

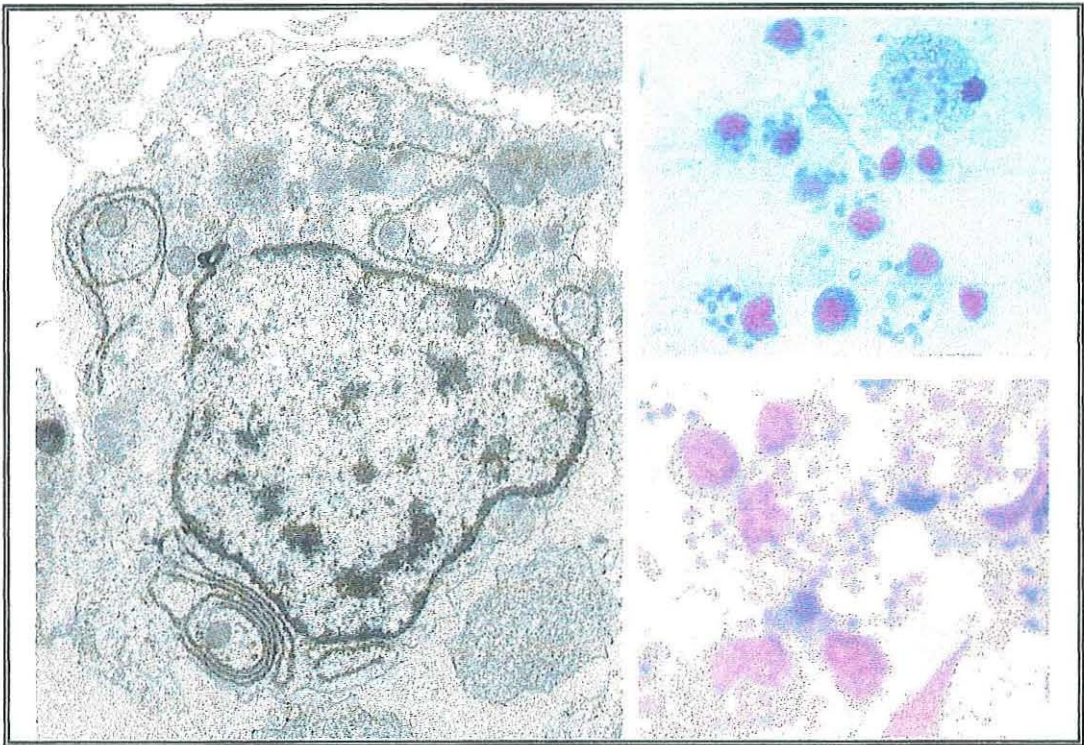
Lycée Technique  
Saint-Louis. Bordeaux  
Mars 1996 - Juin 1996

Mémoire en vue de l'obtention du certificat d'études supérieures  
technologiques post-DUT

Option : cultures cellulaires et microscopie électronique

**INFECTION DES HEMOCYTES  
PAR LE PARASITE *BONAMIA OSTREAE* :  
CYTOLOGIE COMPARATIVE *IN VITRO***

Nathalie PARTHUISOT



IFREMER  
Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie  
B.P. 133. 17390 La Tremblade

## REMERCIEMENTS

J'adresse ma sincère reconnaissance à 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 remercier toutes les personnes qui ont su me faire découvrir et apprécier un domaine inconnu pour moi, celui de l'ostréiculture et plus particulièrement l'huître plate.

Je remercie mon maître de stage, T. Renault, pour m'avoir permis d'acquérir de nouvelles connaissances théoriques et pratiques.

Je tiens tout particulièrement à dire un grand merci à Nathalie COCHENNEC qui a encadré mes travaux, guidé mes recherches et a su me faire partager son enthousiasme tout au long du stage.

Je remercie également toute l'équipe de la station, ainsi que les stagiaires, pour leur aide précieuse sur le plan technique ainsi que leur soutien moral.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>Pages</b>
1. L'ostréiculture française .....	5
2. Généralités sur les maladies des invertébrés marins .....	5
3. La bonamiose .....	6
4. Mécanismes de défense observés chez les mollusques .....	6
• Les effecteurs cellulaires .....	6
• La phagocytose .....	7
 <b>MATERIEL ET METHODES</b>	
<b>Première partie : Matériel</b> .....	9
9	
1. Matériel biologique : les huîtres .....	9
2. Milieux de culture .....	9
• Milieux empiriques .....	9
• Milieu synthétique .....	9
• Supplémentations .....	9
3. Kits de cytochimie .....	10
 <b>Deuxième partie : Méthodes</b> .....	11
1. Primocultures d'hémocytes d'huîtres plates, <i>Ostrea edulis</i> .....	11
• Prélèvement de l'hémolymphhe .....	11
• Tri des animaux .....	11
• Lavage des hémocytes .....	11
• Mise en culture .....	12
2. Manipulations effectuées sur primocultures d'hémocytes .....	12
• Comptage .....	12
• Cytocentrifugation .....	12
• Détermination des types hémocytaires .....	12
• Analyse ultrastructurale des hémocytes .....	13
3. Primoculture des différents types hémocytaires .....	14
• Séparation des hémocytes .....	14
• Mise en culture .....	14
• Comptage et cytocentrifugation .....	14

4. Cytochimie.....	15
• Système API ZYM.....	15
• Microscopie optique.....	15
Recherche de : . $\alpha$ -Naphthyl butyrate estérase.....	15
. $\beta$ -Glucuronidase.....	15
. Naphtol AS-D chloroacétate estérase.....	16
. Naphtyl acétate estérase.....	16
• Microscopie électronique à transmission (MET).....	16
Recherche de : . Glycérophosphatase, selon deux protocoles.....	16
. Cytidine monophosphatase.....	17
. Thiamine pyrophosphatase.....	18

## **RESULTATS**

---

1. Primocultures d'hémocytes.....	20
• Apposition cardiaque.....	20
• Milieu de culture.....	20
2. Suivis effectués sur les primocultures.....	22
• Numération.....	22
• Mortalité cellulaire.....	22
• Caractérisation morphologique des types hémocytaires.....	35
• Comparaison des formules d'hémocytes parasités et sains.....	37
• Taux d'infestation.....	37
• Analyse ultrastructurale des hémocytes.....	43
3. Primocultures à partir des types hémocytaires séparés.....	44
• Séparation des différents types hémocytaires.....	44
• Mise en culture.....	45
• Numération et hémogrammes.....	45
4. Cytochimie.....	46
• Système API ZYM.....	46
• Microscopie optique.....	47
Recherche de : . $\alpha$ -Naphthyl butyrate estérase.....	47
. $\beta$ -Glucuronidase.....	47
. Naphtol AS-D chloroacétate estérase.....	48
. Naphtyl acétate estérase.....	48

- Microscopie électronique à transmission (MET) ..... 49
- Recherche de : . Glycérophosphatase..... 49
- . Cytidine monophosphatase..... 50
- . Thiamine pyrophosphatase ..... 52

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

---

**54**

# INTRODUCTION

## 1. L'ostréiculture française

L'ostréiculture s'est développée réellement au milieu du siècle dernier après que des essais de captage de l'huître plate, *Ostrea edulis*, plus communément appelée Belon, soient effectués par Coste (Coste, 1861).

Contrairement à l'huître japonaise, *Crassostrea gigas*, qui constitue l'essentiel de la production française (150 000 tonnes / an), la production annuelle d'*Ostrea edulis* a diminué considérablement entre les années 1970 et 1992, passant de 20 000 à 1 500 tonnes. Cette diminution est essentiellement due à l'apparition de deux pathologies qui sont spécifiques de cette espèce : la bonamiose et la marteiliose.

## 2. Généralités sur les maladies des invertébrés marins

De même que les autres productions animales, la conchyliculture est frappée par diverses maladies dont certaines sont des facteurs limitatifs de la quantité 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 les pratiques zootechniques particulières. Les concentrations animales rencontrées en élevage exacerbent les effets de nombreux agents pathogènes.

En fait, il n'y a que peu de possibilités de protéger les invertébrés marins d'intérêt aquacole vis à vis des maladies infectieuses du fait de certaines caractéristiques de ces animaux. D'une part, les traitements, pour des espèces le plus généralement élevées en milieu ouvert, posent les problèmes des quantités de substances à utiliser, des fortes probabilités de recontamination et de l'accumulation de résidus dans le milieu. De ce fait, ce type d'approche pour contrôler les maladies infectieuses ne semble pas une voie à privilégier.

D'autre part, la vaccination reste sans objet chez les invertébrés du fait de leur absence de réponse immune spécifique. Il est important de souligner que ces animaux ne possèdent pas de lymphocytes B et de lymphocytes T, cellules qui sont directement impliquées dans les réponses spécifiques vis à vis des agents pathogènes chez les vertébrés et qui peuvent être stimulées au moyen de la vaccination.

Au vu de ces éléments, les seules façons de protéger efficacement les invertébrés marins d'intérêt économique vis à vis des maladies infectieuses sont de mettre au point des techniques de diagnostic rapides, sensibles et fiables, ainsi que d'obtenir des populations d'animaux présentant une certaine "résistance" aux principales maladies.

### 3. La bonamiose

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

L'impact économique de la bonamiose sur la production ostréicole française a conduit l'IFREMER à développer un programme pluridisciplinaire concernant l'étude de ce parasite. Une de ces approches concerne la pathologie expérimentale, et plus particulièrement les mécanismes d'infestation des hémocytes par le parasite.

Des caractères de ce parasite, il faut retenir sa localisation intrahémocytaire. Cette maladie constitue un modèle de parasitisme intracellulaire intéressant par le double rôle joué par les hémocytes dans cette maladie. Ils sont, en effet, à la fois les cellules hôtes d'un point de vue parasitologique, et les cellules effectrices de l'immunité à médiation cellulaire.

### 4. Mécanismes de défense observés chez les mollusques

Il convient en premier lieu de noter que le système immunitaire des invertébrés se distingue de celui des vertébrés par l'absence de réponse immunitaire faisant intervenir des cellules spécialisées (lymphocytes T ou B). De cette caractéristique résulte l'incapacité à mettre en évidence une réponse basée sur la spécificité et la mémoire chez les mollusques bivalves marins.

Ainsi chez les bivalves, les mécanismes de défense observés, immédiats et non inductibles, sont en partie à médiation cellulaire et reposent sur l'activité des hémocytes.

#### *Les effecteurs cellulaires*

" L'immunité cellulaire " des mollusques bivalves 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 le tissu conjonctif de la masse digestive et celui des filaments branchiaux, au niveau de vastes sinus.

L'étude de ces cellules a suscité de nombreux travaux. Différents critères ont été utilisés, séparément ou en association, pour classifier les types hémocytaires chez les mollusques bivalves : critères morphologiques, cytochimiques, fonctionnels et antigéniques.

Cependant dans la littérature, l'absence de critères d'identification bien établis amène une multiplicité de dénomination et de description des hémocytes. Cependant, 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 et les cellules agranuleuses.

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 Wesney, 1994).

Les fonctions des hémocytes sont variées : transport du calcium et des protéines nécessaires à la réparation de la coquille, cicatrisation des blessures, transport et digestion des substances nutritives, excrétion et, bien sûr, ils jouent un rôle important dans la défense interne. Cette fonction de défense semble essentiellement assurée par la phagocytose des particules étrangères ou encapsulation si ces dernières sont trop grosses pour être phagocytées.

### *La phagocytose*

Les différents auteurs ne sont pas unanimes quant aux types hémocytaires impliqués dans le phénomène de phagocytose de substances étrangères. En ce qui concerne *Ostrea edulis*, Brereton et Alderman (1979) considèrent que des cellules hyalines à activité phagocytaire observées sont peut-être des granulocytes ayant perdu leurs granules du fait de leur activité métabolique.

Néanmoins, en réponse à diverses agressions du milieu naturel, la réaction hémocytaire, souvent inconstante, d'intensité et d'évolution variables, fait toujours intervenir des hémocytes granuleux. 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. Cet état de fait renforce l'intérêt d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués, plus particulièrement en comparant des animaux résistants et sensibles.

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,
- . de définir des mécanismes ou des molécules associés à la résistance, pour obtenir des animaux présentant des capacités accrues de résistance (transgénèse).

Les travaux réalisés au cours de ce stage s'intègrent dans ce programme de sélection et concerne plus particulièrement l'étude *in vitro* de l'infestation des hémocytes par le parasite *Bonamia ostreae*, basée sur la cytologie comparative des hémocytes sains et parasités.



# MATERIEL ET METHODES

# MATERIEL

## 1. Matériel biologique : les huîtres

Les primocultures sont réalisées avec des hémocytes d'huître plate, *Ostrea edulis*. Ces huîtres proviennent de Cancale (Bretagne) et sont âgées de 2-3 ans.

## 2. Milieux de culture

### 2. 1. Milieux empiriques

- *Solution d'Alsever*

Les hémocytes prélevés présentent une forte tendance à l'agrégation spontanée, hors de l'organisme. Afin de la minimiser, la solution d'Alsever est utilisée.

Solution d'Alsever : Glucose.....20.80 g/l  
Cholure de sodium .....22.50 g/l  
Citrate de sodium .....8.00 g/l  
EDTA .....3.36 g/l  
H<sub>2</sub>O.....1000 ml

Osmolarité : 1000 mOsm

Le pH est ajusté à 7.5. La solution est filtrée sur 0.22 µm stérilement et des antibiotiques sont ajoutés à la concentration de 4X pour éviter les contaminations bactériennes. (composition en annexe)

- *Eau de mer*

Elle est prélevée à l'écloserie et filtrée stérilement à 0.22 µm.

### 2. 2. Milieu synthétique

- *Milieu de Leibovitz (L15)*

Les hémocytes prélevés sont mis en culture dans ce milieu, commercialisé par GIBCO BRL sous forme lyophilisée. Sa reconstitution est faite généralement en solution d'Alsever ou en eau de mer filtrée stérile.

Le milieu est filtré stérilement à 0.22 µm avant utilisation.

### 2. 3. Supplémentations

Pour optimiser la culture des hémocytes, le milieu L15-Alsever est supplémenté par du sérum de veau foetal à 10 % et des antibiotiques à la concentration 2X.

