

Guénaëlle LANCELOT

Du 7 janvier au 30 juin 2002

68873

E700.LAN.E

OLR 1587

Licence professionnelle

Techniques et applications en Biologie cellulaire et moléculaire

Université Victor Ségalen Bordeaux 2

Lycée Technique Saint Louis Bordeaux

Ifremer

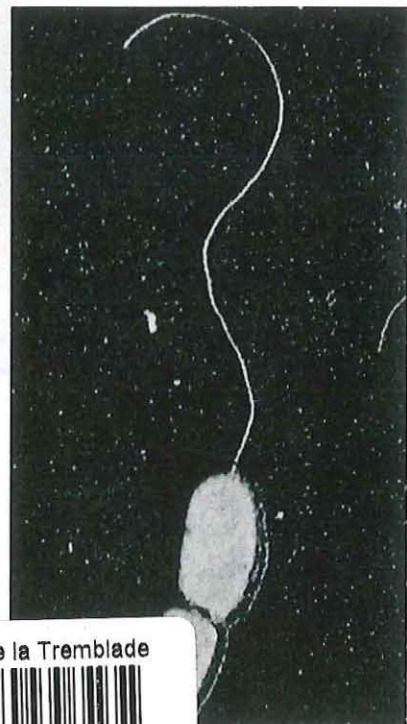
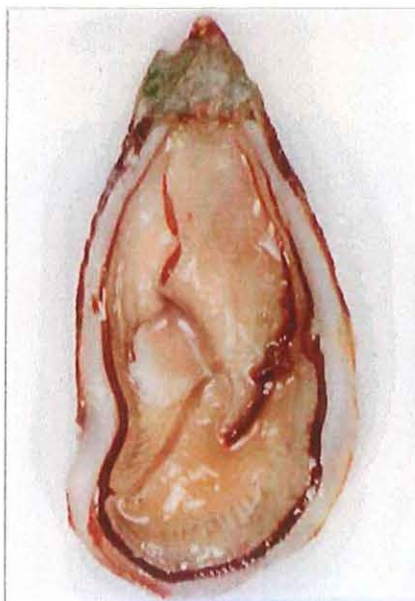
Stage encadré par Nathalie Cochenec et Frédérique Le Roux

Au laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie

IFREMER, 17390 La Tremblade

IFREMER  
BIBLIOTHEQUE  
LA TREMBLADE

# Etude des interactions entre l'huître creuse *Crassostrea* *gigas* et *Vibrio*



IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 01587

## REMERCIEMENTS

Je remercie Mr Philippe Gouletquer, de m'avoir accueillie dans la station IFREMER de La Tremblade.

Je désire remercier mes deux maîtres de stage, Nathalie Cochenec et Frédérique Le Roux, pour tout leur apport, leur patience et leur gentillesse. Elles m'ont permis d'appréhender un sujet de recherche, de m'y consacrer et de le suivre tout au long de mon stage.

Je n'oublie pas l'ensemble du personnel de la station pour leur sympathie et leur aide dans la compréhension du milieu des mollusques, qui m'était inconnu.

Sans oublier l'ensemble des stagiaires et amis qui étaient là pendant mon séjour, Saroh, Noélia, Valérie, Védrana, Mandresi, Nicola, Damien, Patrick, Nolwenn, Maeva, Stéphanie et Mélanie, ils m'ont tous beaucoup apporté que ce soit de la joie de vivre, de la détente, du travail et de la concentration. Je voudrais tout particulièrement remercier Mélanie pour sa disponibilité, et sa gentillesse malgré son propre travail.

Merci encore à tous pour cette agréable expérience professionnelle et personnelle.

# SOMMAIRE

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>5-7</b>
<b><u>1- Système immunitaire des huîtres</u></b>	<b>5-6</b>
<b><u>2- Les bactéries pathogènes du genre <i>Vibrio</i></u></b>	<b>6-7</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>8-15</b>
<b><u>I-Animaux</u></b>	<b>8</b>
<b>1a- Les huîtres</b>	<b>8</b>
<b>1b- Les palourdes</b>	<b>8</b>
<b><u>II-Les bactéries</u></b>	<b>8</b>
<b><u>III-Infection expérimentale</u></b>	<b>9</b>
<b><u>IV-Etude <i>ex vivo</i></u></b>	<b>9-15</b>
<b>IVa-Le cytomètre en flux</b>	<b>9-10</b>
<i>Principe</i>	<i>10-11</i>
<i>Acquisition et analyse</i>	<i>11</i>
<b>IVb- Méthodes</b>	<b>11</b>
<i>Prélèvement</i>	<i>11</i>
<i>Préparation hémostatique</i>	<i>11</i>
<b>IVc- Etude en cytométrie en flux</b>	<b>11-13</b>
<i>Préparation des hémocytes</i>	<i>11</i>
<i>Etude de la mortalité</i>	<i>11</i>
<i>Etude de la morbidité</i>	<i>12</i>
<i>La phagocytose</i>	<i>12</i>
<i>Les activités enzymatiques</i>	<i>12-13</i>
<b><u>V-Biochimie</u></b>	<b>13-15</b>
<b>Va- Préparation des échantillons</b>	<b>13</b>
<b>Vb- Séparation des protéines sur gel</b>	<b>14</b>
<b>Vc- Coloration</b>	<b>14-15</b>
<i>Coloration à l'argent</i>	<i>14</i>
<i>Zymographie</i>	<i>14</i>
<i>Observation</i>	<i>15</i>

<b><u>VI-Biologie moléculaire</u></b>	<b>15</b>
<b>VIa- Recherche de séquences</b>	<b>15</b>
<b>VIb- Alignement des séquences</b>	<b>15</b>
<b>VIc- Sélection d'oligonucléotides dégénérés</b>	<b>15</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>16-21</b>
<b><u>I- Etude des mortalités hématocytaires</u></b>	<b>16</b>
<b>1a- Effet des souches en groupe sur la mortalité des hématocytes</b>	<b>16</b>
<b>1b- Effet des souches individualisées sur la mortalité des hématocytes</b>	<b>16</b>
<b>1c- Recherche d'une activité toxique des surnageants de culture</b>	<b>17</b>
<b><u>II- Etude de la morbidité</u></b>	<b>17</b>
<b><u>III- Etude de la phagocytose</u></b>	<b>18-19</b>
<b><u>IV- Etude des activités enzymatiques post-phagocytaires</u></b>	<b>19-20</b>
<b>IVa- Activité estérase</b>	<b>19</b>
<b>IVb- Flambée oxydative</b>	<b>19-20</b>
<b><u>V- Analyse de la reproductibilité des expériences</u></b>	<b>20</b>
<b><u>VI- Recherche d'activité métalloprotéase des surnageants de culture bactérienne</u></b>	<b>20-21</b>
<b><u>VII- Recherche d'activité toxique des surnageants <i>in vivo</i></u></b>	<b>21</b>
<b><u>VIII- Recherche de séquences d'amorces dégénérées pour l'amplification par PCR de fragments de gènes codant pour des facteurs de virulence.</u></b>	<b>21</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>22-24</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>25</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>25-28</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>29-35</b>

## TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : les différents types hémocytaires (cyto centrifugation et coloration éosine/hémalun)

Figure 2 : Observation d'une bactérie du genre *Vibrio*

Figure 3 : Récapitulatif des différents paramètres regroupés dans les mortalités anormales de *C. gigas*

Figure 4 : Principe du cytomètre en flux

Figure 5 : Structure de l'huître creuse

Figure 6 : Rappel du protocole d'étude de la mortalité

Figure 7 : Rappel du protocole d'étude de la morbidité

Figure 8 : Rappel du protocole d'étude de la phagocytose

Figure 9 : Rappel du protocole d'étude des activités enzymatiques post-phagocytaires

Figure 10 : Recherche d'activité métalloprotéase des surnageants de culture bactérienne

Figure 11 : Recherche qualitative de métalloprotéases bactériennes : Bilan des résultats

Figure 12 : Analyse de la production de protéases par les bactéries dans différents milieux : eau de mer filtrée, hémolymphe, hémolymphe + hémocytes

Figure 13 : Alignement des séquences protéiques de métalloprotéases

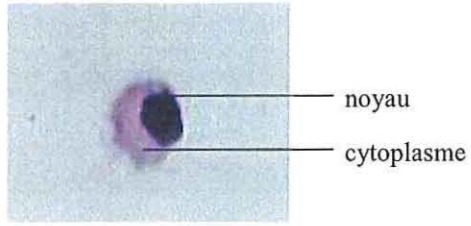
Figure 14 : Alignement des séquences protéiques de lécithinases

Figure 15 : Séquences d'oligonucléotides obtenues après alignement

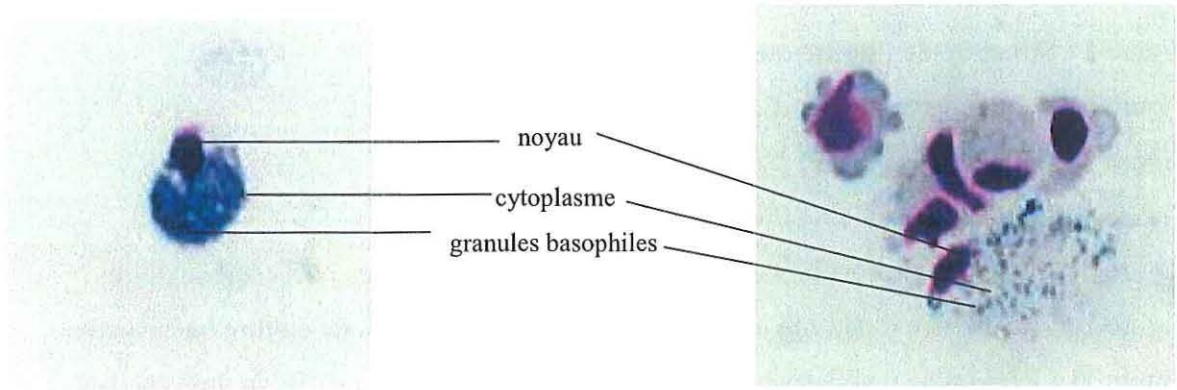
Tableau 1 : Identification des groupes formés

Tableau 2 : Récapitulatif des actions des groupes sélectionnés en infection expérimentale

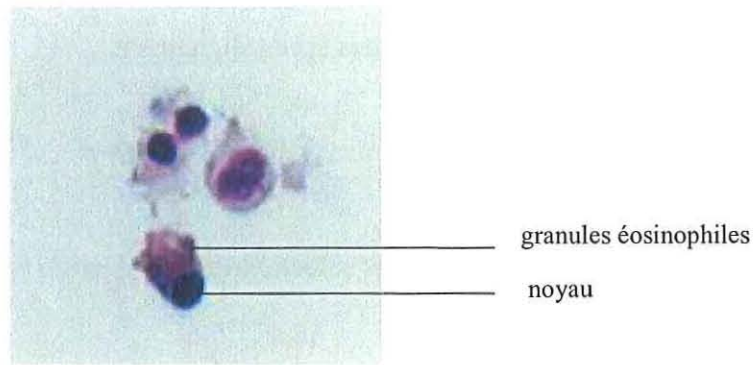
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des signaux



a : Hémocyte agranuleux (x 1000)



b : Hémocytes granuleux avec la présence de granules basophiles (x 1000)



c : hémocyte granuleux présentant des granules éosinophiles (x 1000)

Figure 1 : Les différents types hémocytaires (cyto centrifugation et coloration éosine/hémalun)

# INTRODUCTION

## 1- Système immunitaire des huîtres

Le système de défense immunitaire de l'huître creuse est principalement basé sur des mécanismes de défenses cellulaires et lymphatiques non spécifiques. Une des caractéristiques de ces mécanismes est l'absence de lymphocytes T et B, cellules clés de la mémoire cellulaire et de la production d'anticorps. La vaccination de ces animaux est donc impossible.

Les cellules du système immunitaire des huîtres ou **hémocytes** ont encore aujourd'hui une classification très controversée. La description des différents types cellulaires basée sur les différences de taille, de densité, et d'affinité tinctoriale, permet de distinguer deux grands types de cellules :

- Les cellules agranuleuses, aussi appelées **hyalinocytes** qui présentent un rapport nucléocytoplasmique faible avec un cytoplasme homogène (Figure 1a)
- les cellules granuleuses, ou **granulocytes**, qui contiennent des granules basophiles et éosinophiles en nombre et de formes variables dans le cytoplasme (Figures 1b, c).

Outre leur rôle dans les mécanismes de défense, les hémocytes sont impliqués dans de nombreuses fonctions, comme par exemple la réparation de la coquille par le transport du calcium, la digestion des nutriments ainsi que la cicatrisation des blessures. [1]

En ce qui concerne la **réponse immune cellulaire**, deux mécanismes d'action des hémocytes, en fonction de la taille des particules exogènes ont été mis en évidence :

\*En présence de particules de grande taille, on observe un phénomène d'**agglutination** hémocytaire autour de l'intrus.

\*Les petites particules sont phagocytées. La **phagocytose** consiste en l'internalisation des particules dans des vacuoles cytoplasmiques où elles sont détruites par différentes actions chimiques et enzymatiques [2 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7]. Ce mécanisme peut se résumer en trois étapes :

### 1- Adhérence et chimiotactisme

La cellule phagocytaire et la particule s'attirent. L'attraction est suivie par une phase d'adhérence, la particule se fixe à la surface de la cellule [8 ; 9].

