	2	1	19	38	6	34	3	0	53	47	0
62	37	1	3	47	0	49	1	0	14	38	17	31	0	0	14	86	0
41	57	1	0	46	0	54	0	0	7	61	3	29	0	0	37	63	0
35	65	0	5	67	1	27	0	0	6	54	7	33	0	0	50	50	0
64	32	4	-	-	-	-	-	-	23	43	7	27	0	0	-	-	-
58	40	2	1	51	1	47	0	0	14	31	11	44	0	0	51	49	0
60	40	0	4	58	2	36	0	0	37	22	24	17	0	0	41	55	0
63	37	0	2	66	1	31	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	37	0	6	70	0	24	0	0	50	28	3	19	0	0	52	48	0

BIBLIOGRAPHIE

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

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

CHENG, T. C., J. W. Huang, H. Karadogan, L. R. Renwranz and T. P. Yoshino. 1980. Separation of oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors. *J. Invertebr. Pathol.* **36** : 35-40.

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

CHENG, T. C. and J. C. U. Downs. 1988. Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in subpopulation of oyster, *Crassostrea virginica*, hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* **52** : 163-167.

CHENG, T. C. 1990. Effect of in vitro exposure of *Crassostrea virginica* to heavy of hemocyte viability and activity levels of lysosomal enzymes. In *Pathologie in Marine Science* (F. O. Perkins, T. C. Cheng, eds) pp.513-524. Academic Press Inc., London, New-York.

CHINTALA, M. M., S. E. Ford, W. S. Fisher and K. A. Ashton-Alcox. 1994. Oyster serum agglutinins and resistance to protozoan parasites. *J. Shellfish Res.* **13** : 115-121.

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

HINE, P. M. and B. Wesnay. 1994. The functional cytology of *Bonamia* sp. (Haplosporidia) infecting oysters *Tiostrea chilensis* : An ultracytochemical study. *Dis. Aquat. Org.* **20** : 207-217

MOORE, C.A. and S.R. Gelder, 1987. Receptor sites in hemocytes recognition. *Am. Zool.* **27** : 98A.
PIPE, R. K., S. R. Farley and J. A. Coles. 1997. The separation and characterisation of hemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.* **289** : 537-545.

RENWRANTZ, L., J. Daniels and P. D. Hansen. 1985. Lectin-binding to hemocytes of *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* **9** : 203-210.

SMINIA, T. and W. P. W. Van der Knaap, 1987a. Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev. Comp. Immunol.* **11** : 17-28.

YOSHINO, T. P., Renwrantz and T. C. Cheng. 1979. Binding and redistribution of surface membrane receptors of Concanavalin A on oysters hemocytes. *J. Exp. Zool.* **20** : 439-450