### 3. Kits de cytochimie et enzymes

- Système API ZYM, kit de la société BioMérieux
- Pour détecter les différentes activités enzymatiques en microscopie photonique, des kits SIGMA ont été utilisés :
  - .  $\alpha$ -Naphthyl Butyrate Esterase..... kit n°181-B
  - . Naphtol AS-D Chloroacetate Esterase.. kit n°91-C
  - .  $\alpha$ -Naphthyl Acetate Esterase..... kit n°91-A
  - .  $\beta$ -Glucuronidase..... kit n°181-C
- Les activités enzymatiques recherchées en microscopie électronique sont:
  - .  $\beta$ -Glycérophosphatase (Suivant le protocole de Barka et Anderson pour les invertébrés marins, 1994, et suivant la technique de Robinsori-Karnovsky, 1994)
  - . Cytidine monophosphatase (Hervio et *al.*, 1994)
  - . Thiamine pyrophosphatase (Robinsori-Karnovsky, 1994)

# METHODES

## 1. Primocultures d'hémocytes d'huîtres plates, *Ostrea edulis*

### 1. 1. Prélèvement de l'hémolymphe

Les huîtres sont brossées sous l'eau courante, puis passées sous un bain d'alcool absolu pendant 30 sec à une minute, afin de désinfecter la coquille. Elles sont ensuite séchées sous une hôte à flux laminaire.

Les huîtres sont ouvertes par section du muscle adducteur, puis rincées à l'alcool 70°. Cette opération doit être effectuée avec soin afin de ne pas perforer la cavité péricardique. Il est ensuite possible de ponctionner à la seringue, directement dans cette cavité. 500 µl à 1000 µl d'hémolymphe sont ainsi prélevés par animal sur Alsever (1 vol -3 vol).

N.B. : les seringues et les aiguilles sont changées entre chaque animal pour éviter les contaminations.

### 1. 2. Tri des animaux par apposition cardiaque

Avant de mettre en culture les différents types d'hémocytes (sains et parasités), il est nécessaire de prélever les hémolymphe, par huître, et de vérifier pour chacune d'elle la présence ou non du parasite *Bonamia ostreae*.

*B. ostreae* est un parasite intracellulaire de l'huître plate. Il peut donc être observé dans tous les tissus de l'animal infesté et plus particulièrement au niveau du coeur. De ce fait, le ventricule cardiaque est l'organe de prédilection pour la recherche de ce protozoaire par la technique d'apposition, qui consiste à réaliser des empreintes de coeurs sur une lame histologique. Les préparations sont fixées au méthanol, puis colorées à l'aide d'un kit Hémacolor (Merck).

### 1. 3. Lavage des hémocytes

Pour limiter la contamination des prélèvements d'hémolymphe, et empêcher une prolifération de microorganismes lors de la mise en culture des cellules, les hémocytes subissent une série de lavages.

Après prélèvement, les hémocytes sont centrifugés à 1500 rpm, 15 min, 8°C. Le surnageant est éliminé, en laissant au-dessus du culot d'hémocytes 2 ou 3 ml.

Ce culot est ensuite lavé en solution d'Alsever additionné d'antibiotiques (2X), qui permet le lavage des hémocytes par une série de centrifugations à différentes vitesses ;

- Solution d'Alsever sur le culot : 15 min sur glace,
- 2 lavages en Alsever (ATB 2X), 1500 rpm, 15 min, 8°C,
- 2 lavages en Alsever (ATB 2X), 800 rpm, 45 min, 8°C,
- 2 lavages en Alsever (ATB 2X), 500 rpm, 45 min, 8°C.

Avant chaque nouveau lavage, le surnageant est éliminé en laissant quelques millilitres de la solution d'Alsever afin de ne pas perdre trop de cellules.

De plus, un comptage est effectué pour quantifier la perte d'hémocytes au cours des lavages. Les centrifugations sont réalisées dans une centrifugeuse Beckman J6/ME.

#### 1. 4. Mise en culture

Après avoir lavé le culot d'hémocytes, celui-ci est remis en suspension dans 1 ml de solution d'Alsever et la numération cellulaire est réalisée, à l'hématimètre de Malassez.

Une fois cette numération faite, le culot est remis en suspension dans un volume de milieu de culture adéquat pour avoir 500 000 cellules par puits, dans un volume de 200  $\mu$ l. Les hémocytes sont ainsi distribués dans des microplaques de 96 puits.

### 2. Manipulations effectuées sur les primocultures

#### 2. 1. Comptages

Le suivi de la multiplication cellulaire est réalisé par une numération quotidienne des hémocytes sur plusieurs puits (de 2 à 4 en fonction du nombre d'hémocytes totaux mis en culture), à l'hématimètre de Malassez.

La mortalité cellulaire est déterminée de paire, par coloration au Bleu Trypan (2 %). Celui-ci s'intègre dans les cellules mortes et le pourcentage de ces dernières, par rapport au nombre total de cellules, est alors déterminé quotidiennement.

#### 2. 2. Cytocentrifugation

Les cytocentrifugations sont des centrifugations de cellules effectuées sur lames histologiques permettant l'utilisation de faibles volumes de suspension cellulaire. Elles sont effectuées à faible vitesse et sont de courte durée, ce qui permet de conserver la morphologie des cellules. Les cellules étalées sur lame, ainsi obtenues, sont fixées pendant 2 minutes dans un bain de Méthanol puis colorées avec le kit Hémacolor pendant 2 minutes pour chaque bain de coloration.

Le programme de cytocentrifugation est le suivant : 500 rpm, 1 minute, avec une accélération progressive et une décélération rapide.

Un contrôle de la morphologie des hémocytes ainsi que la qualité du prélèvement est alors réalisé après le dernier lavage et sur les cellules mises en culture à différents temps, sur plusieurs puits.

#### 2. 3. Détermination des types hémocytaires

A partir de la primoculture d'hémocytes sains comme celle des hémocytes parasités, des cytocentrifugations ont été réalisées pour déterminer les hémogrammes. Cent cellules au minimum ont été observées pour chaque prélèvement et chaque puits de culture.

En plus de la détermination de la formule hémocytaire des huîtres parasitées, le taux d'infestation, pour chaque type hémocytaire est déterminé, sur un minimum de 100 cellules.

## 2. 4. Analyse ultrastructurale des hémocytes

Après avoir mis en culture les hémocytes comme précédemment décrit, ceux-ci sont prélevés quotidiennement, centrifugés et préparés pour la microscopie électronique.

- Préparation des échantillons :

Chaque jour, les hémocytes sont centrifugés et directement fixés en glutaraldéhyde à 3 %.

La préparation des échantillons pour l'observation en microscopie électronique comprend plusieurs étapes détaillées en annexe.

Après fixation des pièces en glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon cacodylate de sodium à 1100 mOsm, les hémocytes sont post-fixés à l'acide osmique à 1 %, puis, après déshydratation, sont inclus dans une résine (Epon).

- Préparation des coupes et contraste :

Après polymérisation de l'Epon dans une étuve à 60°C, les blocs sont coupés à l'aide d'un ultramicrotome Nova LKB. Dans un premier temps, des coupes semi-fines (1 µm) sont réalisées, puis colorées à chaud au bleu de toluidine. Après vérification, en microscopie photonique, de la présence d'un nombre suffisant de cellules, des coupes ultra-fines (80 à 100 nm d'épaisseur) sont réalisées pour l'observation au microscope électronique à transmission.

Ces coupes sont déposées sur des grilles de cuivre et sont contrastées par l'acétate d'uranyle. (Protocole en annexe)

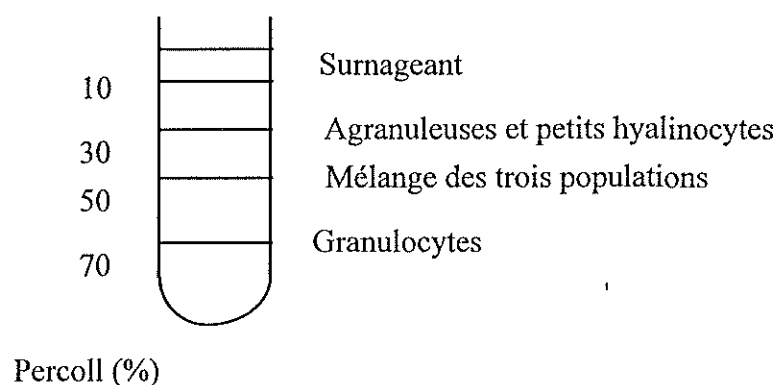
Les préparations contrastées sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (JEOL JEM 1200 EX, à 60 kVolts).

### 3. Primoculture des différents types hématocytaires

#### 3. 1. Séparation des hématocytes

La séparation de sous-populations hématocytaires est obtenue par centrifugation isopycnique. Différentes concentrations de Percoll, diluées dans l'Alsever : 10, 30, 50 et 70 % (vol / vol) sont préparées. Un gradient discontinu de Percoll est réalisé au moyen d'une pompe péristaltique, en utilisant 2 ml de chaque concentration. Une suspension cellulaire (5 ml), est disposée à la surface du gradient et l'ensemble est soumis à une centrifugation de 1500 rpm, 20 min à 4°C.

Après centrifugation, différentes interfaces sont obtenues :



Chaque interface est prélevée puis lavée avec la solution d'Alsever (centrifugation à 1500 rpm, 20 min, 4°C), jusqu'à élimination totale du Percoll.

#### 3. 2. Mise en culture

Les cellules séparées sont comptées et mises en culture dans le milieu L15-Alsever, à raison de 500 000 cellules par puits.

#### 3. 3. Comptage et cyto-centrifugation

La numération et la mortalité sont déterminées quotidiennement pendant une semaine.

## 4. Cytochimie

### 4. 1. Système API ZYM

Le système API ZYM est une microméthode semi-quantitative de recherches d'activités enzymatiques. Il permet d'étudier rapidement et simultanément 19 activités enzymatiques. Il se présente sous la forme d'une galerie de 20 microcuvettes dont le fond contient le substrat enzymatique avec son tampon.

Les hémolymphes de 5 huîtres saines et de 5 huîtres parasitées sont prélevées sur Alsever (1:3). Un comptage du nombre total d'hémocytes est réalisé. Une dilution est ensuite effectuée en eau distillée pour obtenir une concentration finale de  $5 \cdot 10^6$  cellules / ml.

Les suspensions d'hémocytes sains et parasités sont soniqués (100 W-60 sec), puis 65  $\mu$ l de chacune d'entre elles sont distribués dans les 20 cupules de deux galeries distinctes.

Celles-ci sont alors incubées 4 heures à 37°C.

La lecture se fait après addition d'une goutte de réactif ZYM A (agent tensioactif) et une goutte de réactif ZYM B dans chaque cupule.

### 4. 2. Microscopie optique

#### ① Préparation des cytocentrifugations

L'hémolymphe d'une huître plate est prélevée, et le nombre d'hémocytes déterminé, à la dilution 1/10 pour cytocentrifuger 300 000 cellules par lame.

#### ② Recherche des activités enzymatiques

##### . $\alpha$ -Naphthyl butyrate estérase

Juste avant la fixation, 1.5 ml de Sodium Nitrite Tablet Solution sont ajoutés à 1.5 ml de Pararosaniline Solution. Le mélange est laissé pendant au moins 5 minutes.

40 ml de tampon phosphate, préchauffé à 37°C sont ajoutés au mélange, ainsi que 5 ml d' $\alpha$ -Naphthyl butyrate Solution.

Les préparations cytocentrifugées sont fixées pendant 10 minutes avec une solution de glutaraldéhyde à 3 %, rincées dans de l'eau distillée et immédiatement après, incubées dans la solution précédemment préparée, pendant 2 heures à 37°C.

Elles sont ensuite rincées 2-3 minutes dans de l'eau et après avoir séchées à l'air libre, elles sont contre-colorées au bleu de méthylène pendant 5 minutes.

Les préparations sont rincées à l'eau et observées en microscopie photonique.

##### . $\beta$ -Glucuronidase

Juste avant la fixation, 0.5 ml de Sodium Nitrite Tablet Solution sont ajoutés à 0.5 ml de Pararosaniline Solution. Le mélange est laissé pendant au moins 5 minutes.

38 ml de tampon phosphate, préchauffé à 37°C sont ajoutés au mélange, ainsi que 5 ml d'Acetate Solution et 5 ml de Naphtol AS-BI  $\beta$ -D Glucuronic Acid Solution.



Les préparations cytocentrifugées sont fixées pendant 10 minutes avec une solution de glutaraldéhyde à 3 %, rincées dans de l'eau distillée et immédiatement après, incubées dans la solution précédemment préparée, pendant 2 heures, 6 heures et 18 heures à 37°C et à l'obscurité.

Elles sont ensuite rincées 2-3 minutes dans de l'eau et après avoir séchées à l'air libre, elles sont contre-colorées au bleu de méthylène pendant 5 minutes.

Les préparations sont rincées à l'eau et observées en microscopie photonique.

#### . Naphtol AS-D chloroacétate estérase (estérase spécifique)

Juste avant la fixation, 1 ml de Sodium Nitrite Tablet Solution sont ajoutés à 1 ml de Fast Red Violet LB Base Solution. Le mélange est laissé pendant au moins 2 minutes.

40 ml d'eau distillée, préchauffée à 37°C sont ajoutés au mélange, ainsi que 5 ml de TRIZMAL 6.3 Buffer Concentrate et 1 ml de Naphtol AS-D chloroacétate Solution.

Les préparations cytocentrifugées sont fixées pendant 10 minutes avec une solution de glutaraldéhyde à 3 %, rincées dans de l'eau distillée et immédiatement après, incubées dans la solution précédemment préparée, pendant 1 heure à 37°C et à l'obscurité.

Elles sont ensuite rincées 2-3 minutes dans de l'eau et après avoir séchées à l'air libre, elles sont contre-colorées à l'hématoxyline pendant 5 minutes.

Les préparations sont rincées à l'eau et observées en microscopie photonique.

#### . $\alpha$ -Naphtyl acétate estérase (estérase non spécifique)

Juste avant la fixation, 1 ml de Sodium Nitrite Tablet Solution sont ajoutés à 1 ml de Fast Blue BB Base Solution. Le mélange est laissé pendant au moins 2 minutes.

40 ml d'eau distillée, préchauffée à 37°C sont ajoutés au mélange, ainsi que 5 ml de TRIZMAL 7.6 Buffer Concentrate et 1 ml d' $\alpha$ -Naphtyl acétate Solution.

Les préparations cytocentrifugées sont fixées pendant 10 minutes avec une solution de glutaraldéhyde à 3 %, rincées dans de l'eau distillée et immédiatement après, incubées dans la solution précédemment préparée, pendant 30 minutes et 1 heure à 37°C et à l'obscurité.

Elles sont ensuite rincées 2-3 minutes dans de l'eau et après avoir séchées à l'air libre, elles sont contre-colorées à l'hématoxyline pendant 5 minutes.

Les préparations sont rincées à l'eau et observées en microscopie photonique.

### 4. 3. Recherche d'activités enzymatiques en microscopie électronique à transmission

#### • *Glycérophosphatase* (invertébrés marins - Barka et Anderson)

Les culots d'hémocytes sont lavés avec de l'eau de mer filtrée stérile et mis dans les différents milieux d'incubation : milieu de révélation, milieu témoin.

Milieu de révélation : Solution A ..... 10 vol  
Solution B..... 1 vol

Le mélange est chauffé à 37°C pendant une nuit et filtré avant emploi.