### 2- L'internalisation

La membrane de la cellule s'invagine autour de la particule. Il y a formation de pseudopodes ou prolongements cytoplasmiques qui englobent la particule. Cela forme une

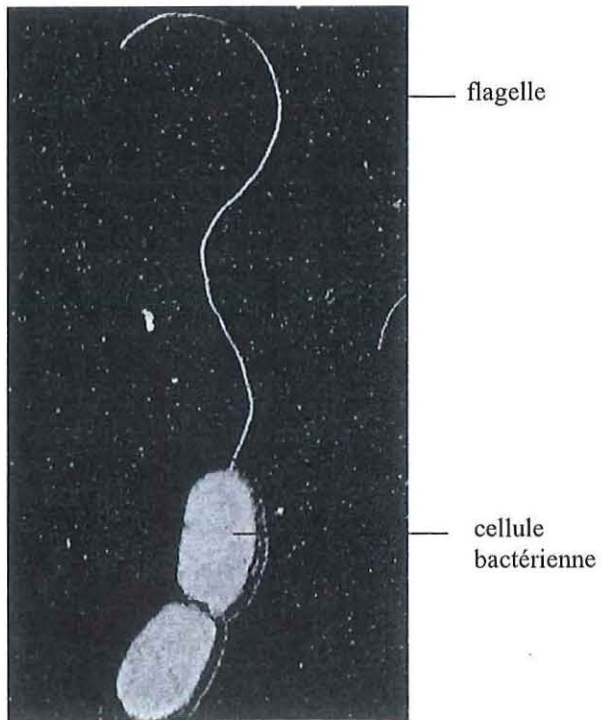


Figure 2 : Observation d'une bactérie du genre *Vibrio*



vacuole cytoplasmique ou phagosome primaire qui fusionne avec des lysosomes présents dans le cytoplasme pour former un phagolysosome. La particule est ensuite détruite par les phénomènes post-phagocytaires.[10]

### 3- Les phénomènes post-phagocytaires

On distingue deux voies principales : une voie oxygène indépendante, basée sur le relargage d'enzymes lysosomiales dans le phagolysosome telles que des estérases, aminopeptidases, cathepsine,  $\beta$  glucuronidase, galactosidase ou peroxydases. [11 ; 12 ; 13 ; 14] ; une seconde voie est dite oxygène dépendante, ou flambée oxydative. Il y a alors production de radicaux toxiques comme le peroxyde d'hydrogène, les ions chlorides, les anions superoxydes et l'oxygène monoatomique.

Enfin, récemment l'induction de l'expression d'un inhibiteur de métalloprotéases, TIMP, a été mise en évidence suite à des infections bactériennes. Cette protéine pourrait altérer certains mécanismes de virulence, via une inhibition des métalloprotéases bactériennes.

Un autre type de défense qualifié par certains auteurs de **réponse « humorale »** repose sur le relargage dans l'hémolymphe d'enzymes lysosomiales, de peptides antimicrobiens possédant une activité bactéricide et d'agglutinines bactéricides [12 ; 15 ; 16 ; 17].

## 2- Les bactéries pathogènes du genre *Vibrio*

Les bactéries du genre *Vibrio*, sont des bacilles gram négatif. Ces bactéries en bâtonnets rectilignes ou incurvés ont une largeur de 0.5 à 0.8  $\mu\text{m}$  et une longueur de 1.4 et 2.6  $\mu\text{m}$ . Ces bactéries sont mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (Figure 2). Anaérobie facultative, ces bactéries ont à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif. La température optimale de croissance est variable mais le plus souvent de l'ordre de 20°C. Leur croissance est stimulée par la présence d'ions sodiums. Cette présence est même nécessaire pour certaines d'entre elles. La classification des différentes espèces peut se faire à l'aide de clés dichotomiques d'interprétation de tests biochimiques proposé par Alsina et Blanch en 1994. [18]

Depuis 1991, des épisodes récurrents de **mortalités anormales** d'huîtres creuses sévissent en périodes estivales. Ces mortalités peuvent atteindre 100% et inquiètent les ostréiculteurs qui craignent qu'une nouvelle épizootie ne détruise à nouveau leur cheptel.

**MORTALITES ANORMALES CHEZ CRASSOSTREA GIGAS**

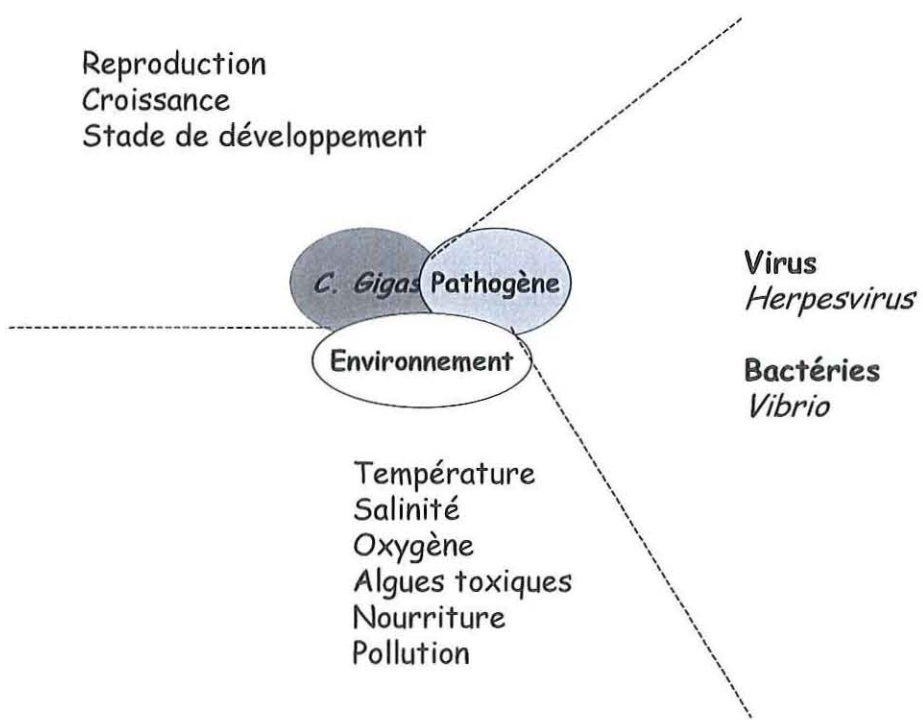


Figure 3 : Récapitulatif des différents paramètres impliqués dans les mortalités anormales de *C. gigas*

Ce phénomène appelé « mortalité estivale » présenterait une origine **multifactorielle** faisant intervenir des paramètres d'hôte (génétique et physiologique), environnementaux (température, effet sites) et probablement l'intervention d'agent infectieux (Figure 3).

Dans un certain nombre d'épisodes de mortalité estivale (30%) le virus herpétique de l'huître OHV a été détecté. Si la pathogénicité de ce virus a été démontrée sur larve, elle fait encore l'objet d'étude sur le naissain.

Plusieurs observations ont conduit l'équipe de pathologie de l'Ifremer La Tremblade à caractériser la flore vibrionaceae isolée de naissain de *C. gigas* subissant des épisodes de mortalités estivales : l'émergence de nouvelles vibrioses associées à des mortalités de mollusques en France ; la description de deux souches de *Vibrio splendidus* potentiellement pathogènes de naissain de *C. gigas* ; l'observation très récente d'une quantité anormale de flore vibrionaceae très diversifiée dans l'hémolymphe d'animaux voisins de naissains moribonds lors des mortalités estivales.

Environ 180 souches de *Vibrio* ont été isolées de naissain de *C. gigas* subissant des mortalités estivales en 2001. Ces souches sont caractérisées à deux niveaux : au niveau **taxonomique** par des approches de phénotypage et génotypage et au niveau **virulence** *in vivo* (infection expérimentale) et *ex vivo* (interaction cellules d'huître et bactéries).

Une meilleure compréhension des trois compartiments modulateurs (le pathogène, l'hôte et l'environnement) du syndrome des mortalités estivales devrait permettre une meilleure gestion du risque par le contrôle de la virulence des pathogènes et la fragilisation de l'hôte. [19 ; 20 ; 21]

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude des relations entre les *Vibrio* et les hémocytes d'huître. Plusieurs approches *in vivo*, *ex vivo* et biochimique nous ont permis de caractériser cette interaction.

Tableau 1 : Identification des groupes formés

Pool	n°	identification biochimique	Pool	n °	identification biochimique
A	1	V. mediterranei	L	45	<b>V. aesturianus V. splendidus II</b>
	2	V. mediterranei		46	<b>V. aesturianus V. splendidus II</b>
	3	V. mediterranei		47	<b>V. aesturianus V. splendidus II</b>
	4	V. mediterranei		48	<b>V. aesturianus V. splendidus II</b>
B	5	<b>V. fluvialis</b>	M	49	V. aesturianus V. splendidus II
	6	<b>V. costicola</b>		50	V. splendidus II?
	7	<b>V. mediterranei</b>		51	V. splendidus II?
	8	<b>V. splendidus II V. nigripulchritudo</b>		52	V. mediterranei
C	9	V. pelagius II V. campbellii	N	53	V. mediterranei
	10	V. pelagius II V. campbellii		54	V. mediterranei
	11	V. anguillarum-like V. aesturianus		55	V. pelagius I
	12	V. splendidus II V. nigripulchritudo		56	V. pelagius I
D	13	V. splendidus II V. nigripulchritudo	AA	107	V. splendidus II V. nigripulchritudo
	14	P. leiognathi		108	V. splendidus II V. nigripulchritudo
	15	V. splendidus II V. nigripulchritudo		109	V. fluvialis
	16	V. splendidus II		110	V. fluvialis
E	17	V. splendidus II V. nigripulchritudo	<b>S322</b>		<b>Vibrio sp.</b>
	18	V. anguillarum-like V. aesturianus			
	19	V. splendidus II V. nigripulchritudo			
	20	V. fluvialis			
G	25	V. aesturianus V. splendidus II			
	26	P. leiognathi			
	27	V. splendidus/V. nereis V. anguillarum-like			
	28	V. mytili P. leiognathi			
H	29	V. splendidus II V. nigripulchritudo			
	30	<b>V. mediterranei</b>			
	31	<b>V. mediterranei</b>			
	32	<b>V. mediterranei</b>			
I	33	<b>V. mediterranei</b>			
	34	V. mediterranei			
	35	V. splendidus I/II			
	36	V. splendidus I/II			
J	37	V. mediterranei			
	38	V. splendidus I V. anguillarum-like			
	39	V. pelagius II V. campbellii			
	40	V. pelagius II V. campbellii			

Tableau 2 : Récapitulatif des actions des groupes sélectionnés en infection expérimentale

Groupe	B	H	L
<i>Mortalité sur Palourdes</i>	> 60%	> 60%	> 60%
<i>Mortalité sur Huitres</i>	30 % à 70%	> 50%	10% à 40%

## MATERIELS ET METHODES

### I-Animaux

#### 1a-Les huîtres

Les huîtres *Crassostrea gigas* de 2 à 9 cm, âgée de 18 à 24 mois, provenant d'un captage naturel de Fouras sont fournies par Mr. Giraudeau (Fouras).

#### 1b-Les palourdes

Les palourdes, *Ruditapes Philippinarum*, sont fournies par la SatMar de Saint Just Luzac (France). Elles mesurent entre 3 et 5 cm.

### II-Les bactéries

Environ 180 souches de *Vibrio* ont été isolées de naissain de *C. gigas* subissant des mortalités estivales en 2001. L'ensemble de ces souches a ensuite été testé en pathologie expérimentale par injection sur huître creuse et sur palourde, afin de sélectionner les bactéries pathogènes. Au vu du grand nombre de souches, elles sont regroupées par quatre provenant d'un même lot de mortalité. A partir des résultats obtenus, trois groupes de souches pathogènes ont été sélectionnés : B (souches 5, 6, 7, 8), H (30, 31, 32, 33) et L (45, 46, 47, 48) selon leur action sur les huîtres et les palourdes (Tableaux 1 et 2) [22].

La souche *vibrio* S 322, a été isolée de larves de *C. gigas* par J.L. Nicolas à Brest. Cette souche ne semble pas pathogène du naissain d'huître creuse. Par contre un effet sur la mortalité des hémocytes d'huîtres creuses a été démontré : cette souche est donc utilisée comme témoin dans nos expériences.

Les souches bactériennes sont cultivées individuellement pendant 24 heures dans du Zobell liquide à 20°C (Annexe 1). La densité optique des cultures est mesurée à 540 nm afin de déterminer la concentration bactérienne (DO = 1 correspond à 10<sup>9</sup> bactéries/ml). Une quantité similaire de bactérie de chaque souche est mélangée et centrifugée 30 minutes à 3500 tr/min. Selon les cas le culot bactérien est repris par de l'eau de mer artificielle, de l'hémolymphe ou de l'hémolymphe dépourvu d'hémocytes filtrée (0.22 µm) pour une concentration finale de 10<sup>8</sup> CFU/ml.