Solution A : tampon acétate de sodium-acide acétique 0.05M, pH 5 ..... 100 ml  
NaCl..... 3.20 g  
Nitrate de plomb ..... 0.12 g

Solution B : NaCl 3 % ..... 100 ml  
 $\beta$ -glycérophosphate de sodium ..... 3.00 g

Les culots sont incubés à 37°C pendant 1 h 30, puis rincés dans les bains suivants :

1. Tampon acétate de sodium- acide acétique
2. Acide acétique 3.6 %
3. Tampon acétate de sodium- acide acétique

Ils sont ensuite post-fixés, déshydratés et inclus classiquement.

- *Glycérophosphatase* (Robinsori- Karnovsky)

Les culots d'hémocytes sont lavés avec de l'eau de mer filtrée stérile et incubés dans le milieu de Gomori (milieu de révélation) et un milieu témoin, sans enzyme, pendant une heure à 37°C puis une nouvelle heure dans du milieu frais.

Milieu de Gomori : 1 mM  $\beta$ -glycérophosphate  
2 mM cerium chloride  
5 % sucrose  
0.1M tampon Na-acétate, pH 5

Ils sont ensuite post-fixés, déshydratés et inclus classiquement.

- *Cytidine monophosphatase* (Hervio *et al.*)

Les culots d'hémocytes sont lavés avec de l'eau de mer filtrée stérile et incubés dans le milieu de Novikoff (milieu de révélation) et un milieu témoin, sans enzyme.

Milieu de Novikoff : 25 mg Cytidine 5'-monophosphate  
12 ml H<sub>2</sub>O distillée  
3 ml Nitrate de plomb 1 %  
10 ml Tampon acétate de sodium 0.05M  
20 % Sucrose

Le pH est ajusté à 2.7 et 5.

Les culots sont incubés 1h30 à 37°C, dans les 2 milieux à pH différents puis lavés avec le

tampon acétate de sodium 0.05M.

Ils sont ensuite post-fixés, déshydratés et inclus classiquement.

- *Thiamine pyrophosphatase* (Robinsori- Karnovsky)

Les culots d'hémocytes sont lavés avec de l'eau de mer filtrée stérile et incubés dans le milieu

suisant : 1 mM Thiamine pyrophosphatase chloride

2 mM Manganese chloride

2 mM Cerium chloride

100 ml Tampon tris maléate 0.1M, pH7.2

20 % Sucrose

Un milieu témoin est préparé sans l'enzyme.

Ils sont incubés 1 h à 37°C et rincés 2 fois 10 min dans le tampon tris maléate et une fois dans le tampon cacodylate.

Ils sont ensuite post-fixés, déshydratés et inclus classiquement.

# RESULTATS

# 1. Primoculture d'hémocytes

## 1. 1. Tri des animaux par apposition cardiaque

Lors de la première expérience de primoculture, les hémocytes sains et parasités n'ont pas été déposés séparément dans les puits de culture. Lors des expériences suivantes, ils ont été mis en culture séparément afin d'observer et de comparer leur évolution respective.

Pour chaque expérimentation, le prélèvement des hémocytes est réalisé sur trois douzaines d'huîtres. En moyenne, 40 % des huîtres sont parasitées, à un stade plus ou moins avancé d'infestation.

Les figures 1, 2, 3 et 4 représentent des hémocytes d'huîtres plates parasitées par *Bonamia ostreae*, observées sur apposition cardiaque.

Le diagnostic de la bonamiose est effectué pour chaque huître par apposition cardiaque. Le taux d'infestation est défini de la manière suivante :

- +++ > 50 parasites / champ de lecture
- ++ > 10 parasites / champ de lecture
- + < 10 parasites / champ de lecture
- 0 aucun parasite n'est décelé

## 1. 2. Milieux de culture

Lors de la première expérience, les hémocytes sont mis en culture dans le milieu L15 reconstitué soit en solution d'Alsever soit en eau de mer filtrée stérile. Leur évolution est déterminée grâce à une numération quotidienne du nombre d'hémocytes par puits de culture. La meilleure survie cellulaire est observée dans le milieu L15-Alsever et non dans le milieu L15-EMFS pour lequel le nombre de cellules décroît plus rapidement.

Observation d'hémocytes d'huîtres plates parasitées par *Bonamia ostreae*.  
Technique d'apposition cardiaque

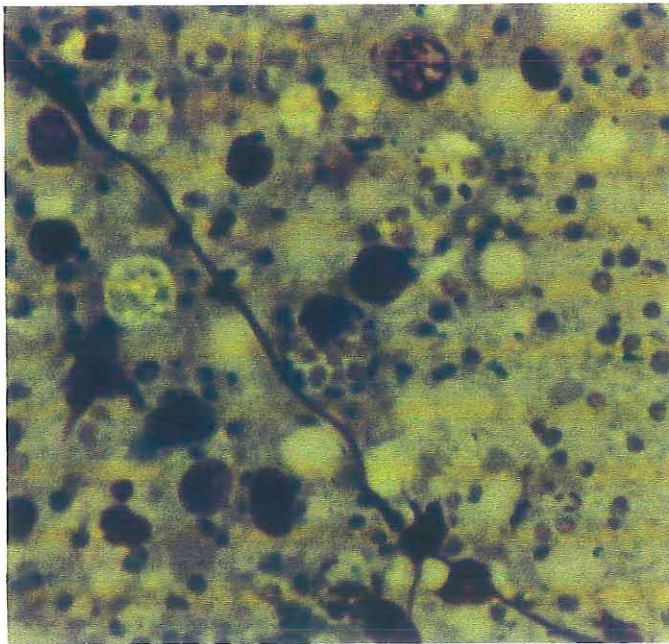


Fig. 1. Grande cellule agranuleuse parasitée (G x1000)

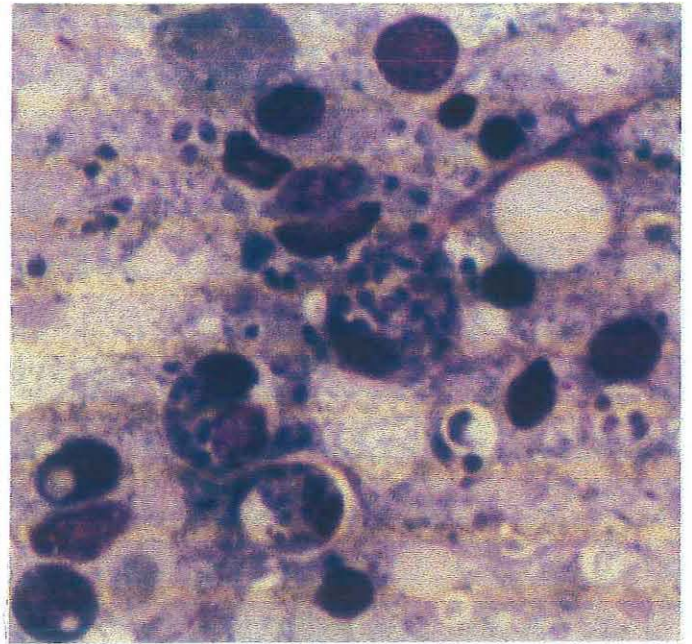


Fig. 2. Grande cellule agranuleuse et petits hyalinocytes parasités (Gx1000)

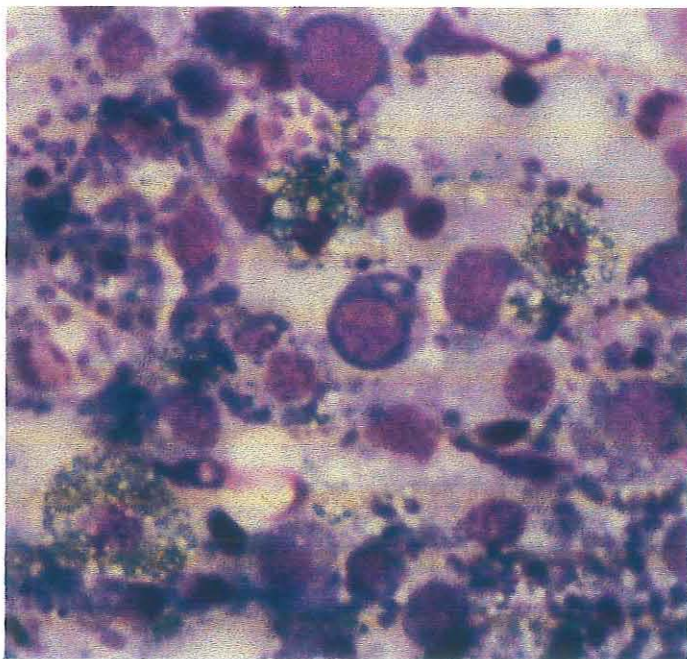


Fig. 3. Grandes cellules agranuleuses infestées, petits hyalinocytes et granulocytes non infestés. (Gx1000)

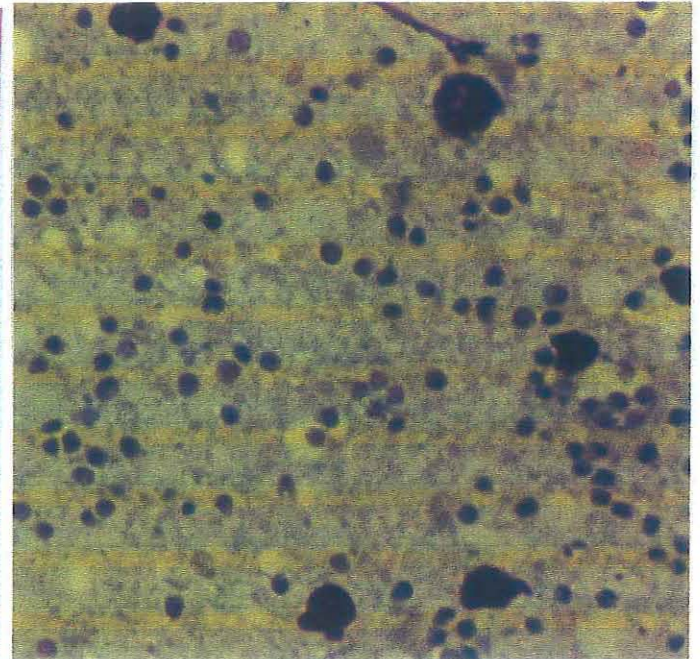


Fig. 4. Parasites *Bonamia ostreae* (Gx1000)

## 2. Suivis des primocultures

### 2. 1. Numération

Les résultats de la numération cellulaire sont représentés sur les histogrammes, correspondants à six expériences (Figures 5 à 10).

Pour les hémocytes sains, le milieu L15-Elsever permet le maintien et la survie des cellules dans les puits de culture.

Un léger pic de croissance peut même être observé dans certaines expériences. Dans l'expérience 1, entre J2 et J3, le nombre d'hémocytes passe de  $2.5.10^6$  cellules / ml à  $3.10^6$  cellules / ml. Dans la expérience 2, entre J0 et J7, le nombre d'hémocytes est multiplié environ par deux. Dans la expérience 3, le nombre d'hémocytes augmente de  $2.3.10^6$  cellules / ml au douzième jour, à  $3.2.10^6$  cellules / ml au treizième jour de culture.

Pour les expériences 4, 5 et 6, il n'y a pas d'augmentation du nombre de cellules par puits mais un maintien de ce nombre pendant 7 jours.

Pour les hémocytes parasités, il y a décroissance rapide du nombre de cellules en culture dans le milieu L15 reconstitué en Elsever.

Dans les expériences 2, 3, 4 et 5, le nombre initial d'hémocytes parasités à J0 varie entre 2 et  $2.5.10^6$  cellules / ml. Dès le premier jour, ce nombre baisse, jusqu'à une diminution de moitié à J3 pour l'expérience 2, à J5 pour les expériences 3, 4 et 5.

Cela dit, après cette baisse du nombre d'hémocytes parasités en 3 ou 5 jours, celui-ci semble se stabiliser, pour la manipulation n°5, à 1 million de cellules / ml (de J5 à J14).

Les résultats obtenus lors de la sixième expérience ne sont pas identiques à ceux obtenus lors des expériences précédentes, car même si le nombre d'hémocytes chute d'environ 1 million de cellules / ml de J0 à J3, un pic de croissance est observé à J16, et le nombre d'hémocytes est alors de  $3.10^6$  cellules / ml. Cependant, pour cette expérience, parmi les hémocytes parasités, des cellules tumorales ont été également mises en culture.

Les résultats des numérations effectuées montrent que le milieu L15-Elsever permet de maintenir en vie les hémocytes sains pendant un nombre de jours important (une dizaine de jours). Par contre, dans ce même milieu, le nombre d'hémocytes parasités décroît au cours du temps.

### 2. 2. Mortalité

Parallèlement à la numération quotidienne du nombre d'hémocytes par puits de culture, la mortalité cellulaire est déterminée.

Pour les expériences 2, 3 et 4, la mortalité des cellules saines ne dépasse pas 20 % jusqu'à J8. Elle atteint ensuite 30 % à partir de J11 et reste stable par la suite.

Pour les expériences 5 et 6, la mortalité des hémocytes sains est un peu plus élevée dès J3 (environ 30 %).

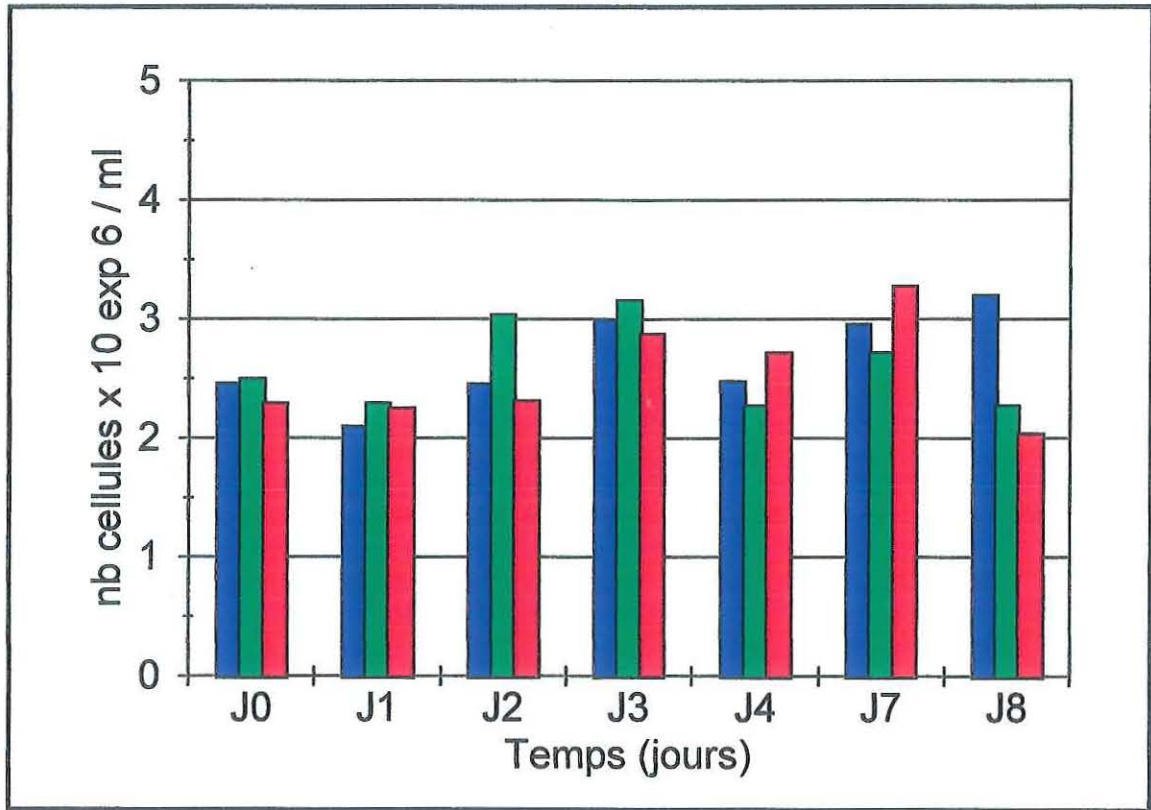
Pour les hémocytes parasités, la mortalité est relativement faible (30%) jusqu'à J3, puis augmente, pour l'ensemble des expériences, jusqu'à 40-50 %, à J5-J6 pour les expériences 4 et 5, et J11 pour l'expérience 6.



## FIGURE 5. Expérience 1

### PRIMOCULTURE D'HEMOCYTES *D'OSTREA EDULIS*

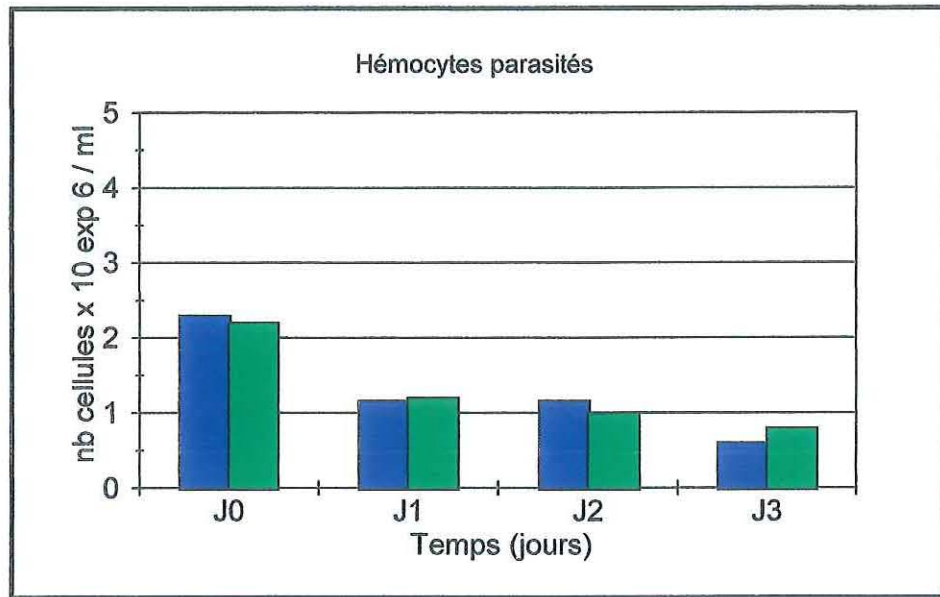
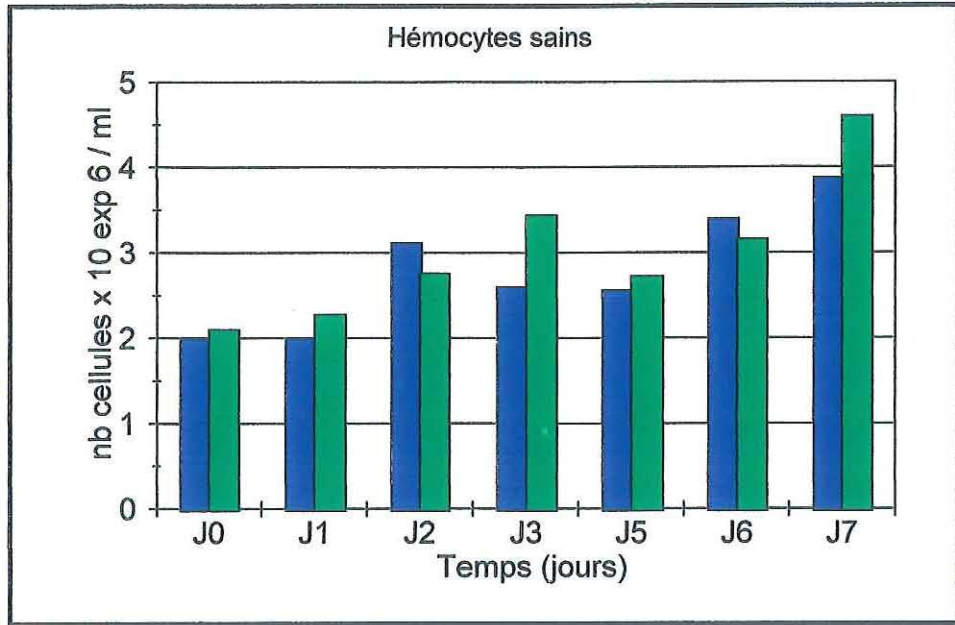
Nombre total d'hémocytes, sains et parasités, par puits  
Comptages quotidiens sur trois puits



## FIGURE 6. Expérience 2

### PRIMOCULTURE D'HEMOCYTES D'OSTREA EDULIS

Nombre total d'hémocytes sains et parasités par puits  
Comptages quotidiens sur deux puits

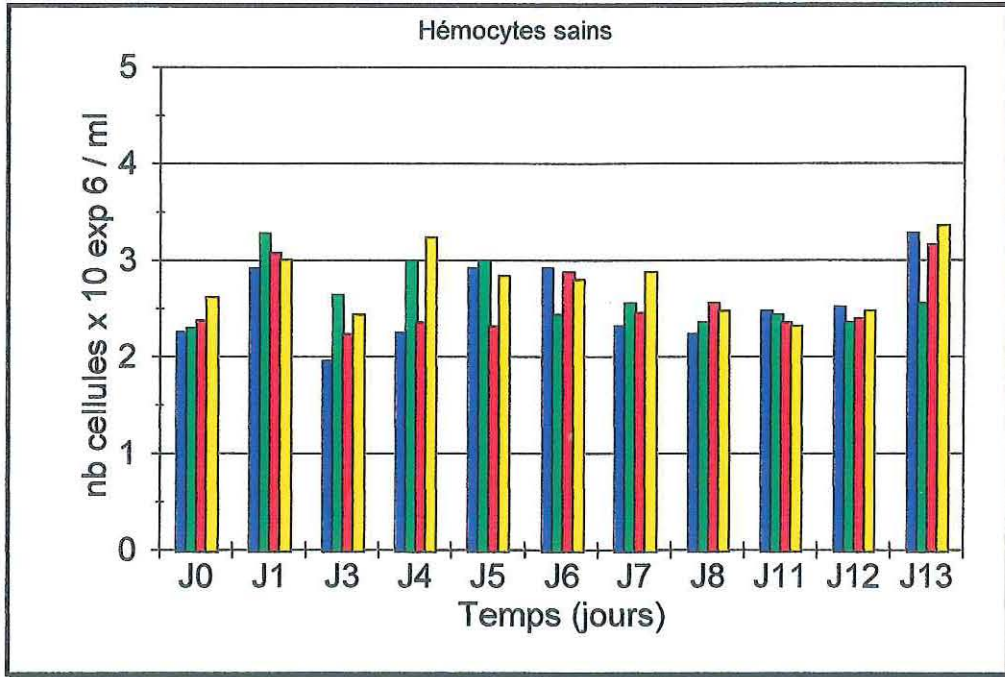


### FIGURE 7. Expérience 3

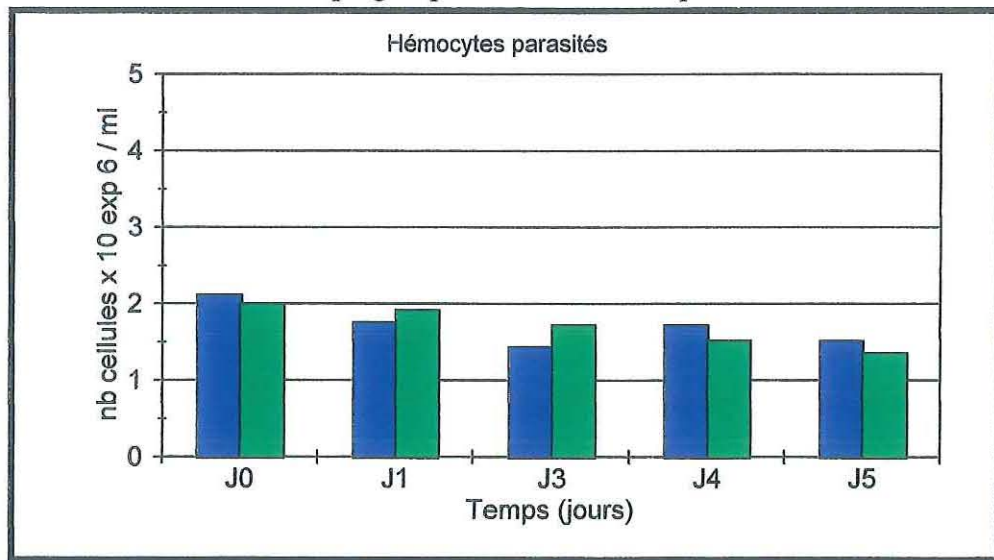
#### PRIMOCULTURE D'HEMOCYTES D'*OSTREA EDULIS*

Nombre total d'hémocytes sains et parasités par puits

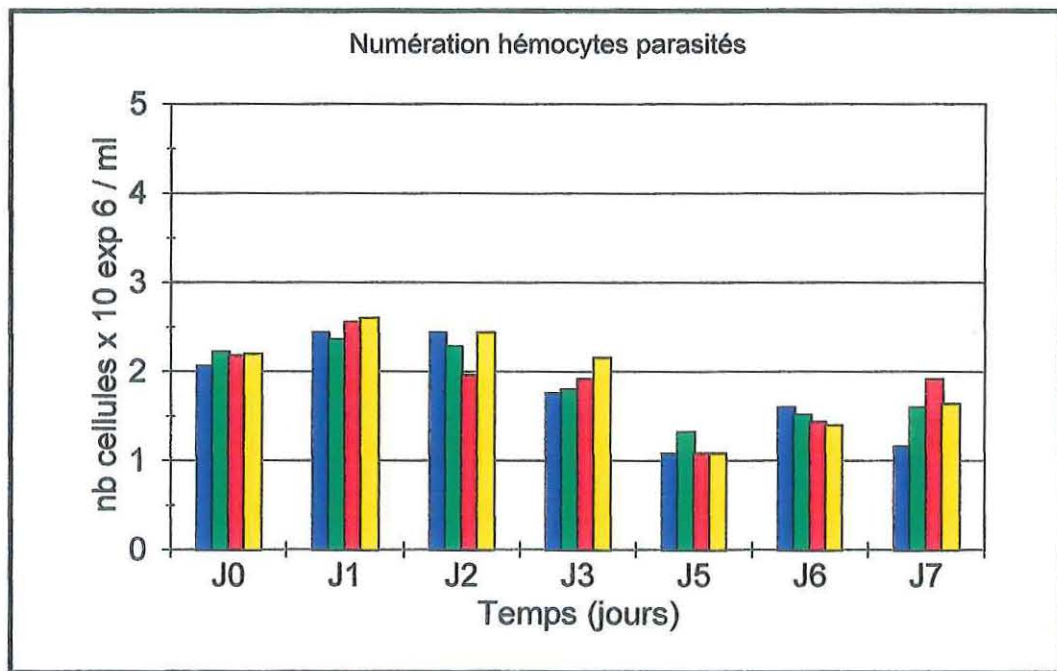
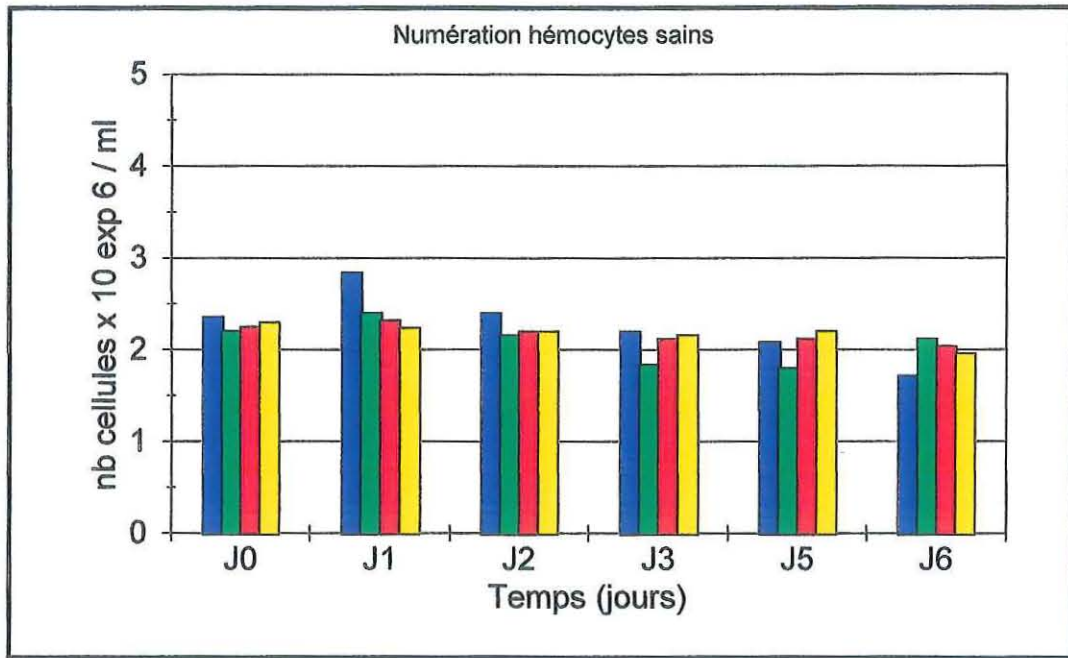
Comptages quotidiens sur quatre puits