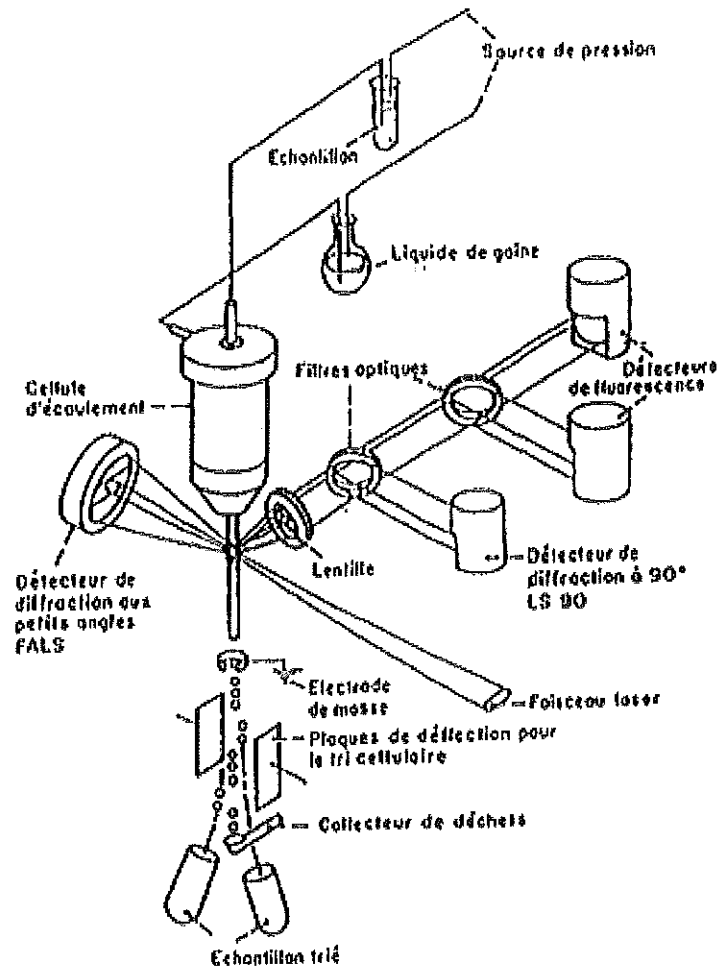


Figure 4 : Principe du cytomètre en flux

### **III-Infection expérimentale**

Les bactéries sont incubées dans de l'hémolymphe dépourvu d'hémocytes à la concentration de  $10^8$  bactéries/ml à 20°C pendant 20 heures. La culture est centrifugée à 10 000 rpm pendant 15 minutes, le surnageant est filtré à 0.22  $\mu$ m et stocké à -20°C.

La semaine précédant l'expérimentation les animaux sont acclimatés aux conditions de laboratoire : la température de l'eau est progressivement augmentée jusqu'à 18-20 °C.

Pour les palourdes, l'injection d'un volume de 100  $\mu$ l se fait dans le muscle adducteur en passant l'aiguille à travers la faiblesse de la charnière. Après injection, les palourdes sont laissées à sec une nuit, puis mises en aquarium en conditions statiques à 20 °C, avec bullage, alimentation quotidienne (*Chaetoceros calcitrans*) à la densité de 30 palourdes dans 2.5 l. La mortalité est relevée tout les jours.

Les huîtres sont préalablement placées dans une solution à 50 g/l de  $MgCl_2$  supplémentée en phytoplancton pendant 3 à 4 h. Avec les valves ouvertes, l'injection d'un volume de 50  $\mu$ l se fait dans le muscle adducteur. Après injection, les huîtres sont immédiatement mises en aquarium en conditions statiques à 20 °C, avec bullage, alimentation quotidienne (*Chaetoceros calcitrans*) à la densité de 30 huîtres dans 2.5 l. La mortalité est relevée tous les jours.

Pour chaque expérience, un ou deux lots d'animaux sont injectés avec de l'eau de mer artificielle stérile ou de l'hémolymphe sans hémocytes et servent de témoin négatif.

### **IV-Etude *ex vivo***

#### **IVa-Le cytomètre en flux**

Le cytomètre en flux est un appareillage qui permet une analyse rapide, multiparamétrique, et qui nécessite peu de cellules.

##### *Principe*

La cytométrie en flux permet d'étudier des cellules ou éléments présents dans une suspension contenue dans une veine liquide où circule un flux constant (Figure 4). La veine liquide est étroite et permet ainsi une analyse individuelle de chaque cellule qui croise alors le

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des signaux

Longueur d'onde encadrées par les filtres	Fluorochromes détectés	Signaux
500-550	DiOC <sub>18</sub> (3.3'-dioctadecyloxacarboyanine) DiOC <sub>6</sub> (3.3'-dihexyloxacarboyanine iodide) FDA (diacétate de fluorescéine) DCF (dichlorofluorescéine)	FL1
550-600	PE (phycoérythrine)	FL2
600-650	IP (iodure de propidium)	FL3

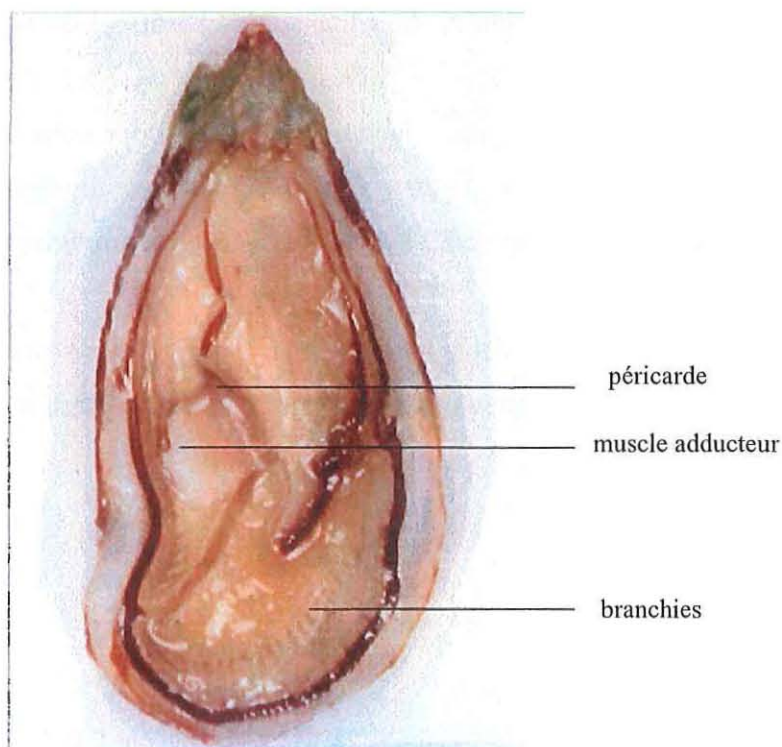


Figure 5 : Structure de l'huître creuse



faisceau lumineux, un laser. Lors du croisement de la cellule avec le laser, il y a émission de signaux optiques qui peuvent ensuite être analysés.

### *Acquisition et analyse*

Plusieurs mesures sont possibles. Lors du passage de la cellule au niveau du laser Argon, excité à 188 nm, chaque élément provoque :

- Une diffraction du faisceau ou déviation au petit angle qui est fonction de la taille de la cellule (FS) ;
- Une réfraction due à la déviation du rayon dans le cytoplasme de la cellule, aussi appelée déviation au grand angle, fonction de la complexité cytoplasmique de celle-ci (SS).

Des fluorescences peuvent aussi être mesurées. Parmi celles-ci on note l'auto fluorescence d'éléments cellulaires, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'organites et les fluorescences liées à l'utilisation de marqueurs spécifiques d'éléments cellulaires ou des propriétés intrinsèques. Ces fluorescences peuvent être mesurées à trois niveaux de signaux : FL1, FL2 et FL3, qui correspondent à des intervalles de mesure de la longueur d'onde émise, définis par des filtres (Tableau 3).

Ces données optiques sont ensuite converties en données analogiques par un photomultiplicateur, pour être analysées au niveau informatique. [23]

## **IVb-Méthodes**

### *Prélèvement*

Le prélèvement de l'hémolymphe se fait dans la cavité péricardique, accessible après ouverture de l'huître. L'hémolymphe est prélevée à l'aide d'une seringue stérile, puis diluée dans la seringue volume à volume avec du tampon PBS 1100 mOsm (Annexe 2) (Figure 5).

### *Préparation hémocytaire*

La solution obtenue peut être analysée directement au cytomètre en flux ou déposée sur lame par cyto centrifugation pour une analyse des différentes populations cellulaires. La cyto centrifugation nous permet d'obtenir un étalement des hémocytes sur une lame histologique à l'aide d'une centrifugeuse Universal 16R (Hettich) (1 minute, 500 tr/min). La lame peut ensuite être colorée par un kit hémacolor de chez MERCK.

Les cellules sont d'abord fixées par une solution de méthanol (1 minute), puis colorées par une solution II (coloration des éléments acidophiles en rouge), et par une solution III

(coloration des éléments basophiles en bleu) (2 minutes dans chaque solution). Les préparations sont ensuite rincées à l'eau courante, passées dans deux bains de Xylène pendant 5 minutes puis sont montées à l'Eukitt. L'observation se fait au microscope photonique à l'immersion (X 100).

#### **IVc- Etude en cytométrie en flux**

Chaque étude est réalisée avec un rapport hémocytes/bactéries de 1/50, soit 200 000 hémocytes en contact avec  $10^7$  bactéries.

Chaque analyse effectuée se fait en triplicata, le témoin négatif contient toujours des hémocytes et de l'eau de mer artificielle et avant lecture, on ajoute 100  $\mu$ l de PBS 1100 mOsm pour avoir un volume d'analyse suffisant.

##### *Préparation des hémocytes*

Après ponction et analyse individuelle des populations en FS=taille/SS=complexité (contrôle qualitatif des cellules), les suspensions sont regroupées. La concentration cellulaire de ce pool est calculée en fonction du temps d'analyse et de la vitesse de flux selon la formule suivante:

$$\frac{N}{(V \times t)} \times 10000$$

avec N, le nombre d'éléments analysés, fixés ici à 10000  
V, la vitesse du flux pouvant être de 15, 30, 60  $\mu$ l/see  
t, le temps de l'analyse  
10000, coefficient pour avoir la concentration en cellules/ml.

Les cellules sont reprises par du PBS à la concentration de  $2 \cdot 10^6$  cellules/ml.

##### *Etude de la mortalité*

La mortalité cellulaire est étudiée après la mise en contact *ex vivo* des hémocytes (200 000 cellules dans 100  $\mu$ l) avec 100  $\mu$ l des bactéries ( $10^7$  dans de l'eau de mer filtrée) ou du surnageant filtré. Après 4 heures ou 18 heures de contact, à température ambiante, on ajoute 5  $\mu$ l d'Iodure de propidium, 30 minutes à l'obscurité. La lecture du marquage fluorescent peut alors se faire en FL3. La mortalité est mesurée par incorporation d'un fluorochrome à l'intérieur de la structure bi caténaire de l'ADN, l'Iodure de propidium (IP). L'ADN devient accessible lorsque la membrane est détériorée. En parallèle on peut numérer les cellules afin d'étudier un effet de lyse hémocytaire.

### *Etude de la morbidité*

La morbidité (pour certains auteurs l'apoptose) est mesurée par une différence de potentiel entre la membrane externe de la cellule et la membrane des mitochondries via un marquage fluorescent des membranes polarisées, par l'utilisation du 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide ou DiOC<sub>6</sub>.

Après 4 ou 18 heures, d'incubation bactéries/hémocytes (200µl) on ajoute 20 µl de solution de DiOC<sub>6</sub> (à une concentration finale de 0.125 µM). Après 15 à 20 minutes sur glace, l'analyse se réalise en FL1.

### *La phagocytose*

L'étude de la phagocytose permet de quantifier l'internalisation de particules étrangères marquées. En parallèle, par addition d'iodure de propidium, on peut évaluer la viabilité des hémocytes. Deux types de particules fluorescentes sont testées :

- Des billes, servant de témoin positif, marquées par un fluorochrome émettant à 505-515 nm (FluoSpheres<sup>®</sup> carboxylate modified, 1 µ) ;
- Des bactéries marquées au DiOC<sub>18</sub>. Quarante micro litres de DiOC<sub>18</sub> 3 mM sont ajoutés à 1ml de bactéries à 10<sup>8</sup> CFU/ml. Le mélange est incubé 18 heures à l'obscurité, à température ambiante. On vérifie alors le marquage en FL1. Les bactéries marquées peuvent être fixées par traitement au Formol 6 % dans l'eau de mer artificielle puis lavage à l'eau de mer filtrée.

Deux cent mille hémocytes sont incubés avec 10<sup>7</sup> particules marquées, 18 heures, à température ambiante, à l'obscurité. Le témoin négatif correspond à de l'eau de mer artificielle filtrée et le témoin positif à 10 µl d'une solution de billes (toujours à un rapport 1/50). On ajoute ensuite 5 µl d'IP par tube. Après 30 minutes à l'obscurité, on effectue une analyse simultanée en FL1 et FL 3 pour la mesure de la phagocytose et la mortalité des hémocytes respectivement.

### *Les activités enzymatiques*

Deux activités enzymatiques sont étudiées :

- La flambée oxydative

Pour cela nous utilisons le kit Cell Probe DCFH, PMA-oxydative burst. La réaction fluorescente se fait par conversion du diacétate de dichlorofluorescéine (DCFH-DA) non fluorescent en dichlorofluorescéine (DCF) fluorescent, lors de la flambée oxydative. En fait,

le kit contient un activateur de la flambée, le PMA, phorbol myristate acétate. Une fois la réaction activée, deux enzymes, la NADPH oxydase et la superoxyde dismutase produisent l'ion superoxyde  $O_2^-$  et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Une dernière enzyme, la myéloperoxydase, permet en présence de peroxyde d'hydrogène au DCFH-DA de donner le DCF fluorescent en FL1. La fluorescence émise correspond alors à la mesure de la production de peroxyde d'hydrogène et à la présence de peroxydase.

– l'estérase

Ces enzymes hydrolysent de nombreux substrats dont le FDA, diacétate de fluorescéine en un composé fluorescent qui émet en FL1. Ce signal correspond à la quantité d'estérase présente dans les cellules.