Comptages quotidiens sur deux puits

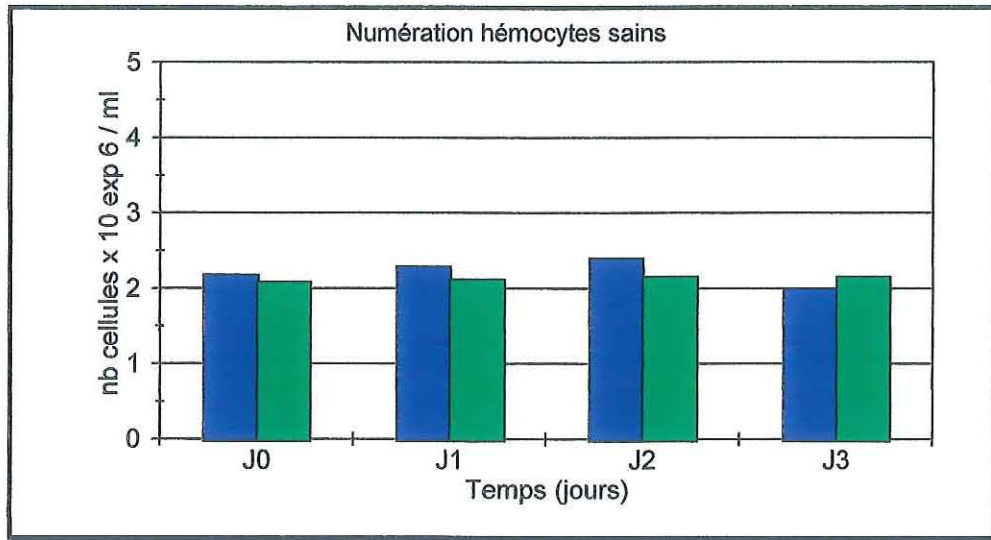


**FIGURE 8. Expérience 4**  
**PRIMOCULTURE D'HEMOCYTES D'OSTREA EDULIS**  
 Nombre total d'hémocytes sains et parasités par puits  
 Comptages quotidiens sur quatre puits

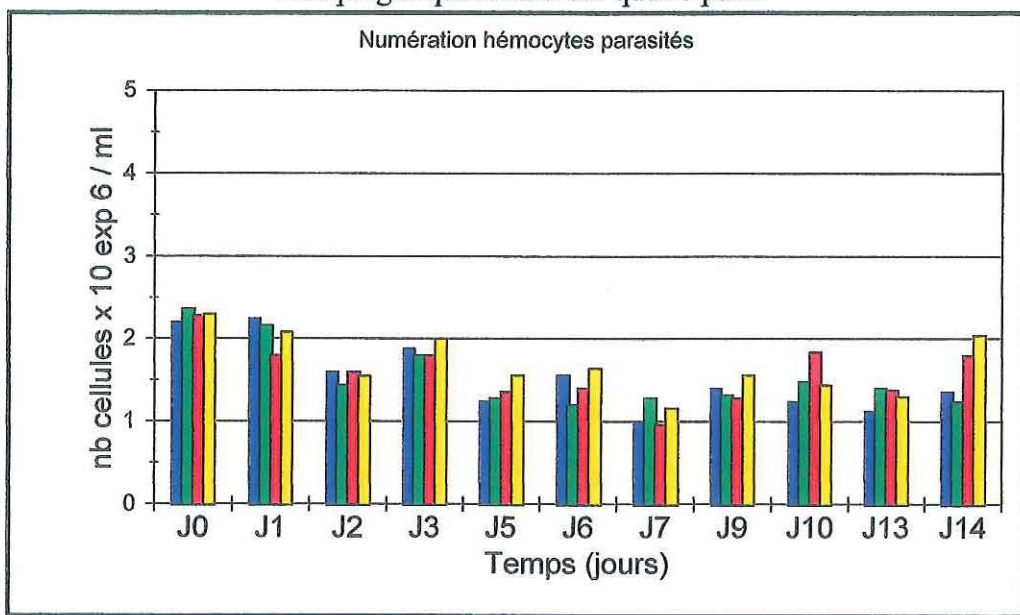


**FIGURE 9. Expérience 5**  
**PRIMOCULTURE D'HEMOCYTES D'OSTREA EDULIS**

Nombre total d'hémocytes sains et parasités par jour  
 Comptages quotidiens sur deux puits



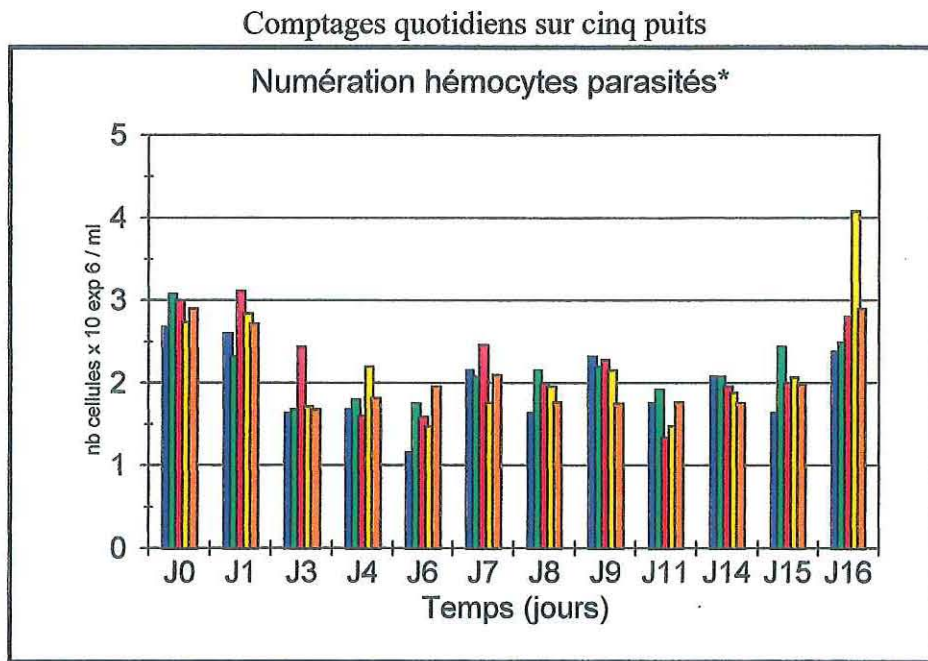
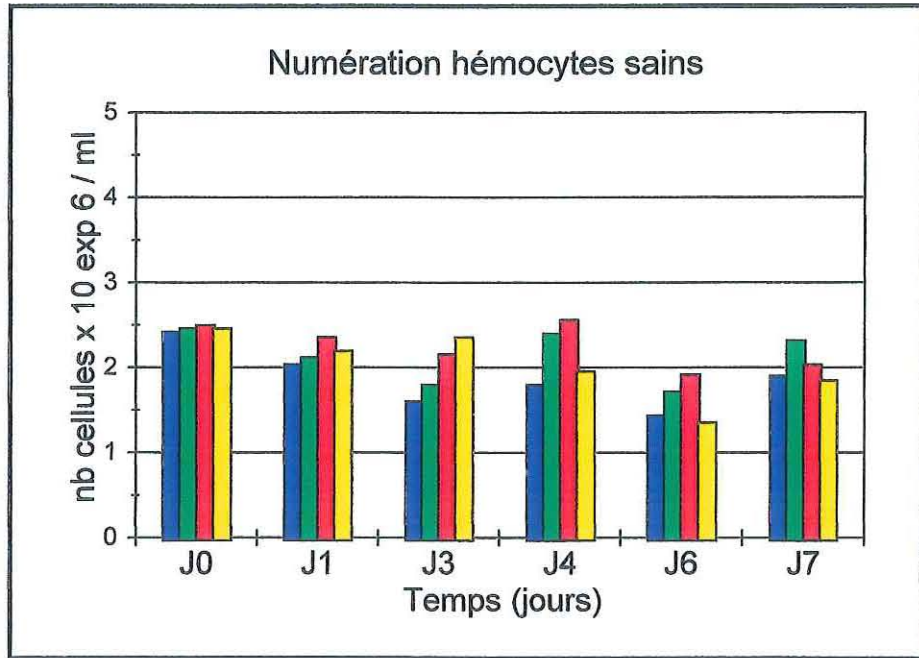
Comptages quotidiens sur quatre puits



## FIGURE 10. Expérience 6

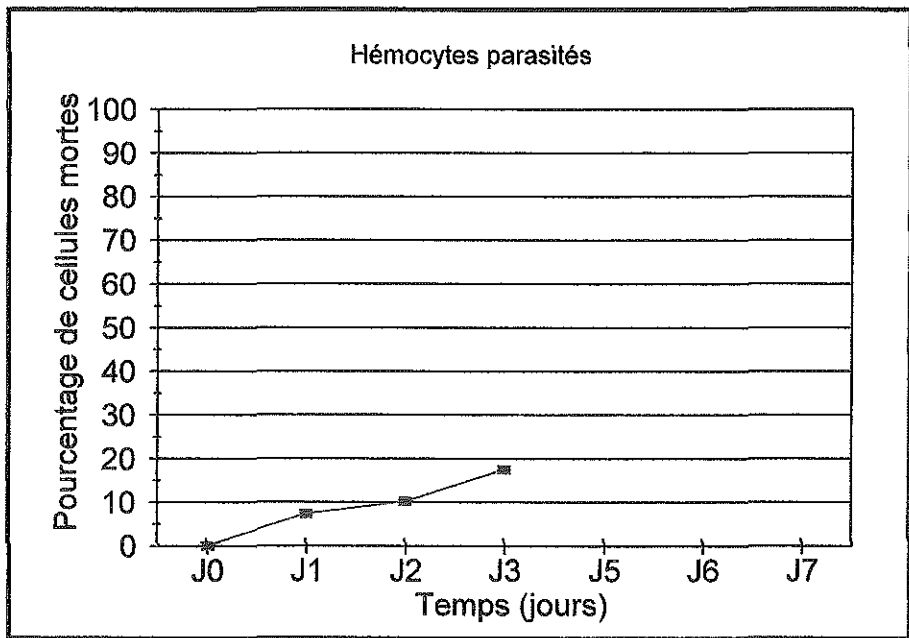
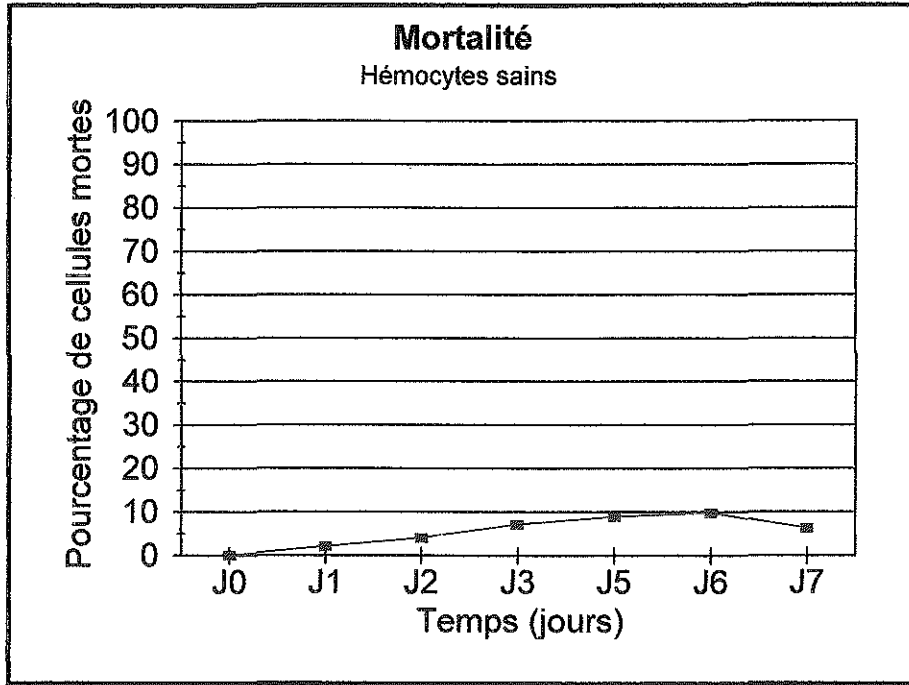
### PRIMOCULTURE D'HEMOCYTES D'*OSTREA EDULIS*

Nombre total d'hémocytes sains et parasités par jour  
Comptages quotidiens sur quatre puits

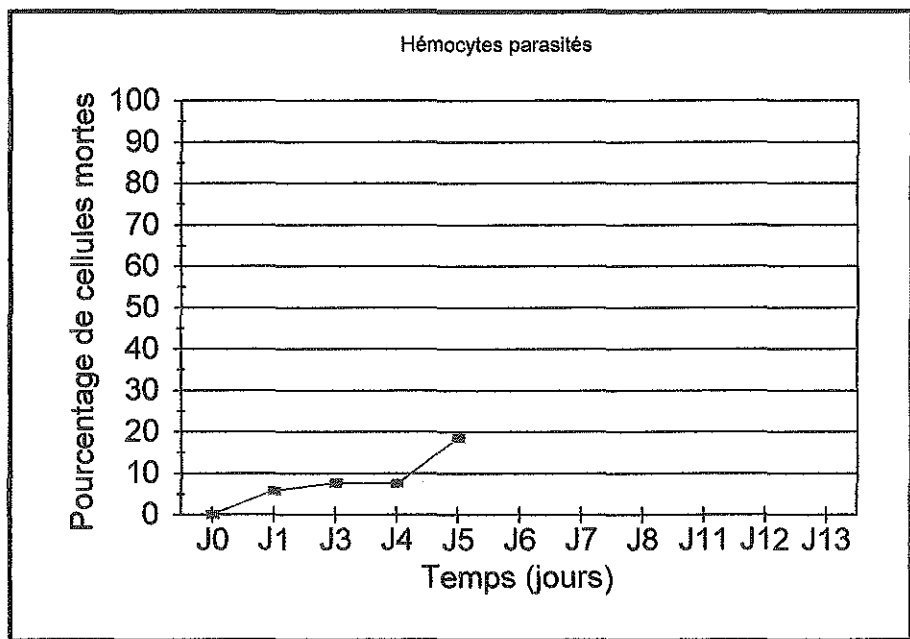
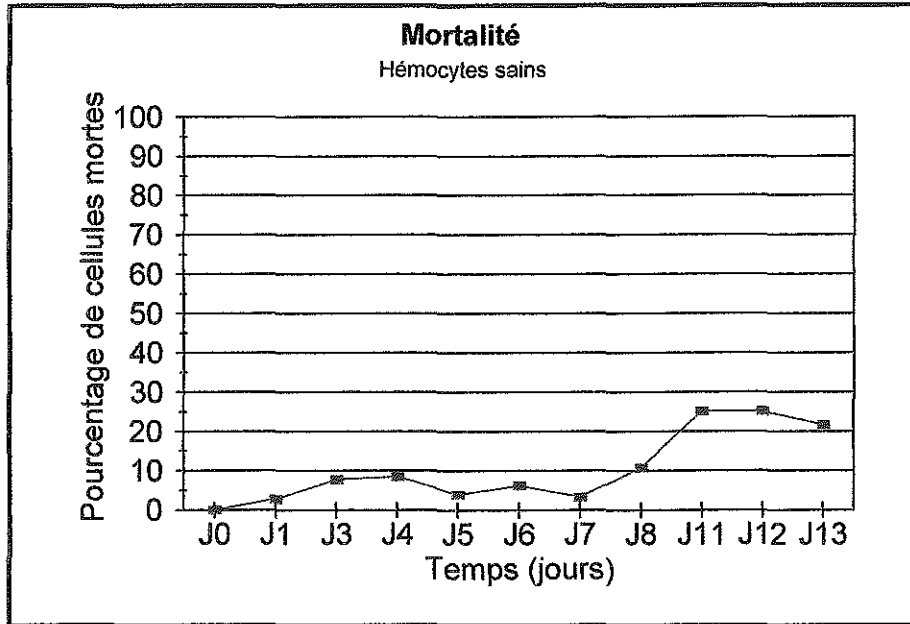