Pour chaque analyse, 25  $\mu$ l de la solution du kit sont ajoutés à un mélange hémocytes/bactéries ou hémocytes/surnageant (1/50). Les tubes sont ensuite placés à 37 °C 10 minutes, puis 10 minutes sur glace avant analyse en FL1.

## **V- Biochimie**

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide/SDS en fonction de leur taille uniquement car le SDS leur confère une charge globale négative. Après migration en gel d'acrylamide les protéines totales peuvent être directement colorées par précipitation à l'argent.

Les zymogrammes permettent de détecter l'activité protéase ou gélatinase de certaines protéines après migration en SDS-PAGE.

### **Va- Préparation des échantillons**

Les bactéries sont incubées à 20 °C pendant 30 minutes, 4, 5, 8 ou 20 heures dans de l'eau de mer filtrée, de l'hémolymphe en présence ou non d'hémocytes.

Les surnageants peuvent être traités ou non par la chaleur (95°C 30 min), de la protéinase K (55°C, 30 min, 0.1 mg/ml).

Cinq  $\mu$ l de bleu de dépôt de protéines (coloration argent + mercaptoéthanol, zymogramme – mercaptoéthanol) sont ajoutés à 15  $\mu$ l de surnageant. (Annexe 3)

Les 20 µl d'échantillons sont chauffés 2 minutes à 95°C puis placés sur glace jusqu'au dépôt dans le gel.

### **Vb-Séparation des protéines sur gel**

Les gels utilisés sont des minigels Biorad de 9 cm/9 cm, composés de deux parties : un gel de résolution coulé en premier qui une fois polymérisé (30 minutes) est surmonté du gel de concentration où se place le peigne. (Annexe 4)

La migration se fait pendant 2 heures à 80 Volt.

### **Vc- Coloration**

Après la migration les gels sont colorés soit par une coloration à l'argent, soit au bleu de Coomassie pour l'étude du gel « zymogramme ».

#### *Coloration à l'argent*

Toutes les incubations se font à température ambiante sous agitation.

Avant coloration, les gels sont placés dans un fixateur (un mélange d'éthanol 50 % et d'acide acétique 5 %) une nuit sous agitation. Le lendemain, les gels sont lavés par trois bains d'eau déionisée de 1 heure chacun, puis colorés par une solution de nitrate d'argent à 0.19 % (dans l'eau déionisée) pendant 1 heure à l'obscurité. Le nitrate d'argent qui ne s'est pas fixé sur les protéines est éliminé par un rinçage rapide à l'eau pendant quelques secondes. Le nitrate déposé est réduit en argent par une solution réductrice pendant 8 à 10 minutes. La coloration ainsi obtenue est augmentée par une solution activatrice 2 fois 1 heure puis la nuit (Annexe 5).

#### *Zymographie*

Une fois démoulés, les gels sont placés dans une solution détergente de Triton (2.5 % dans l'eau) pendant 2 heures à raison d'un changement de bain toutes les 30 minutes. Le triton est un détergeant, agent non dénaturant. Il renature les protéines dénaturées par le SDS. Cette renaturation permet la reconstruction des sites catalytiques. A la suite, le gel est incubé une nuit dans le tampon de réaction des protéases à 37°C.

Le gel est coloré par une solution de bleu de Coomassie pendant deux heures puis décoloré pendant 15 à 30 minutes. [24] (Annexe 5)

### *Observation*

Après coloration, les gels sont séchés à 80°C sous vide pendant 30 minutes. Sous cette forme, ils peuvent être photocopiés et sauvegardés. Sur les gels colorés à l'argent, les protéines sont brunes sur un fond clair, tandis que sur un gel « zymogramme » seules les bandes protéiques ayant une activité gélatinase ressortent, blanches sur un fond bleu.

## **VI-Biologie moléculaire**

### **Via-Recherche de séquences**

Cette recherche se réalise sur le site internet infobiogen (<http://www.infobiogen.fr>) permettant à partir d'un mot clé de rechercher des séquences nucléiques ou protéiques d'intérêt dans différentes banques de données tel que EMBL, GENBANK, SWISSPROT.

### **Vib-Alignement des séquences**

Les différentes séquences sont ensuite alignées par le programme ClustalW, disponible sur le même site. Les zones les plus homologues sont repérées et permettent de choisir des oligonucléotides dégénérés.

### **Vic-Sélection d'oligonucléotides dégénérés**

Les oligonucléotides dégénérés sont constitués d'un mélange des différentes possibilités de séquences au niveau des régions les plus homologues en 5' et 3' du fragment que l'on veut amplifier par PCR.

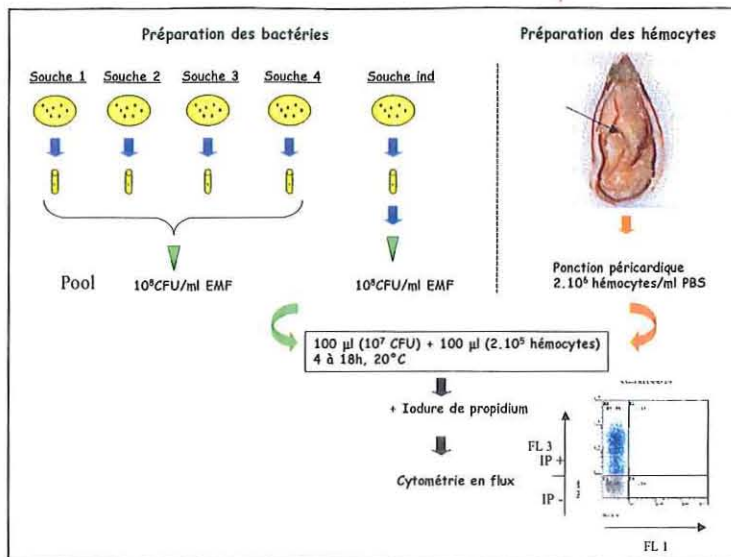
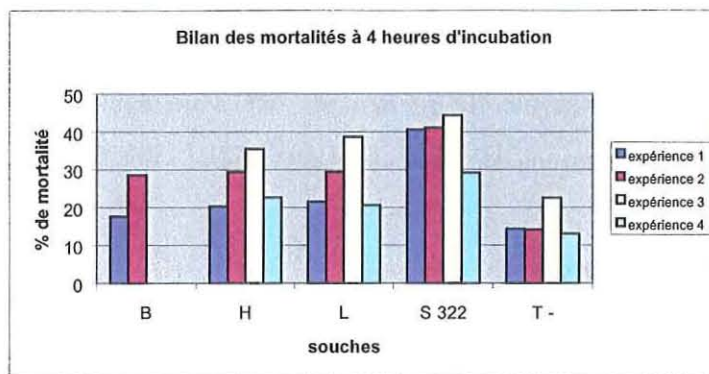
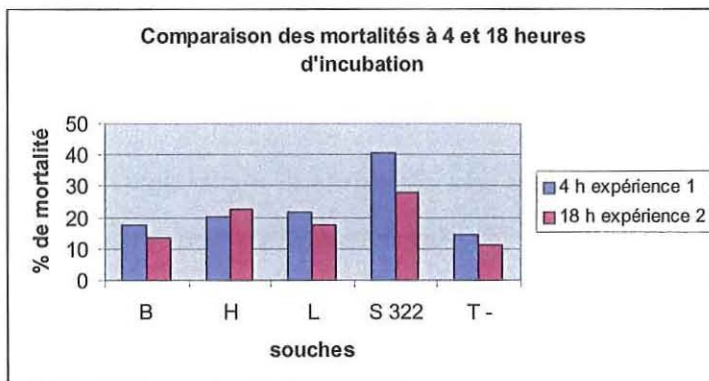


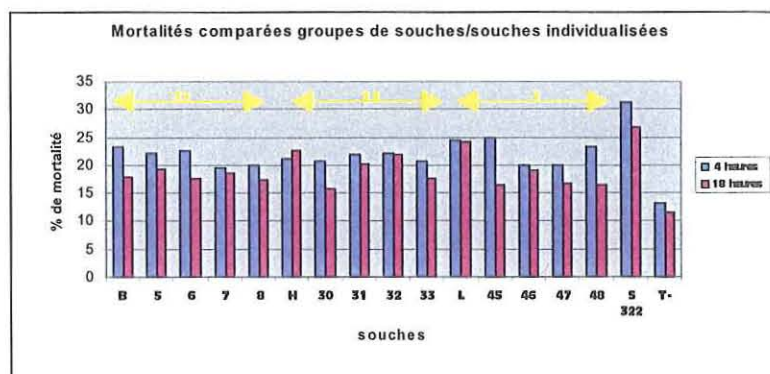
Figure 6 : Rappel du protocole d'étude de la mortalité



Graphique 1 : Effet des souches en groupes sur la mortalité des hémocytes à 4 heures



Graphique 2 : Comparaison des mortalités à 4 et 18 heures d'incubation



Graphique 3 : Mortalités comparées groupes de souches/souches individualisées

## RESULTATS

### I- Etude des mortalités hémocytaires

#### **1a- Effet des souches en groupe sur la mortalité des hémocytes**

L'effet *in vitro* de différents groupes bactériens est testé sur la mortalité des hémocytes de *Crassostrea gigas*. La mortalité correspond au pourcentage de cellules présentant un marquage à l'iodure de propidium (Figure 6).

Quatre et 18 heures après incubation, tous les groupes de bactéries entraînent une mortalité supérieure au témoin négatif. La souche S322 induit une augmentation plus importante de la mortalité des hémocytes (en moyenne 20%) que les groupes de souches B, H, L, et ceci de façon reproductible. L'effet des différents groupes est similaire avec une légère induction de mortalité (de l'ordre de 10%). On observe une petite diminution du pourcentage de mortalité à 18 heures pour la souche S 322, et les groupes B et L. Par contre dans le cas du groupe H, la taux de mortalité semble augmenter (Graphiques 1 et 2). L'analyse de la concentration hémocytaire montre une lyse importante des cellules à 18 heures et pourrait expliquer la diminution de la mortalité évaluée par le marquage des cellules à l'IP.

#### **1b- Effet des souches individualisées sur la mortalité des hémocytes**

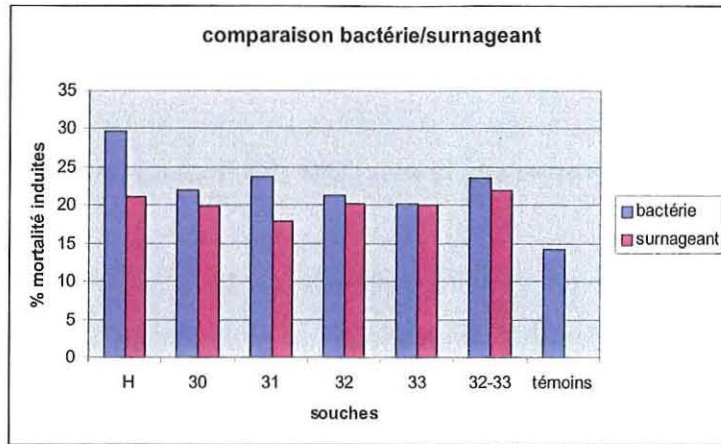
L'action de souches distinctes est analysée après 4 et 18 heures d'incubation et comparée à l'activité de la souche S322, témoin positif de notre expérience (Graphique 3).

Nous n'observons pas de différences importantes entre les mortalités induites par les groupes et leurs souches respectives. Chaque souche induit une faible mortalité hémocytaire (13 et 12 %) inférieure au témoin positif (32 et 26 %).

A 4 heures, les souches 5 et 6 entraînent une mortalité légèrement supérieure à 7 et 8 et de l'ordre de celle obtenue avec B. Cette différence n'est pas retrouvée à 18 heures. Les souches 31 et 32 entraînent une mortalité légèrement supérieure à 30 et 33 et de l'ordre de celle obtenue avec H et ce résultat s'accroît à 18 heures. Les souches 45 et 48 entraînent une mortalité légèrement supérieure à 46 et 47 et de l'ordre de celle obtenue avec L alors qu'à 18 heures, les 4 souches entraînent une mortalité nettement inférieure au groupe.

En résumé, nous observons de faibles différences entre certains groupes et certaines souches individualisées sur la mortalité des hémocytes dans cette expérience.





Graphique 4 : Comparaison des mortalités induites par les bactéries et leur surnageant respectifs

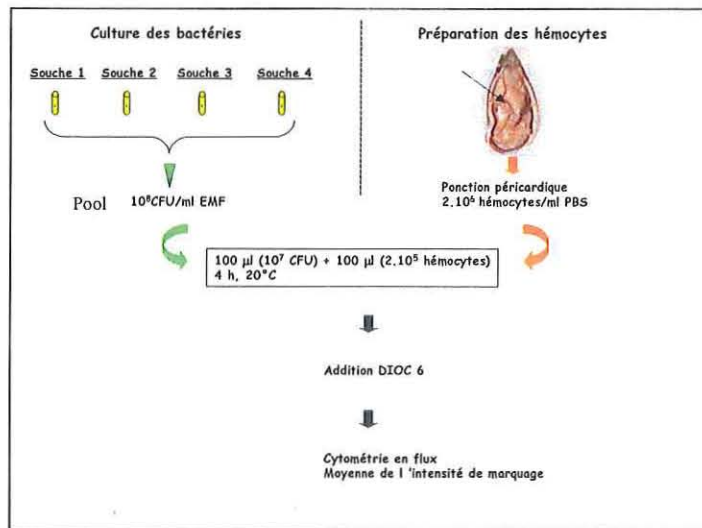
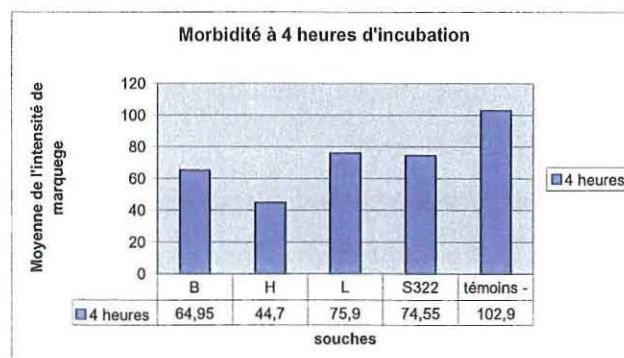


Figure 7 : Rappel du protocole d'étude de la morbidité



Graphique 5 : Morbidité à 4 heures d'incubation

## **1c- Recherche d'une activité toxique des surnageants de culture**

Nous avons par la suite comparé l'effet des bactéries et de leur produit excrété (surnageant) sur la mortalité hémocytaire (Graphique 4).