\*Numération hémocytes parasités (Néoplasie)

**FIGURE 11. Expérience 2**

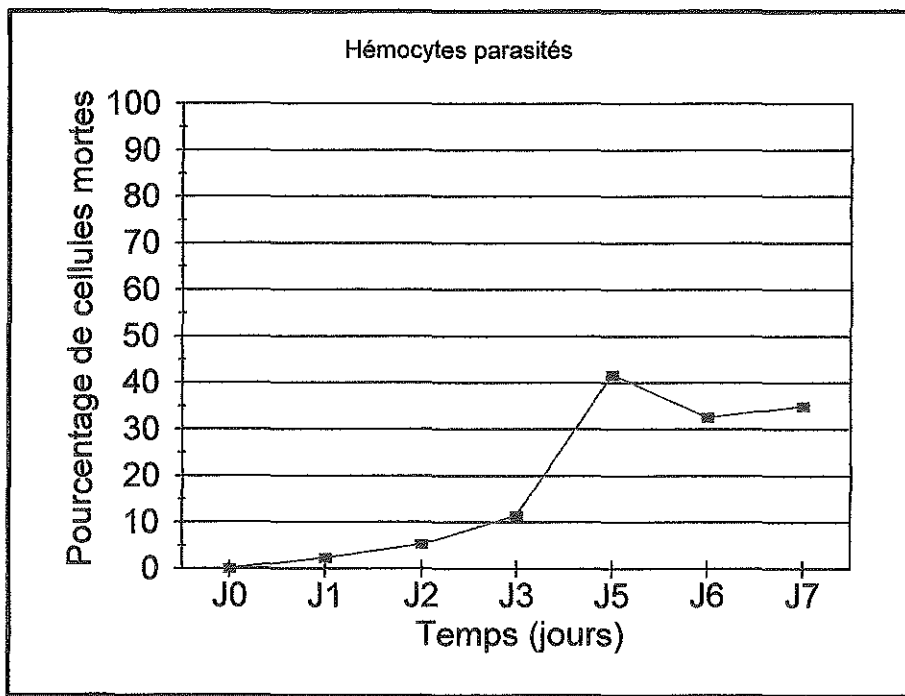
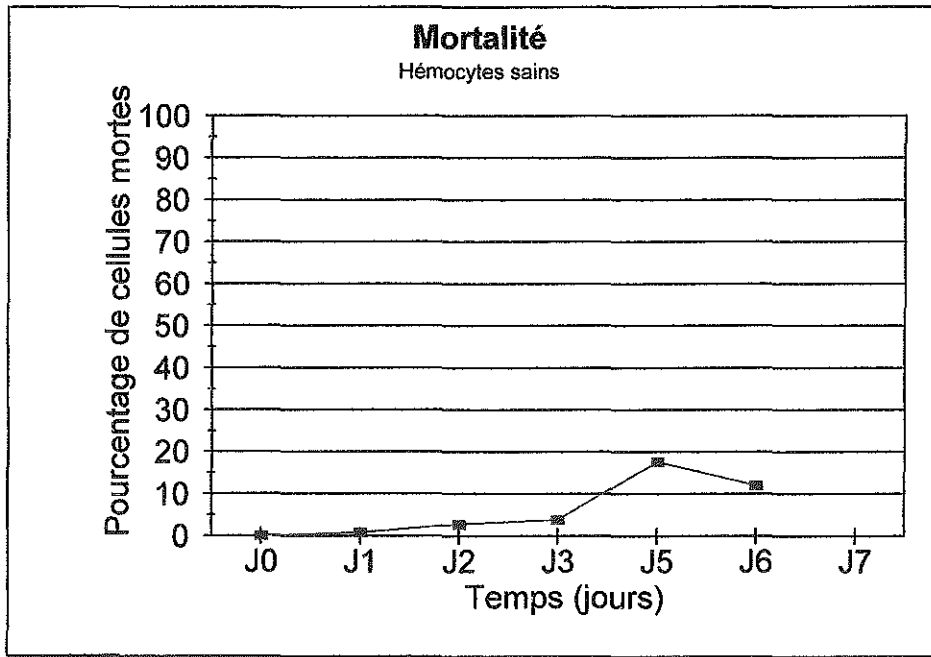


**FIGURE 12. Expérience 3**

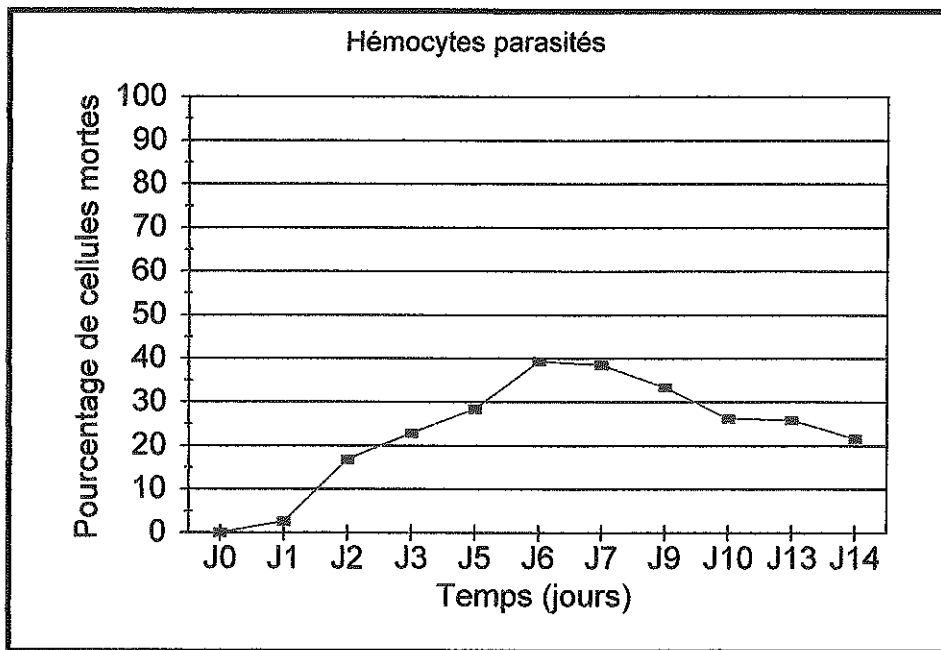
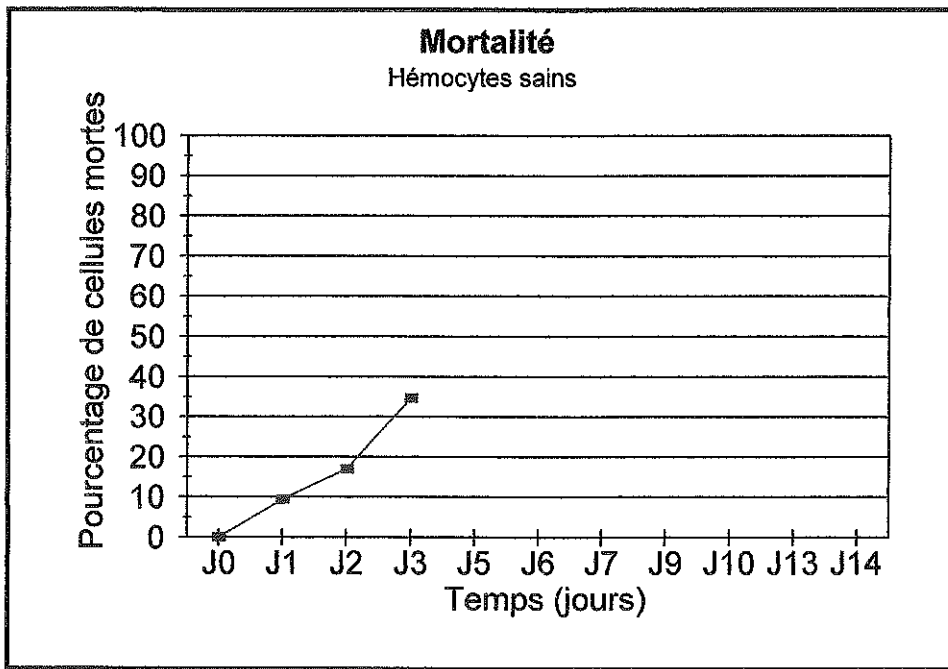




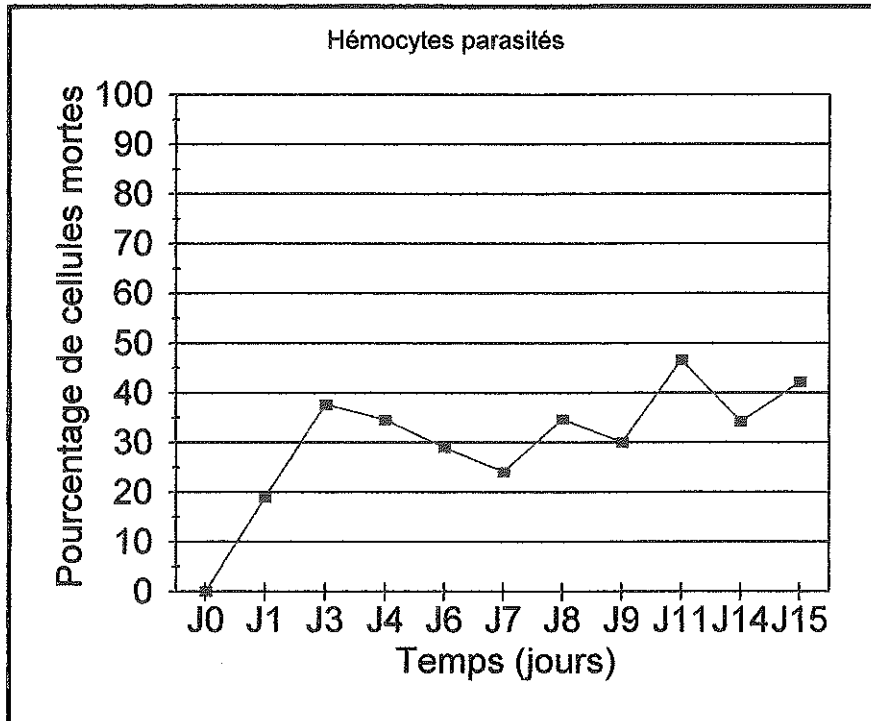
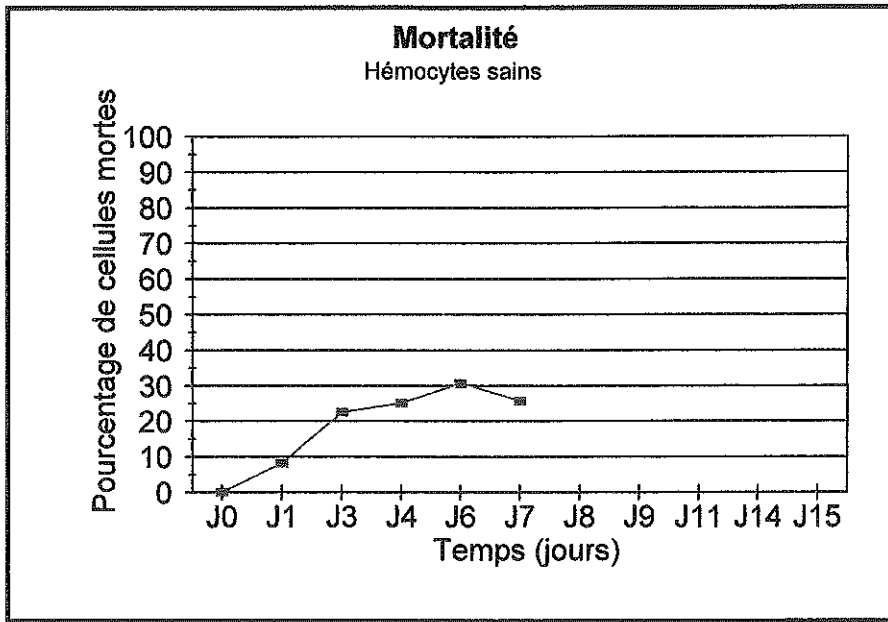
**FIGURE 13. Expérience 4**



**FIGURE 14. Expérience 5**



**FIGURE 15. Expérience 6**



## 2. 3. Caractérisation morphologique des différents types hémocytaires

- Cytocentrifugation

Trois grands groupes cellulaires ont été identifiés sur la base de leur morphologie sur préparations cytocentrifugées : les granulocytes, les cellules agranuleuses et les petits hyalinocytes.

Les petits hyalinocytes (Fig. 16) se distinguent des autres cellules par un rapport nucléocytoplasmique élevé, mais variable. Ces cellules possèdent un cytoplasme basophile réduit à une mince auréole autour du noyau. Quelques cellules présentent de courts prolongements cytoplasmiques.

Les hémocytes granuleux se caractérisent par l'aspect très hétérogène de leur cytoplasme qui contient des granulations en nombre et de forme variables. De taille homogène (environ 10  $\mu\text{m}$ ), ils possèdent un rapport nucléocytoplasmique faible (Fig. 17).

Les cellules agranuleuses possèdent un cytoplasme d'aspect homogène, qui peut contenir quelques vacuoles claires. Leur taille varie de 10 à 15  $\mu\text{m}$ , elles présentent un rapport nucléocytoplasmique faible (Figs. 17).

**Observation des différents types hémocytaires,  
après cytocentrifugations**

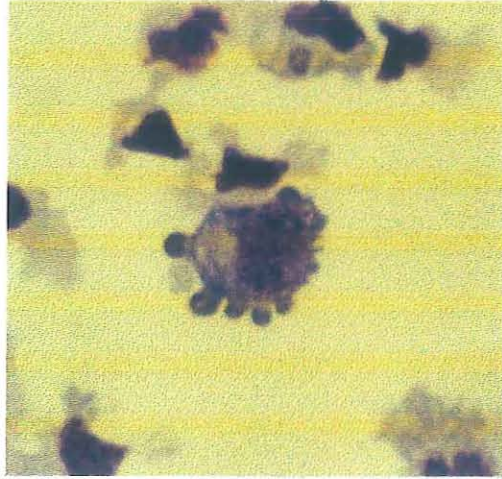


Fig. 16. Petit hyalinocyte avec prolongements cytoplasmiques.  
(Gx1000)

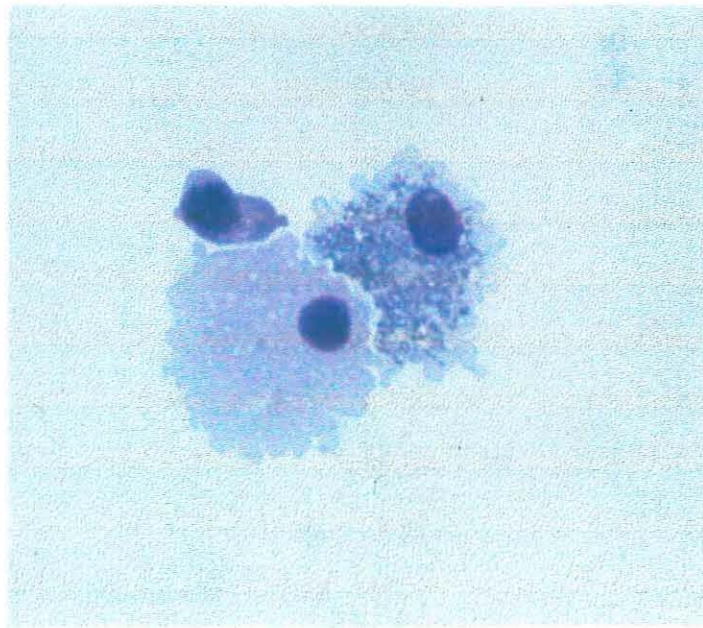


Fig. 17. Les trois différents types hémocytaires : granulocyte, cellule agranuleuse et petit hyalinocyte. (Gx1000)

## 2. 4. Comparaison des formules d'hémocytes sains et parasités

Le comptage des différents types hémocytaires, c'est-à-dire le pourcentage des granulocytes, des grandes cellules agranuleuses et des petits hyalinocytes a été réalisé quotidiennement par observation d'un minimum de 100 cellules pour les différentes expériences réalisées. Les histogrammes des figures 18, 19, 20, illustrent les résultats obtenus lors des expériences 3, 5 et 6.

### ① Formule hémocytaire

#### • Hémocytes sains :

La répartition de la population des granulocytes, des grandes cellules agranuleuses et des petits hyalinocytes, reste constante au cours du temps.

En effet, lors de la expérience 3 (Figure 18), à J0, les pourcentages de ces trois populations sont respectivement de 45, 50, et 5 % et à J13 de 41, 52, 7 %, avec peu de variations au cours de ce laps de temps.

Sur les figures 19 et 20, la même répartition des populations hémocytaires au cours du temps est observée.

#### • Hémocytes parasités :

Sur la figure 18, de la troisième expérience, de J1 à J3, une diminution du nombre de cellules agranuleuses, et une augmentation du nombre de granulocytes sont observables, le pourcentage de petits hyalinocytes étant constant.

En effet, le nombre de cellules agranuleuses passe de 60 % (J0) à 20 % (J3), et le nombre de granulocytes de 40 % (J0) à presque 80 % (J3).

Dans les jours qui suivent, (J4 et J5), le nombre de cellules agranuleuses et de granulocytes est pratiquement identique à celui observé à J3 (A : 20 % et G : 80 %).

Cette diminution du nombre de cellules agranuleuses et cette augmentation du nombre de granulocytes est également observées sur les figures 19 et 20, mais cette variation se fait plus progressivement que lors de l'expérience 3. Pour la deuxième et troisième manipulation, le nombre de cellules agranuleuses passe de 50 % (J0) à 35 % (J2-J3), puis à 20 % (J7) et se stabilise à cette valeur. Le nombre de granulocytes passe de 45 % (J0) à 60 % (J2-J3), puis à 70 % (J7) et se stabilise.

### ② Taux d'infestation

Le comptage des types hémocytaires infestés par le parasite *Bonamia ostreae* a été réalisé sur cellules mises en culture provenant d'animaux parasités. Les trois populations cellulaires : granulocytes, cellules agranuleuses et petits hyalinocytes, sont infestés par le parasite.

Pour l'expérience 5, des granulocytes infestés ont été observés lors des premiers jours, à J0, J1 et J2 (sur un ensemble de 14 jours). Le pourcentage de granulocytes infestés est faible, il est de l'ordre de 2-3 %. (Figure 21)

Par contre, des cellules agranuleuses infestées ont été observées tous les jours de la manipulation et elles représentent environ 5 à 10 % des cellules agranuleuses (Figure 22).

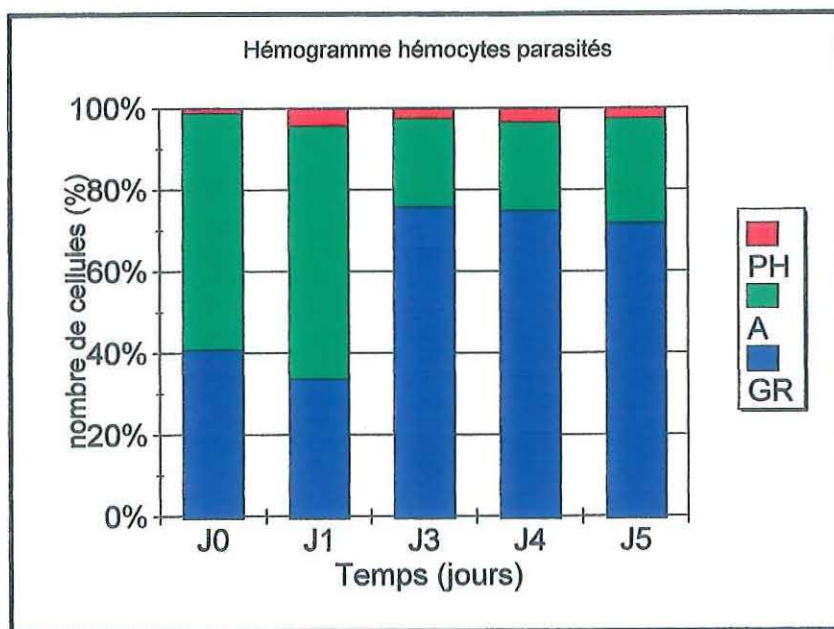
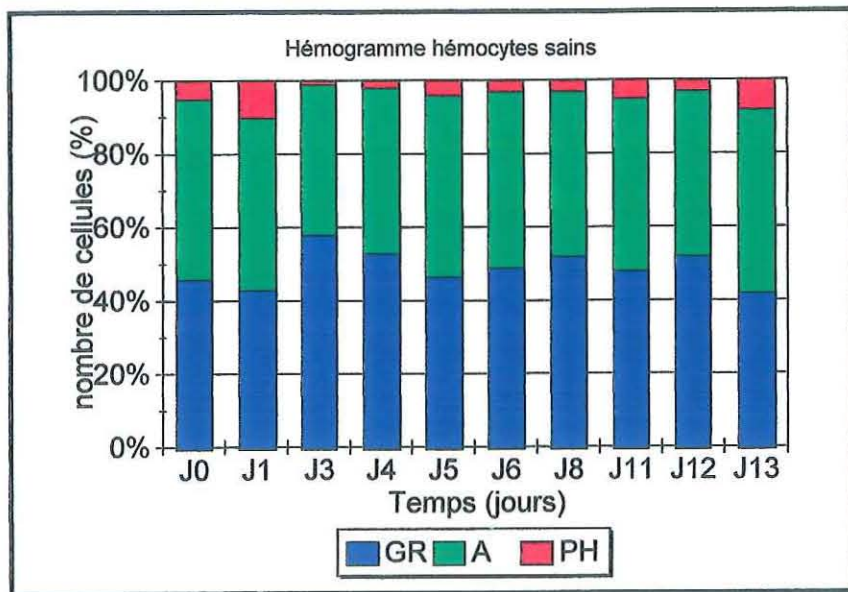
Seuls quelques rares petits hyalinocytes infestés ont été observés.

Pour l'expérience 6 (Figure 23), les granulocytes infestés ne sont observés qu' à J0 et représentent environ 5 % des granulocytes totaux.

Par contre, des cellules agranuleuses infestées sont observées chaque jour de la manipulation, de J0 à J15. Cependant, le pourcentage de cellules infestées varie au cours du temps ( entre 10 et 2-3 %) avec une certaine périodicité.

# HEMOGRAMME 1

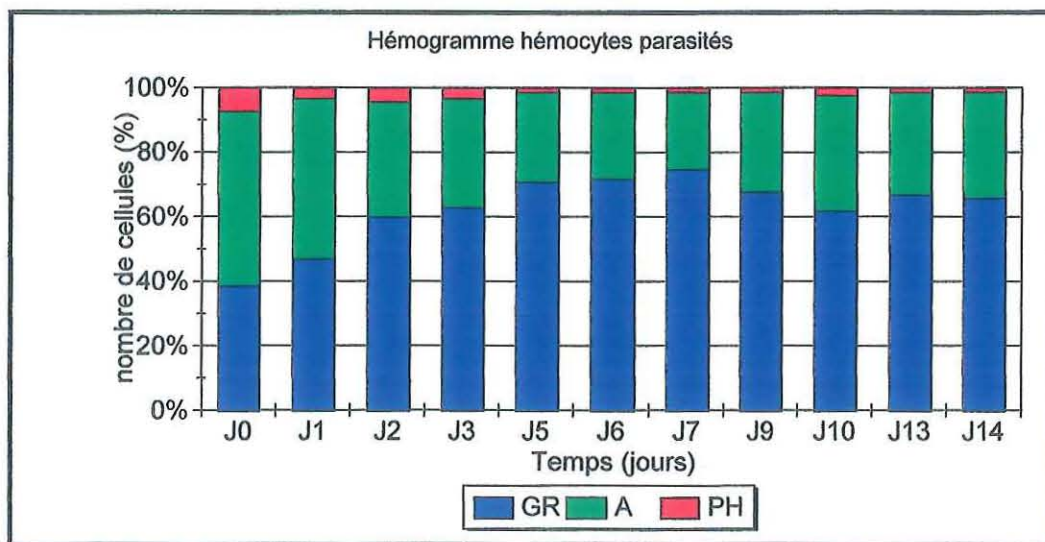
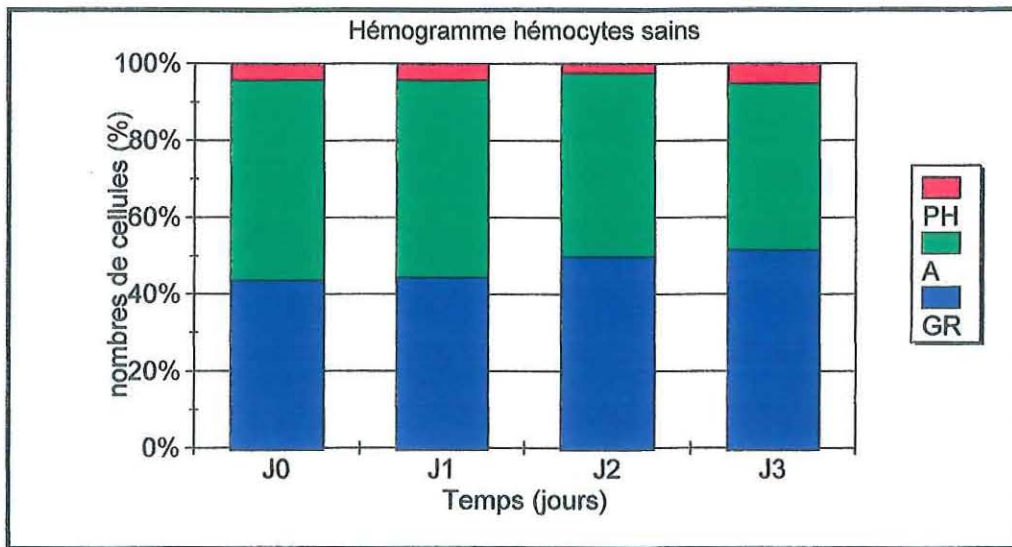
## FIGURE 18





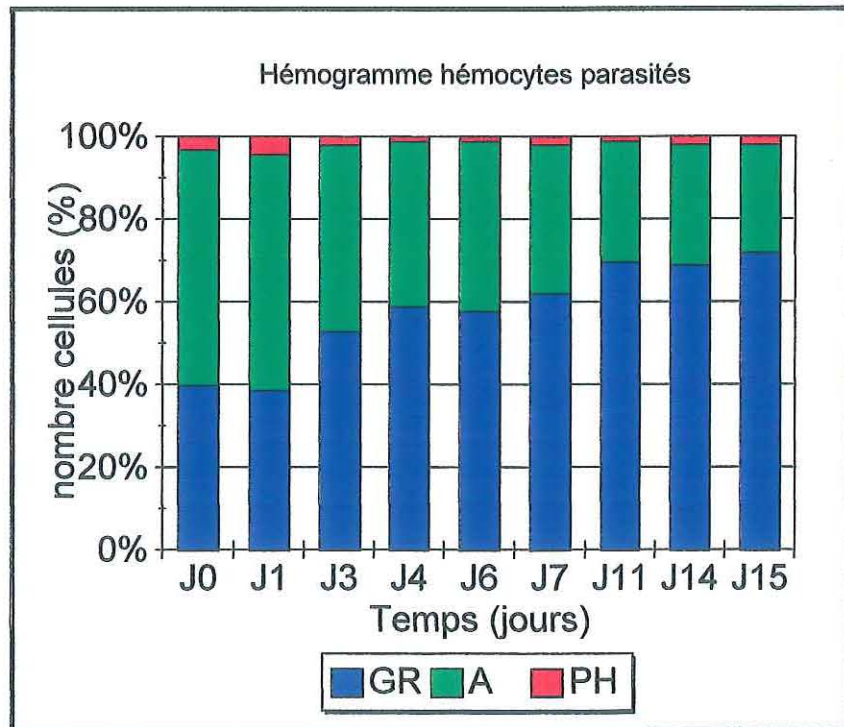
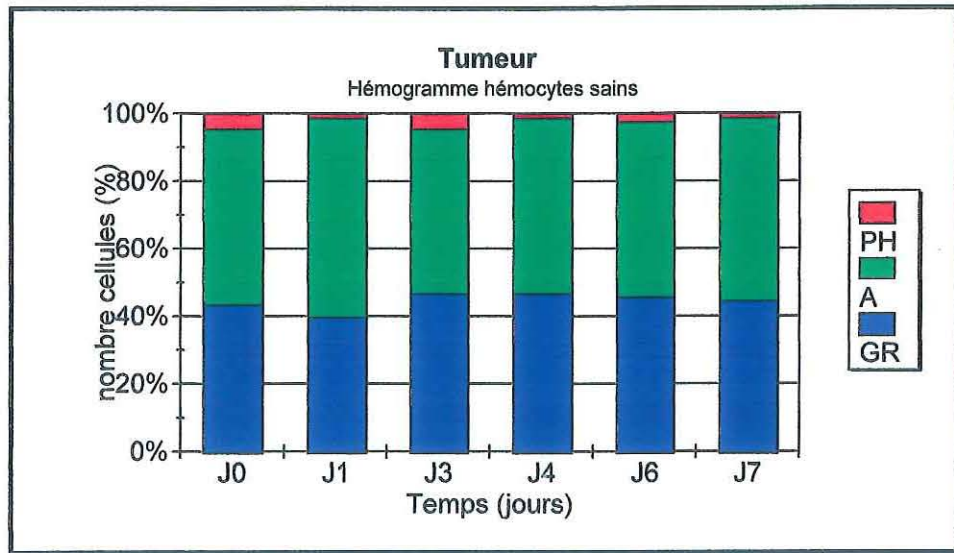
## HEMOGRAMME 2