Les bactéries ont été incubées 20 heures à 20°C dans de l'eau de mer et le surnageant récupéré a été filtré. L'induction des mortalités hémocytaires par le groupe H est légèrement supérieure à l'effet des souches 30, 31, 32, 33 voire 32-33 avec une augmentation de 15% des mortalités par rapport au témoin. Dans ces conditions, les surnageants correspondant induisent moins de mortalités hémocytaires que les bactéries même s'ils conservent un effet inducteur de mortalité (de l'ordre de 5%).

Dans une autre expérience, les bactéries ont été incubées dans de l'eau de mer pendant 6 heures. Une activité des surnageants a été mise en évidence. Ces résultats illustrent la nécessité de reproduire les expériences dans des conditions standardisées pour pouvoir conclure à un effet.

## **II- Etude de la morbidité**

Le DiOC<sub>6</sub> mesure la différence de potentiel membranaire entre la membrane plasmidique et les membranes mitochondriales d'une cellule. Ce marquage permet d'évaluer la morbidité des cellules, il s'agit donc d'un marqueur prédictif de cellules en difficulté physiologiques (Figure 7). Selon certains auteurs, la diminution du marquage en DiOC<sub>6</sub> pourrait témoigner d'un phénomène apoptotique.

En présence de bactéries on observe une diminution du potentiel membranaire (Graphique 5).

Ici l'altération cellulaire à 4 heures, contrairement à la mortalité, serait plus importante avec H (-60%). Une diminution moindre est observée avec B (-40%), L et S322 (-20%). Cet effet doit être validé par une répétitivité des expériences en raison des hétérogénéités des résultats observés dans les études précédentes.

Ces résultats ne sont pas corrélés avec l'analyse des mortalités à 18 heures ou S322 continue à entraîner plus de mortalité. Cependant le biais due à la lyse cellulaire nécessitera dans l'avenir d'effectuer une suivi parallèle de la mortalité, de la morbidité et des concentrations hémocytaires.

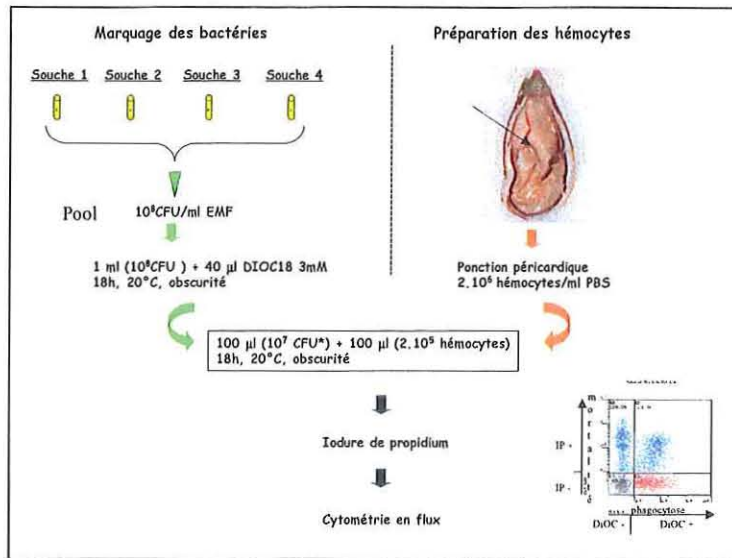
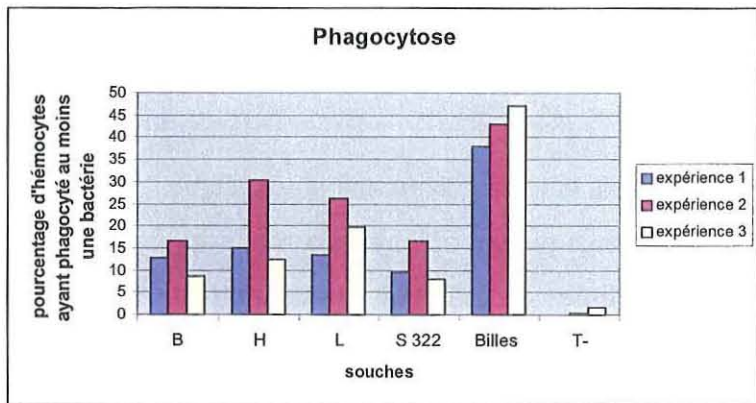
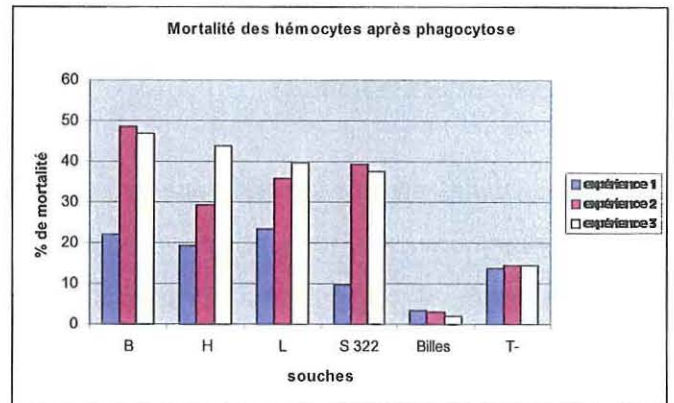


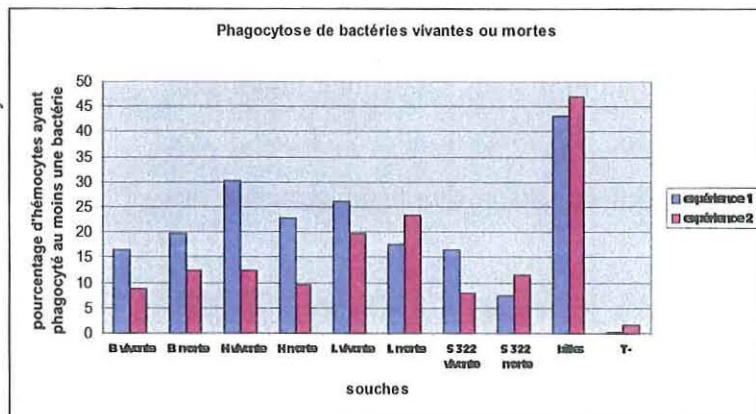
Figure 8 : Rappel du protocole de phagocytose



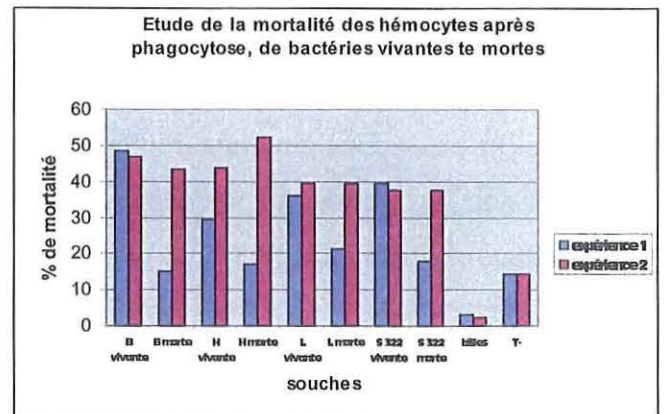
Graphique 6 : Etude de la phagocytose



Graphique 7 : Etude de la mortalité des hémocytes après phagocytose



Graphique 8 : Phagocytose de bactéries vivantes ou mortes



Graphique 9 : Etude de la mortalité des hémocytes après phagocytose, de bactéries vivantes ou mortes

### **III- Etude de la phagocytose**

Un marquage membranaire des bactéries au DiOC<sub>18</sub> et des hémocytes à l'iodure de propidium nous permet d'analyser les paramètres suivants :

- la mortalité des hémocytes (marqués à l'IP, FL 3)
- le pourcentage de cellules ayant phagocyté des particules (marquées en DiOC<sub>18</sub>, FL 1)
- la quantité de particules phagocytées en moyenne par hémocyte (FL 1) (Figure 8).

On obtient une bonne reproductibilité avec les billes (contrôle positif). Dans tous les cas un plus grand pourcentage de cellules phagocytent les billes (billes : 40% ; bactéries 20%). De même plus de billes sont phagocytées par hémocyte. La phagocytose des billes ne semble pas augmenter la mortalité hémocytaire. Un plus faible pourcentage d'hémocytes phagocyte les bactéries. De même, moins de bactéries sont phagocytées par hémocyte. L'effet entre souches est quasi similaire dans l'expérience 1 et des différences non reproductibles sont observées dans les expériences 2 et 3 (Graphique 6).

Dans ces expériences nous observons une augmentation importante de la mortalité des hémocytes (allant jusqu'à 35%) par rapport au témoin billes et au témoin négatif (Graphique 7). Tenant compte des résultats présentés précédemment (mortalité maximale de 15% avec les groupes) cette augmentation pourrait s'expliquer par un effet toxique lié au marquage des bactéries par le DiOC<sub>18</sub>. Cet effet toxique pourrait cacher un différentiel entre groupe B, H L et S322 observé dans les expériences précédentes. Cet effet toxique doit être évalué par une étude de viabilité des hémocytes en fonction du temps d'incubation et de la concentration en DiOC. D'autres types de marquage devront être testés. La souche S322 qui induit une plus forte mortalité d'hémocytes, semble moins phagocytée.

Afin de mettre en évidence un effet actif des bactéries sur leur phagocytose, nous avons comparé la phagocytose de bactéries vivantes ou mortes (Graphiques 8 et 9).

Dans les deux expériences, B et H semblent être moins phagocytés morts que vivants (en pourcentage de cellules et quantité de bactéries phagocytées), alors que pour L et S322 la différence mort/vivant est non reproductible. Dans l'expérience 1, on observe une différence importante de l'effet bactérie vivante/morte sur la mortalité des hémocytes pour toutes les bactéries. Par contre cette différence n'est pas reproduite au cours de l'expérience 2. Notons qu'il est probable que la toxicité du DiOC, pressentie dans les expériences précédentes peut

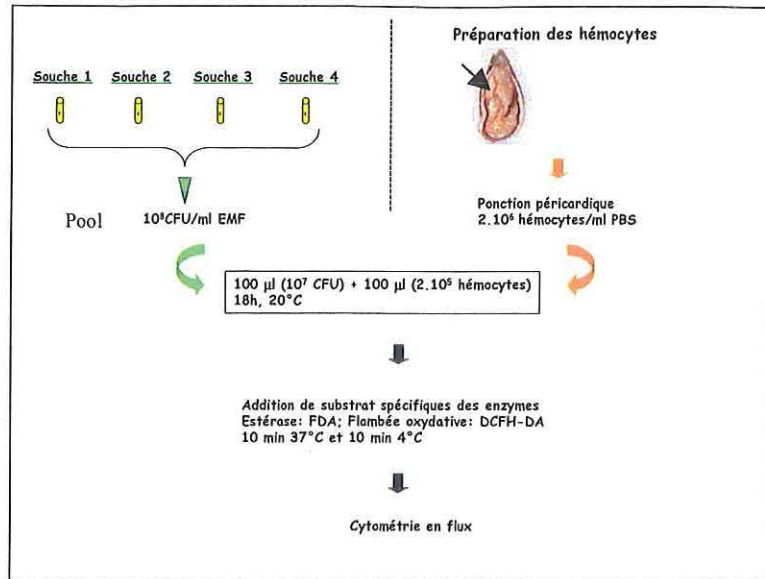
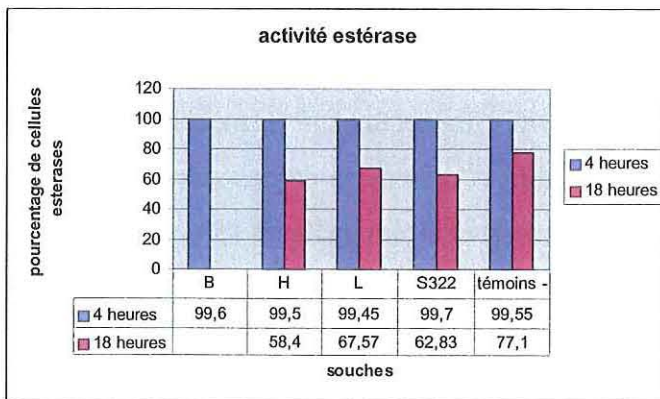
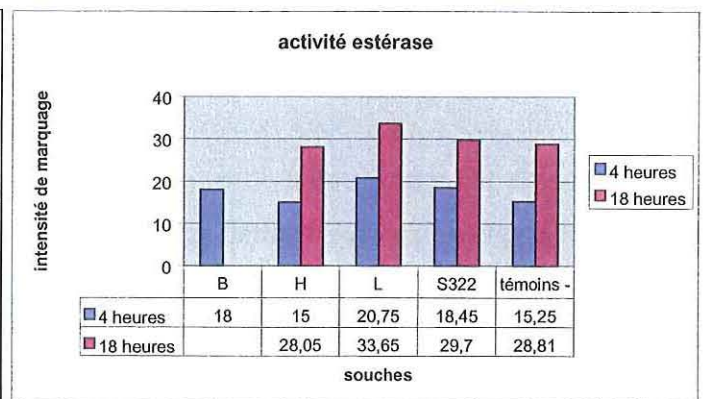


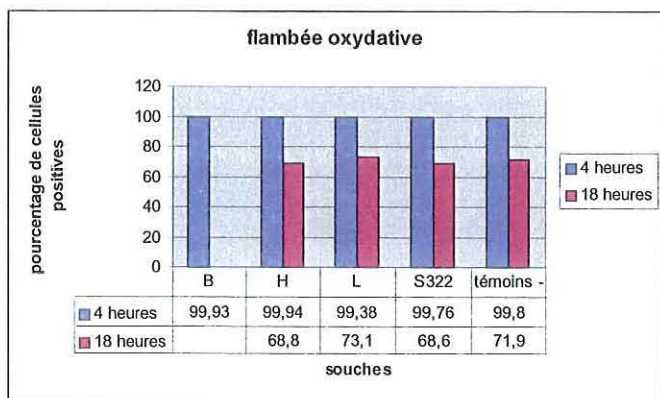
Figure 9 : Rappel du protocole d'étude des activités enzymatiques post-phagocytaires



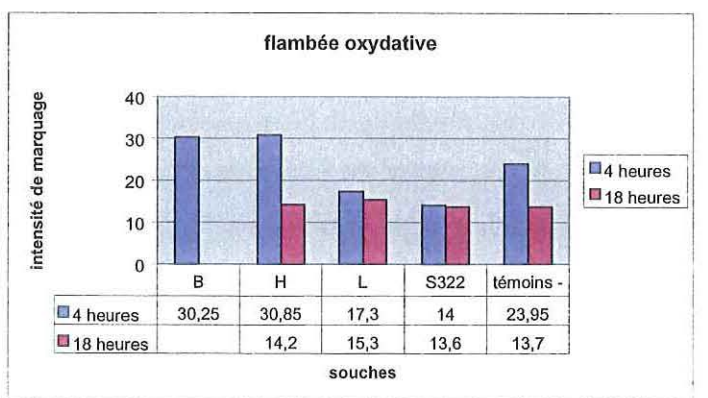
Graphique 10 : Activité estérase (pourcentage de cellules actives)



Graphique 11 : activité estérase (comparaison des intensités de marquage ente souches)



Graphique 12 : Flambée oxydative (pourcentage de cellules actives)



Graphique 13 : Flambée oxydative (comparaison des intensités de marquage ente souches)

compliquer l'interprétation des résultats. Nous devons comparer la mortalité induite par les bactéries mortes ou vivantes sans marquage préalable des bactéries.

En résumé, les bactéries semblent être phagocytées moins efficacement que les billes et nous n'observons pas de différence notable entre chaque groupe de souches avec des bactéries vivantes. Par contre, un effet différentiel entre groupe obtenu avec des bactéries tuées semble indiquer un effet actif de B et H sur leur phagocytose. L'effet toxique de la S322 n'est pas corrélé avec la phagocytose de cette bactérie. Dans tous les cas une grande variabilité des résultats entre expériences est observée.

#### **IV- Etude des activités enzymatiques post-phagocytaires**

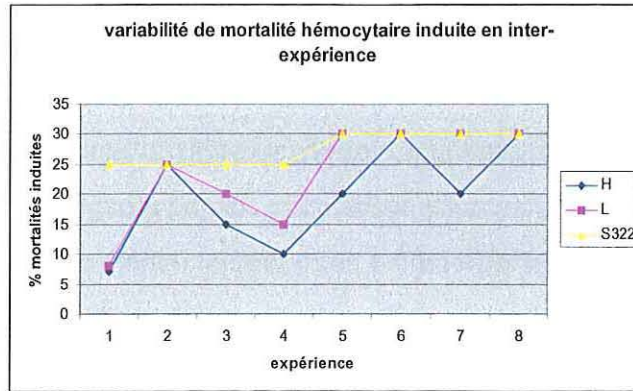
##### **IVa- Activité estérase**

Quatre heures après incubation des hémocytes *ex vivo* en présence ou non de bactéries, 100% de cellules présentent une activité estérase (Figure 9 ; Graphiques 10 et 11). Il serait intéressant de mesurer cette activité juste après le prélèvement des hémocytes afin de déterminer si la mise en culture des cellules entraîne cette expression. A 18 heures une diminution du nombre d'hémocytes présentant cette activité est observée en présence ou non de bactéries avec un effet légèrement plus important pour H et S322.

En terme d'activité estérase moyenne (intensité de fluorescence), à 4 heures on n'observe pas de différence d'activité en présence ou non de bactéries (15-20%). A 18 heures cette activité estérase est augmentée (30%) en présence ou non de bactéries.

##### **IVb- Flambée oxydative**

Quatre heures après incubation des hémocytes *ex vivo* en présence ou non de bactéries 100% de cellules présentent une flambée oxydative (Graphiques 12 et 13). Il serait intéressant de mesurer cette activité juste après le prélèvement des hémocytes afin de déterminer si la mise en culture des cellules entraîne cette expression. A 18 heures une diminution du nombre d'hémocytes activés est observée en présence ou non de bactéries.



Graphique 14 : Etude de la variabilité des mortalités hémoctaires induites inter-expérience

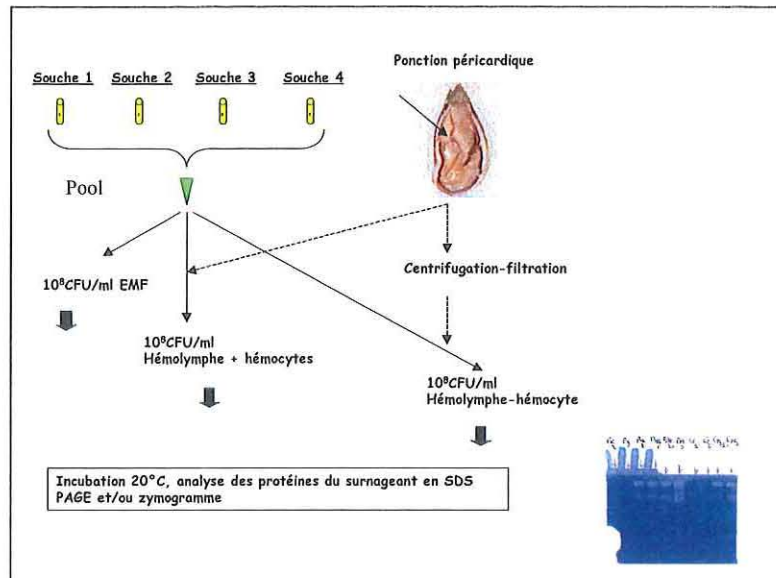


Figure 10 : Recherche d'activité métalloprotéase des surnageants de culture bactérienne

Souches	Bande différentielle en Zymogramme
A	-
B	+
C	-
D	-
E	-
G	+
H	-
I	-
J	-
L	-
M	-
N	-
AA	+
S322	-

Figure 11 : Recherche qualitative de métalloprotéases bactériennes : Bilan des résultats

En terme d'activité moyenne, à 4 heures on observe une activité légèrement plus forte pour B et H et moindre pour L et S322. Ces différences ne sont plus observées à 18 heures.

En résumé, contrairement à l'activité estérase, les bactéries pourraient moduler la flambée oxydative précocement avec un effet stimulant dans le cas des groupes H et B et inhibant dans le cas de L et S322. Cependant cet effet doit être validé par une répétitivité des expériences en raison des hétérogénéités des résultats observés dans les études précédentes.

### **V- Analyse de la reproductibilité des expériences**

La souche S322 induit 25 à 30% de mortalité hémocytaire de façon reproductible. Par contre l'effet des groupes H et L est variable et similaire c'est à dire que quand H tue peu, L tue peu et quand H tue beaucoup, L tue beaucoup (Graphique 14).

Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une action opportuniste de ces bactéries c'est-à-dire que leur virulence dépend de la sensibilité de l'hôte. Les expériences 5 à 8 sont effectuées avec des bactéries marquées au DIOC. Un effet inducteur des mortalités, indépendant du type de souches bactériennes est alors observé.

### **VI- Recherche d'activité métalloprotéase des surnageants de culture bactérienne**

De nombreuses publications proposent qu'un des mécanismes de virulence des *Vibrio* dépend de l'expression de protéases, facilement détectables en zymographie.

Dans notre étude aucune protéase n'est détectée dans l'eau de mer filtrée en présence ou non de bactéries ; par contre on détecte trois bandes dans l'hémolymphe en présence ou non d'hémocytes et en présence ou non de bactéries (Figure 10). Ces bandes correspondent donc à des protéases excrétées par les hémocytes.

Parmi tous les groupes de bactéries testés *seuls B, G et AA montrent une bande supplémentaire* (Figures 11 et 12). Cette protéase d'origine bactérienne est exprimée uniquement dans l'hémolymphe en présence ou non d'hémocytes après 6 heures d'incubation. L'hémolymphe pourrait donc induire l'expression de certains gènes, dont des toxines par les bactéries. Cependant ce résultat ne présente aucune valeur quantitative. En effet l'estimation



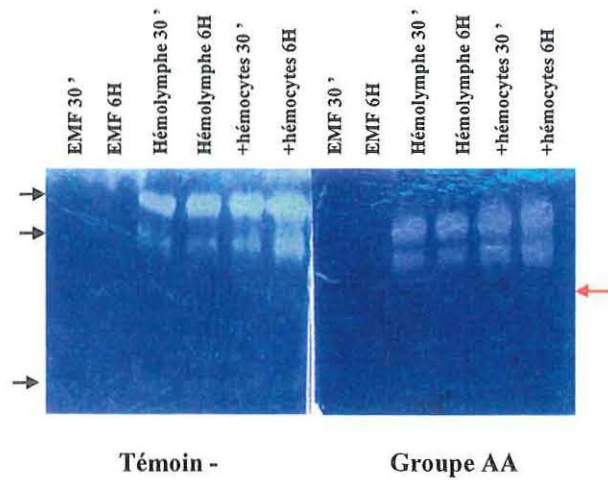
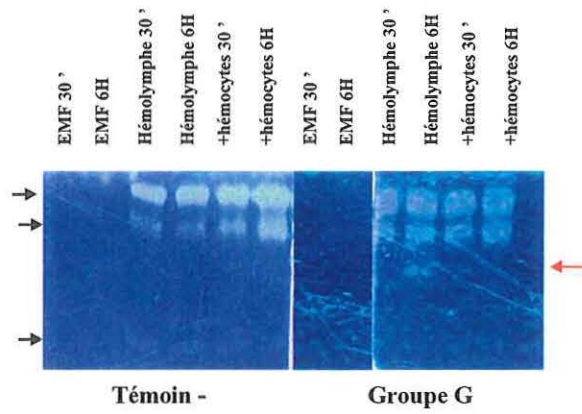
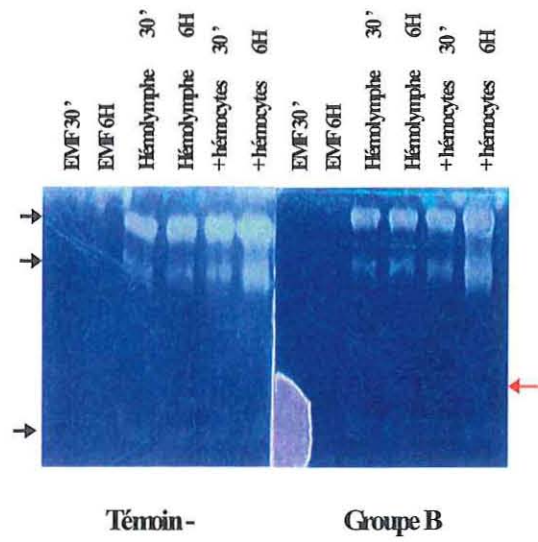
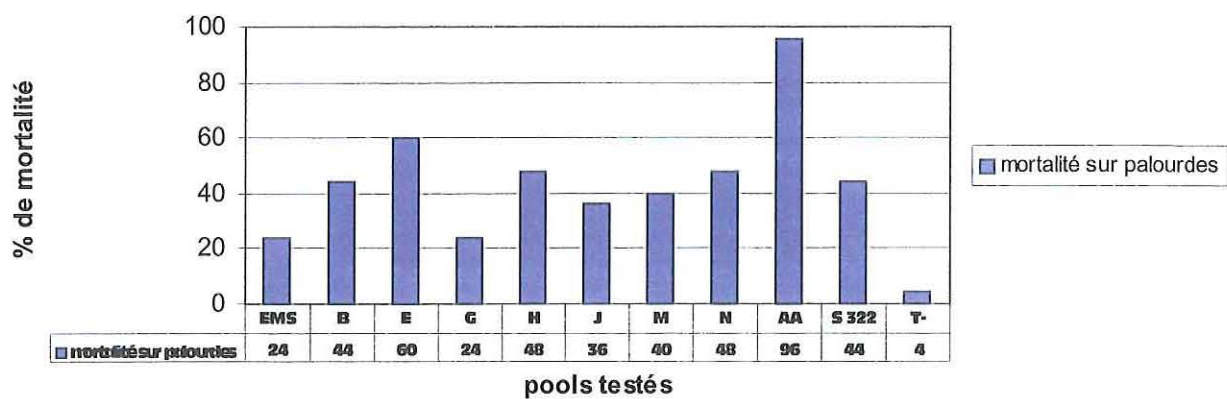


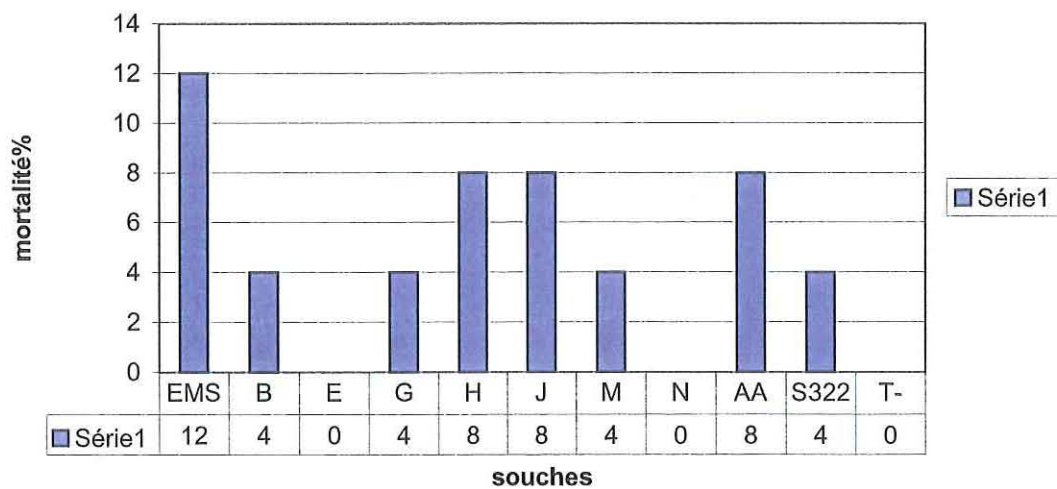
Figure 12 : Analyse de la production de protéases par les bactéries dans différents milieux : eau de mer filtrée, hémolymphe, hémolymphe + hémocytes

### Pathologie expérimentale sur palourdes



Graphique 15 : Injection des surnageants de culture à des palourdes

### pathologie expérimentale sur huître



Graphique 16 : Injection des surnageants de culture à des huîtres

de la quantité de protéines analysée par coloration au nitrate d'argent n'est pas suffisamment précise pour normaliser les échantillons.

## **VII- Recherche d'activité toxique des surnageants *in vivo***

Par la suite, nous avons recherché un effet toxique sur les animaux des produits excrétés par les bactéries, en présence de l'hémolymphe.

Avant injection à des huîtres ou à des palourdes, les groupes de bactéries ont été incubés dans de l'hémolymphe (-hémocytes) pendant 20 heures, centrifugés et le surnageant a été filtré. En parallèle deux témoins ont été injectés : de l'eau de mer filtrée (EMF) et de l'hémolymphe (T-). (Graphiques : 15 et 16)

Chez les palourdes, le groupe G n'entraîne pas plus de mortalité que le témoin EMF. Les groupes B, H, J, M, N et S322 entraîne une augmentation de la mortalité de l'ordre de 20% et le groupe E de l'ordre de 40%. L'effet le plus important est observé avec le groupe AA qui entraîne 90% de mortalité de palourdes. Cependant là encore dans une seconde série d'expérience ce résultat n'a pas été reproduit. De plus, chez les huîtres ces surnageants entraînent une mortalité inférieure au témoin EMF !

## **VIII- Recherche de séquences d'amorces dégénérées pour l'amplification par PCR de fragments de gènes codant pour des facteurs de virulence.**

Après alignement des séquences protéiques de métalloprotéases chez *Vibrio anguillarum*, *fluvialis*, *vulnificus* et de lécithinases chez *Vibrio mimicus* et *cholerae*, nous avons sélectionné les régions les plus homologues (Figures 13 et 14). Chaque acide aminé correspond à un ou plusieurs codons, qui nous permet d'établir des séquences d'oligonucléotides dégénérés (mélange de toutes les possibilités) qui seront synthétisées par une entreprise (Figure 15) (Annexe 6). Ces oligonucléotides seront utilisés dans la suite de ce travail (non présenté dans ce rapport) pour amplifier des fragments de gène codant pour ces protéines à partir des *Vibrio* pathogènes d'huîtres. Ces fragments permettront de cribler les gènes correspondant, de les séquencer, et d'étudier leur expression en Northern blot ou en hybridation *in situ*.

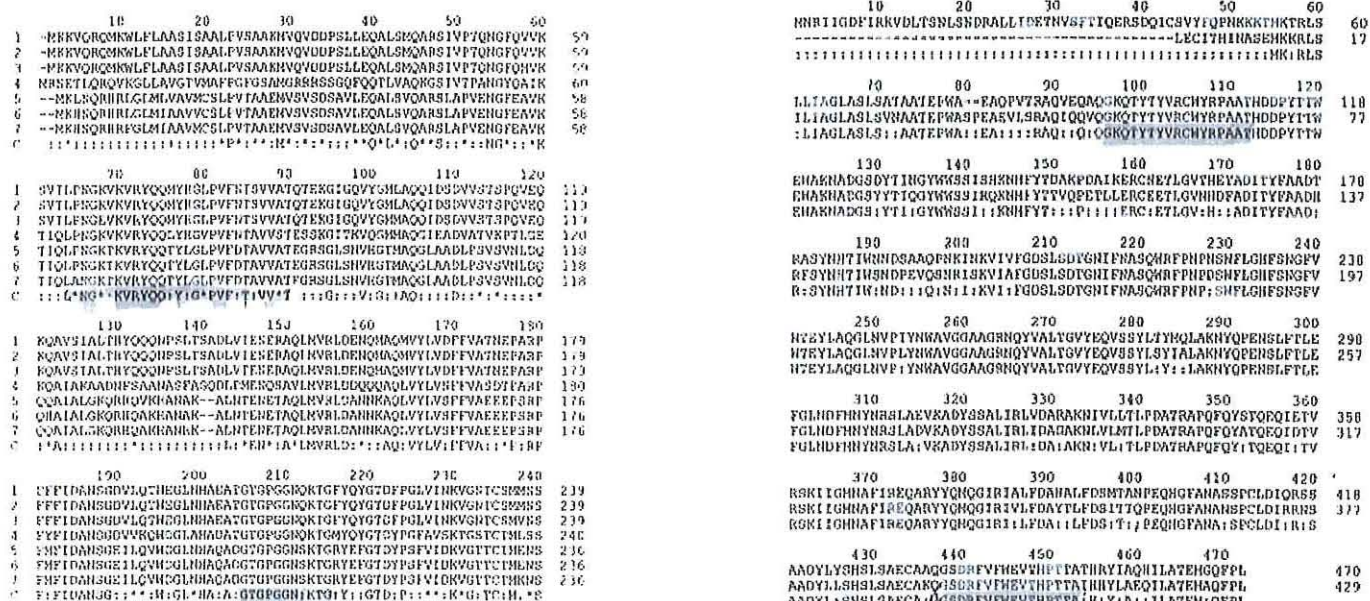


Figure 14 : Alignement des séquences protéiques de lécithinases

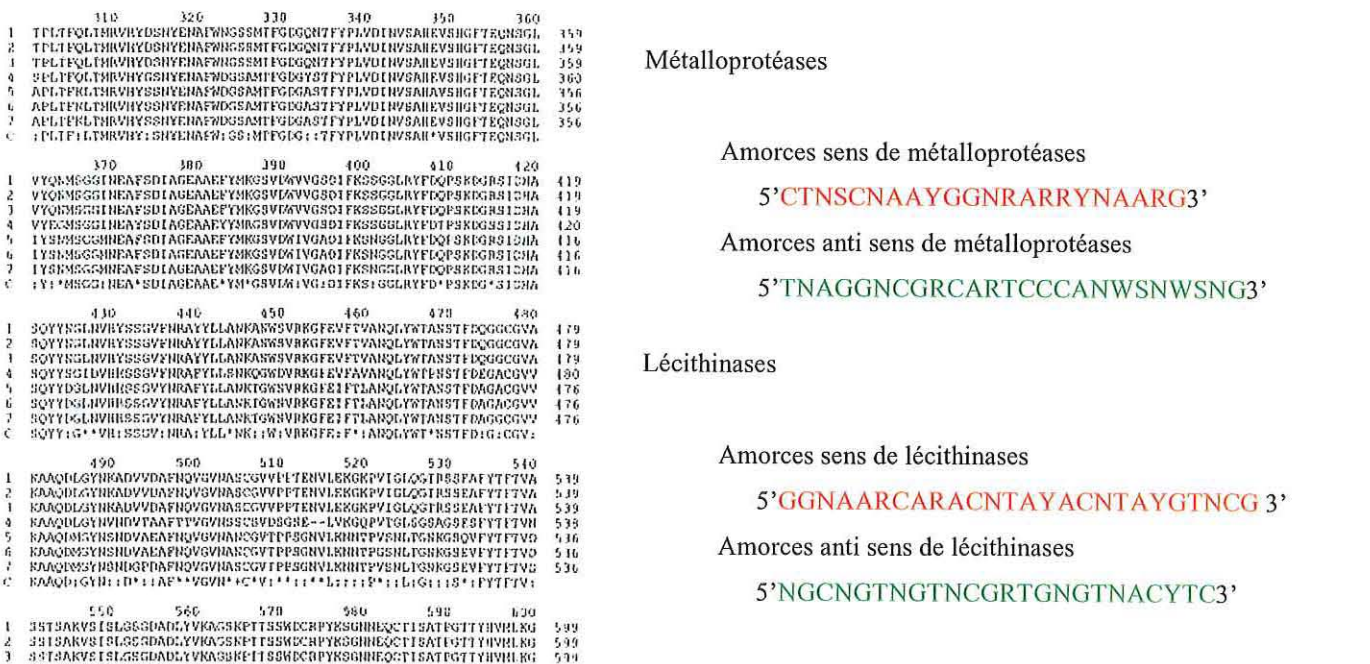


Figure 15 : Séquences d'oligonucléotides obtenues après alignement

Figure 13 : Alignement des séquences protéiques de métalloprotéases

## DISCUSSION

La **pathologie** est la science qui a pour but l'étude et la connaissance des maladies et des effets qu'elles provoquent (lésions, troubles). Les maladies constituent un risque majeur pour l'ostréiculture. Une maladie peut être définie par un déséquilibre physiologique non compensé par l'animal. Ce déséquilibre peut avoir des conséquences sur la qualité du produit, sur les performances zootechniques et dans les cas extrêmes une maladie peut conduire à la mort de l'animal. Les facteurs abiotiques et biotiques peuvent être la cause de maladies. Les paramètres environnementaux (température, salinité, oxygène...) ou physiologiques (maturation, stress) peuvent induire une fragilisation de l'animal. Parmi les facteurs biotiques, un retour sur l'histoire de l'ostréiculture française met en évidence la fragilité de cette production face aux maladies dues à des agents pathogènes : chute de 90 % de la production d'huîtres plates suite à l'apparition de deux parasitoses et disparition de *Crassostrea angulata* des côtes françaises due à une épizootie à iridovirus.

Depuis 1991, en période estivale, de forts taux de mortalité de naissain d'huîtres creuses (60 à 100%) sont observés régulièrement en milieu naturel et en écloséries. Ces épisodes récurrents inquiètent les professionnels qui craignent qu'à l'instar de l'huître portugaise, *C. angulata*, *C. gigas* puisse disparaître à son tour, suite à une épizootie.

**Dans l'état actuel des connaissances, les caractéristiques des mortalités estivales ne peuvent s'expliquer par l'unique intervention d'un agent infectieux (épizootie).** La piste d'une étiologie multifactorielle reste à privilégier. Le rôle possible d'un pathogène nous amène à réfléchir sur la notion de maladie infectieuse, résultat d'un déséquilibre entre la virulence de l'agent infectieux et les défenses immunitaires de l'hôte. Dans le cas d'épizooties la virulence de l'agent est telle que sa pathogénicité ne dépend pas de l'hôte. Dans le cas opposé d'une action bactérienne opportuniste, la fragilité physiologique de l'hôte est telle que la pathogénicité ne dépend pas uniquement de la virulence de l'agent infectieux. Enfin, les travaux antérieurs concernant les mortalités estivales s'accordent sur le fait que si agent infectieux il y a, celui ci présente une virulence modulée par l'état de l'hôte (liaison stress/capacité immunitaire) et par des conditions environnementales (période estivale).

Il apparaît donc fondamental de coupler la caractérisation de la virulence du pathogène par une description du système immunitaire de l'hôte.

Lors de son travail de thèse, Mélanie Gay a isolé 180 souches de *Vibrio* à partir d'hémolymphes de naissains d'huîtres creuses subissant des mortalités estivales. La virulence de certaines souches a été démontrée par infections expérimentales. Ces souches semblent plus pathogènes quand elles sont groupées.

Dans ce travail je me suis attachée à décrire les interactions entre les souches bactériennes sélectionnées et les cellules hématocytaires.

Dans un premier temps nous avons étudié l'effet de bactéries mortes ou vivantes et surnageant sur des hématocytes isolés d'huîtres creuses en culture primaire. La mortalité et la morbidité des hématocytes, la phagocytose des bactéries par les hématocytes ainsi que l'activité enzymatique post-phagocytaire ont été étudiées par cytométrie en flux.

La souche S322, utilisée comme témoin dans ces expériences a été isolée par J.L. Nicolas (Ifremer Brest) de larves de *C. gigas* subissant des mortalités. Cette souche ne semble pas pathogène de naissain. Dans cette étude, S322 induit des mortalités hématocytaires de l'ordre de 30%, de façon reproductible. L'effet morbidité semble moins fort. Cette souche est faiblement phagocytée et n'induit pas de différence importante de l'activité enzymatique post-phagocytaire mesurée. La toxicité de S322 pour les hématocytes ne semble pas nécessiter la phagocytose de cette bactérie.

Toutes les autres bactéries testées, en groupe ou en individuel entraînent une mortalité hématocytaire de l'ordre de 15%. Les surnageants de culture bactérienne induisent une mortalité variable selon les expériences. Une diminution du potentiel membranaire est observée dans tous les cas, indiquant une altération cellulaire. On observe une efficacité de phagocytose similaire entre les différents groupes de bactéries. Cette phagocytose ne semble pas associée à une modification de l'activité estérase mais semble moduler la flambée oxydative de façon précoce.

Pour le moment, seul le groupe H montre une virulence reproductible *in vivo*, ainsi a-t-il retenu notre attention. La mortalité hématocytaire induite par ces bactéries, contrairement aux autres groupes et à la S322 augmente avec le temps d'incubation. De même H semble induire plus de morbidité que les autres bactéries. Les études de phagocytose ont montré que cette bactérie est moins phagocytée morte que vivante laissant penser à une induction active par la bactérie de sa propre phagocytose.

Dans un second temps nous avons recherché l'expression de toxines bactériennes. L'expression de métalloprotéases a été analysée par zymographie. L'expression de protéases bactériennes, dépendante de l'hémolymphe, a été mise en évidence pour certains groupes de bactéries. Cependant l'induction par l'hémolymphe de l'expression voir de l'excrétion par les bactéries de certaines protéines bactériennes n'est pas corrélée avec une toxicité *in vivo*.

Un plus grand nombre de souche a été analysé mais leurs résultats ne sont pas présentés dans un souci de clarté.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, ces résultats s'ils ne permettent pas d'expliquer le mode d'action de ces bactéries pathogènes et de les modéliser *ex vivo*, ont permis de montrer la complexité du système entraînant une extrême variabilité des résultats.

Le fait d'utiliser un groupe de souches rend tout d'abord difficile le contrôle de la concentration respective de chaque souche. De plus l'effet observé peut résulter d'effets agonistes et antagonistes variables.

A chaque expérience de nouveaux animaux sont sacrifiés pour la préparation hémocytaire. Il s'agit d'animaux sauvages, présentant une grande diversité génétique et une histoire différente. Il n'est donc pas étonnant d'obtenir une variabilité de la réponse cellulaire.

Un préalable indispensable à la suite de ce travail va donc consister à standardiser ce modèle : découplage du groupe H et analyse de l'effet des souches individualisées, 2 à 2 voir 3 par 3 ; en plusieurs réplicats, dans plusieurs expériences, avec une cinétique plus précise. Il nous faudra combiner les analyses de mortalité/morbidité avec l'étude de la concentration cellulaire pour mieux comprendre l'effet des bactéries ou des surnageants de culture sur les hémocytes.

Les résultats de marquage hémocytaire au  $\text{DIOC}_6$  doivent être reproduits et complétés par l'utilisation de l'anexine, marqueur spécifique de l'apoptose, afin d'analyser l'effet de H sur ce phénomène.

La caractérisation des mécanismes de virulence *in vitro* sera complétée par la recherche de gènes supports comme les métalloprotéases, les lécithinases. Ce travail a été initié par le choix d'oligonucléotides dégénérés qui seront utilisés en PCR.

Ces analyses ont prouvé le fonctionnement des méthodes utilisées même s'il ne peuvent être utilisés en l'état actuel comme biotest pour analyser la virulence des bactéries. Une standardisation et une validation de ces approches sont maintenant nécessaires.



## BIBLIOGRAPHIE

1. Cheng, T.C., Bui M. N., Howland K. H., Schoenberg D. A., Sullivan T. (1981). Effect of Preinjection of *Crassostrea virginica* with bacteria on subsequent chemotactic response by its hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38, pp. 122-126
2. Lorteau, C., Auffret M., Le Bris H. (1995). Le système d'immuno-défense des Mollusques bivalves : Structure et fonctionnement. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, Juin-Juillet, p. 415-429
3. Auffret, M. (1985). Morphologie comparative des types hémocytaires chez quelques mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse du 3<sup>ème</sup> cycle, d'océanographie mention biologie. Université de Bretagne Occidentale (Brest). 153 p
4. Alvarez M.R., Friedl F. E., Johnson J. S., Hirsch G. W. (1989). Factors affecting *in vitro* phagocytosis by oyster hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol.54, n°2, pp. 233-241
5. Alvarez, M.R., Friedl F. E. (1990). Factors affecting *in vitro* phagocytosis by hemocytes of the American oyster. *Academic Press*. pp. 501-511
6. Bayne C.J. (1990). Phagocytosis and non self recognition in invertebrates. Phagocytosis appears to be an ancient line of defence. *Bioscience*, n°40, pp. 723-731
7. Fisher (1988). In vitro binding of parasite *Bonamia ostreae* and latex particles by hemocytes of susceptible and insusceptible oysters. *Developmental and Comparative Immunology*. n°12, pp. 43-43
8. Kumazawa N.H., Morimoto N. (1992). Chemotactic activity of hemocytes derived from a brackish-water-clam, *Corbicula* strains. *J. Vet. Med. Sci.* Vol. 54, n°5, pp.851-855

9. Bachere E., Mialhe E., Noel D., Boulo V., Morvan A., Rodriguez J. (1995). Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture*. Vol. 132, n°1, pp. 17-32
10. Hinsch G.W., Hunte M. (1990). Ultrastructure of phagocytosis by the hemocytes of the American oyster. *Academic Press*. pp. 479-488
11. Toreilles J., Guerin M-C., Roch P. (1997). Peroxidase release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developpemental and Comparative Immunology*. Vol.21, n°3, pp. 267-275
12. Xue, Q., Renault, T. (2000). Enzymatic Activities in European flat oyster *Ostrea edulis*, and Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, Hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol. 76, n°3, pp. 155-163
13. Hauton C., Hawkins L. E., Hutchinson (2001). Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* L. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. 11, n°2, pp. 143-153
14. Gagnaire B. (2001). Etude de l'impact de micropolluants sur les capacités immunitaires de l'hôte creuse, *Crassostrea gigas*, *in vivo* et *in vitro*. DEA Océanologie Biologique Environnement Marin Option Environnement marin et Biogéochimie. Université Pierre et Marie Curie. Paris VI. 55 p
15. Anderson, R.S., Beaven A.E. (2000). Antimicrobial activity in cell-free hemolymph of oysters and mussels. *Journal of Shellfish Research*. Vol.19, n° 1, p. 641
16. Montagnani C., Le Roux F., Berthe F., Escoubas J.M. (2001). Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *Federation of European Biochemical Societies letters*. n°500, pp. 64-70

17. Cochenec N. (1997). La Bonamiose : Caractérisation du parasite *Bonamia ostreae* et étude des interactions entre l'hôte, l'huître plate *Ostrea edulis*. Mémoire de l'Ecole des hautes études : Science de la vie et de la Terre (Montpellier), pp. 1-18
18. Alsina, M., Blanch, A. R., 1994a. A set of keys for biochemical identification environmental *Vibrio* species. *J. App. Bact.* 76, 79-85
19. Waechter M., Le Roux F., Nicolas J.L, Marissal E., Berthe F. (2001). Caractérisation des bactéries pathogènes de naissains d'huître creuse *Crassostrea gigas*. Sous presse. 12 p
20. Magne F.(2001). Phylogénie moléculaire de bactéries pathogènes de bivalves marins, *Vibrio splendidus*, à partir du gène Gyr B. Maîtrise de biologie cellulaire et physiologie, option physiologie microbienne, 29 p
21. Le Roux F., Waechter M., Lambert C., Grnon K., Gay M., Chollet B., Nicolas J-L., Marissal E., Berthe F. (2001). Comparative analysis of *Vibrio splendidus* biovar II isolated during *Crassostrea giga* mortality outbreaks, sous presse, 23 p.
22. Gay M., (2002). Caractérisation de bactéries pathogènes isolées d'huîtres *Crassostrea gigas* lors d'épisodes de mortalité. Rapport d'avancement des travaux de thèse 2001/2002. LGP La Tremblade/Université de La Rochelle
23. Métézeau P., Miglierina R., Ratinaud M-H. (1993). La cytométrie en flux : Guide pratique de la préparation à l'analyse des cellules. *Pulim Presse de l'université de Limoges*. p. 5-21
24. Hames B. D., Rickwood D. (1990). Gel Electrophoresis of proteins : a practical approach. *IRL Press*. p. 61-65 et 83

## **ANNEXES**

<b>Annexe 1 : Milieux utilisés en bactériologie</b>	<b>30</b>
<b>Annexe 2 : Composition du PBS 1100 mOSM</b>	<b>31</b>
<b>Annexe 3 : Composition des bleus de protéines</b>	<b>32</b>
<b>Annexe 4 : Fabrication des gels de protéines totales et des gels « zymogrammes »</b>	<b>33</b>
<b>Annexe 5 : Composition des solutions de coloration</b>	<b>34</b>
<b>Annexe 6 : Bases de l'ADN</b>	<b>35</b>

## Annexe 1 : Milieux utilisés en bactériologie

### *EDMA*

#### *Eau de mer artificielle*

#### Composition selon Lewis (10 X)

NaCl .....	234 g
KCl .....	15 g
MgSO <sub>4</sub> 74 H <sub>2</sub> O .....	12 g
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O .....	1.5 g
CaCl <sub>2</sub> anhydre .....	1.5 g
Eau distillée .....	1 L

#### Utilisation à 1 X

### *ZOBELL liquide (Marine Brooth)*

Pastone .....	4 g
Extrait de levure .....	1 g
EDMA .....	1 L

Ajusté à pH 7.4 avant autoclavage

### *ZOBELL solide*

Pastone .....	4 g
Extrait de levure .....	1 g
Agar .....	7.5 g
EDMA .....	1 L

Ajusté à pH 7.4 avant autoclavage  
Couler en boîte de Pétri

## Annexe 2 : Composition du PBS 1100 mOSM

### *PBS 1100 mOsm*

NaCl .....	29.454g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhydre.....	1.48 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.43 g
Eau distillée .....	1 L

### Annexe 3 : Composition des bleus de protéines

#### *Bleu de protéine A*

50 mM Tris pH 6.8 .....1 ml Tris 2 M  
0.1% SDS .....100 µl SDS 10 %  
0.1% bleu de bromphénol .....10 mg  
10 % glycérol .....1 ml  
β-mercaptoéthanol.....400 µl  
H<sub>2</sub>O qsp 10 ml

#### *Bleu de protéine B*

50 mM Tris pH 6.8 .....1 ml Tris 2 M  
0.1% SDS .....100 µl SDS 10 %  
0.1% bleu de bromphénol .....10 mg  
10 % glycérol .....1 ml  
H<sub>2</sub>O qsp 10 ml

## Annexe 4 : Fabrication des gels de protéines totales et des gels « zymogrammes »

### *Quelques solutions*

#### Lower Tris

TrisCl 2M pH 8.8 .....750 ml  
SDS 10 % .....40 ml  
H<sub>2</sub>O qsp 1 L

#### Upper Tris

TrisCl 2M pH 6.8 .....500 ml  
SDS 10 % .....40 ml  
H<sub>2</sub>O qsp 1 L

#### Tampon de migration 5 X

TrisCl pH 8.3 125 mM .....15.12 g Tris base  
Glycine 1.25 M .....93.8 g  
SDS 0.5 % .....5 g  
H<sub>2</sub>O qsp 1 L

Ajusté au pH 8.3 avec HCl

Utilisation à 1 X

### *Les gels*

#### Gel de résolution (pour deux minigels)

Lower Tris 4 X .....2.5 ml  
30 % Acrylamide/Bisacrylamide .....3.4 ml  
H<sub>2</sub>O .....4 ml  
Temed .....20 µl  
Ammonium persulfate 10 % .....120 µl  
Gélatine 4 % .....250 µl (uniquement pour les gels « zymogramme »)

#### Gel de concentration (pour deux minigels)

Upper Tris 4X .....1 ml  
30 % Acrylamide/Bisacrylamide .....666 µl  
H<sub>2</sub>O .....2.3 ml  
Temed .....10 µl  
Ammonium persulfate 10 % .....60 µl



## Annexe 5 : Composition des solutions de coloration

### *Coloration à l'argent*

#### Fixateur

Ethanol 50 % .....500 ml  
Acide acétique 5 % .....50 ml  
H<sub>2</sub>O qsp 1 L

Solution d'argent 0.19 % .....1.9 g dans 1 L d'eau déionisée

Solution de réduction .....30 g NaOH dans 1 L d'eau déionisée  
Avant utilisation on ajoute 7.5 ml de formaldéhyde 37 %

Colour enhancer .....7.05 g Carbonate de sodium dans 1 L d'eau déionisée  
[34]

### *Coloration au Bleu de Coomassie*

#### Solution détergente

Triton 2.5 % .....25 ml dans 1 L d'eau

#### Tampon d'incubation

Tris HCl 1 M pH 7.5 .....50 ml (50 mM)  
NaCl 5M .....40 ml (200 mM)  
CaCl<sub>2</sub> 1M .....5 ml (5mM)  
H<sub>2</sub>O qsp 1 L

## Annexe 6 : Bases de l'ADN

### *Les bases classiques*

A adénine

G guanine

C cytosine

T thymine

### *Autres*

N = [A, g, C, T]

R = [A, g]

S = [g, C]

W = [A, T]

Y = [C, T]