Figure 19



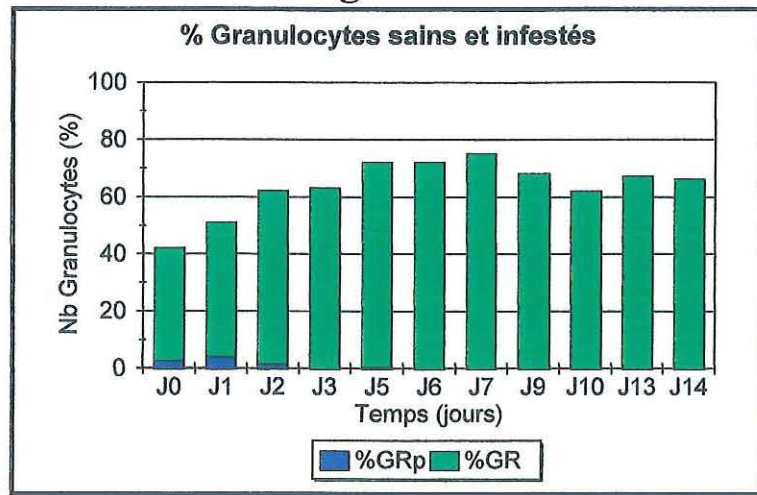
# HEMOGRAMME 3

## Figure 20

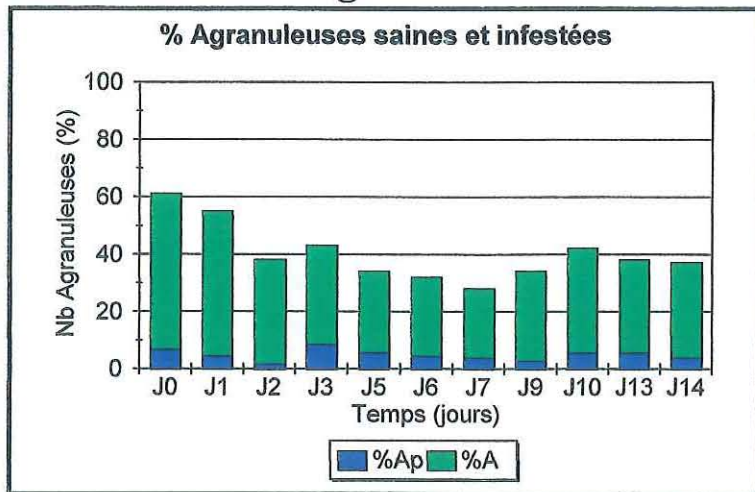


## Taux d'infestation des différents types hémocytaires

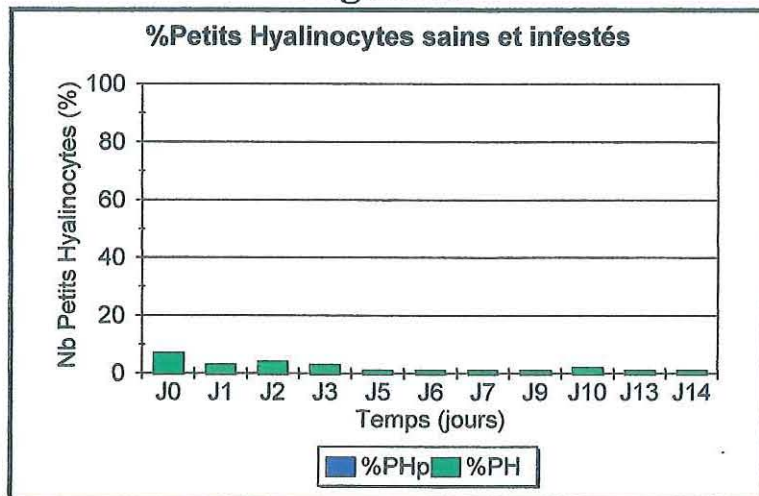
### Figure 21



### Figure 22



### Figure 23



## 2. 5. Analyse ultrastructurale des hémocytes

L'ultrastructure des hémocytes sains et des hémocytes parasités est conservée à plusieurs jours de culture.

### 3. Primoculture des différents types d'hémocytes séparés

#### 3. 1. Séparation des différents types hémocytaires

Après séparation, trois populations sont obtenues: granulocytes, agranuleuses et petits hyalinocytes et un mélange des trois types hémocytaires.

#### Coupes semi-fines des populations d'hémocytes séparées (Bleu de toluidine)

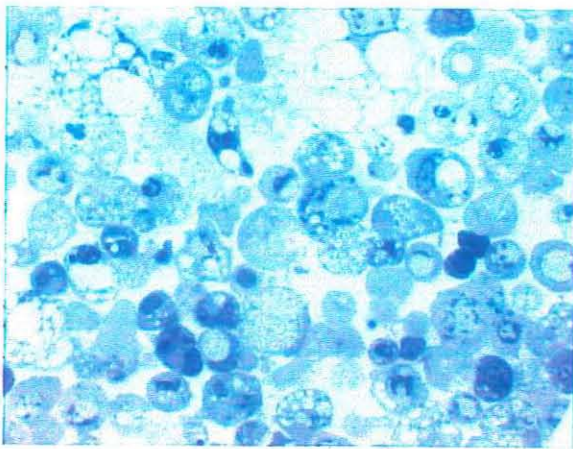


Fig. 24. Population hémocytaire, avant séparation. (Gx1000)

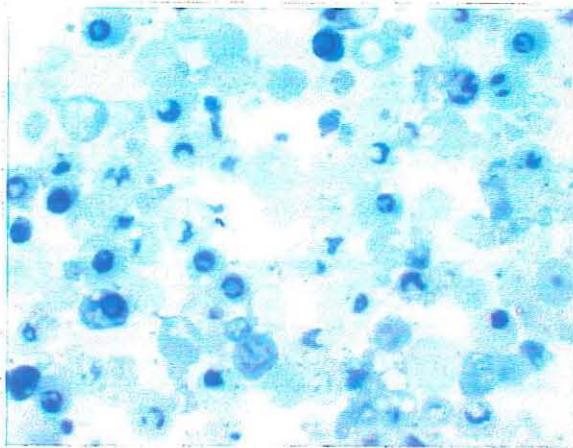


Fig. 25. Cellules agranuleuses et petits hyalinocytes. (Gx1000)

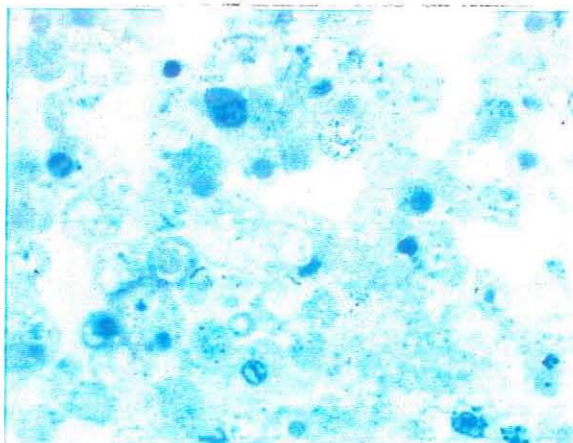


Fig. 26. Granulocytes. (Gx1000)

### 3. 2. Mise en culture des populations séparées

Après avoir récupéré les différentes populations hématocytaires, celles-ci sont mises en culture dans le milieu L15-Elsevier, à raison de 500000 cellules par puits.

### 3. 3. Comptages et cytocentrifugations

- Numération

Une diminution du nombre des trois types hématocytaires par millilitre de milieu est observée. Le nombre de cellules agranuleuses et de petits hyalinocytes est constant pendant les huit jours de culture.

Le nombre de granulocytes après séparation est insuffisant pour réaliser une numération sur plusieurs jours.

- Cytocentrifugations

Grâce à ce protocole de séparation des types hématocytaires, un enrichissement en petits hyalinocytes est obtenu (35% du nombre total de cellules).

Remarque : cette expérience de primoculture n'a été réalisée qu'une fois et les résultats obtenus sont à confirmer.

## 4. Cytochimie

Les résultats de recherche de différentes activités enzymatiques par l'intermédiaire de différentes techniques sont rapportés dans ce chapitre.

### 4. 1. Système API ZYM

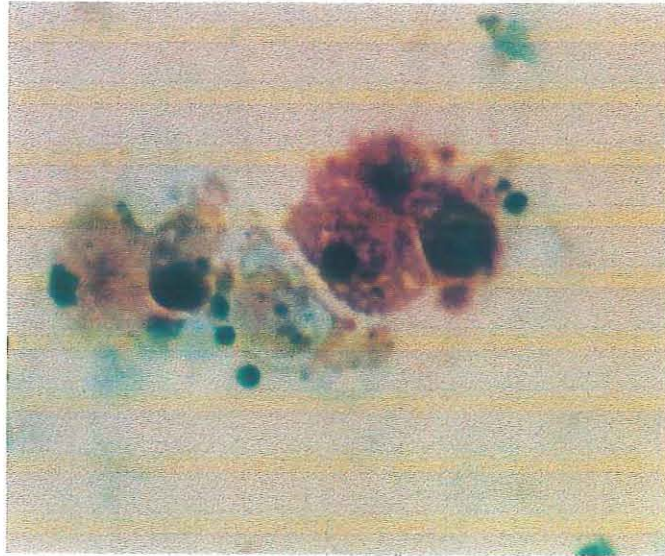
L'intensité des réactions enzymatiques, en relation avec la quantité d'enzyme présente, est estimée visuellement à l'aide d'une échelle de lecture fournie dans le kit.

Interprétation des tests

N°	Enzyme recherchée	Quantité de substrat hydrolysé (nmoles)	
		Hémocytes sains	Hémocytes parasités
1	Témoin	0	0
2	Phosphatase alcaline	10	≥40
3	Estérase (C4)	≥40	20
4	Estérase lipase (C8)	20	10
5	Lipase (C14)	5	5
6	Leucine arylamidase	≥40	≥40
7	Valine arylamidase	≥40	≥40
8	Cystine arylamidase	20	20
9	Trypsine	0-5	0-5
10	α Chymotrypsine	0-5	0-5
11	Phosphatase acide	30	30
12	Naphtol AS BI phosphohydrolase	5	20
13	α Galactosidase	0	0
14	β Galactosidase	≥40	≥40
15	β Glucuronidase	15	≥40
16	α Glucosidase	0-5	0-5
17	β Glucosidase	0	0
18	N-acétyl-β glucosaminidase	20	20
19	α Mannosidase	0-5	0-5
20	α Fucosidase	15	15

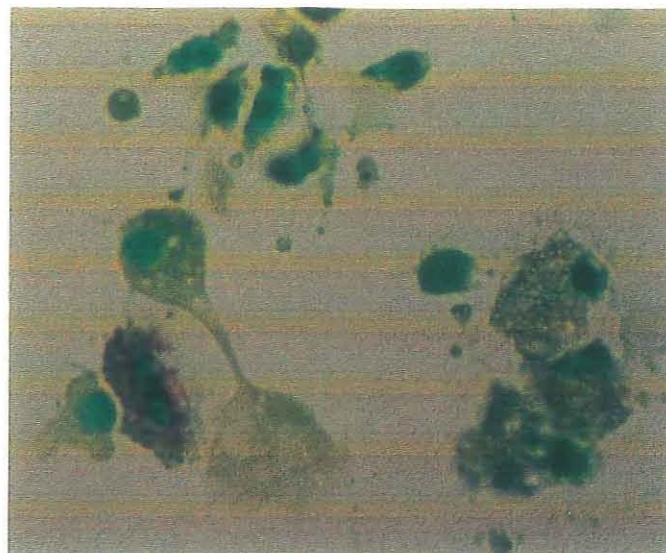
#### 4. 2. Cytocentrifugation

- *α-Naphtyl butyrate estérase*



L'activité de l'enzyme se manifeste par un marquage rouge des granulocytes, et essentiellement de leur granulations. Les autres types hémocytaires, non marqués , sont de couleur bleue-verte.

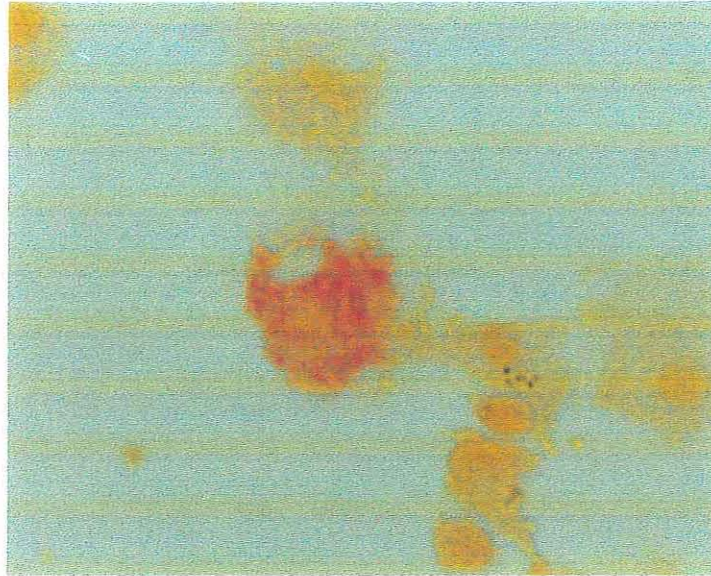
- *β-glucuronidase*



Une forte activité enzymatique est localisée dans des granulations de grande taille; elle est visualisée en rouge alors que les autres types hémocytaires sont colorés en vert.

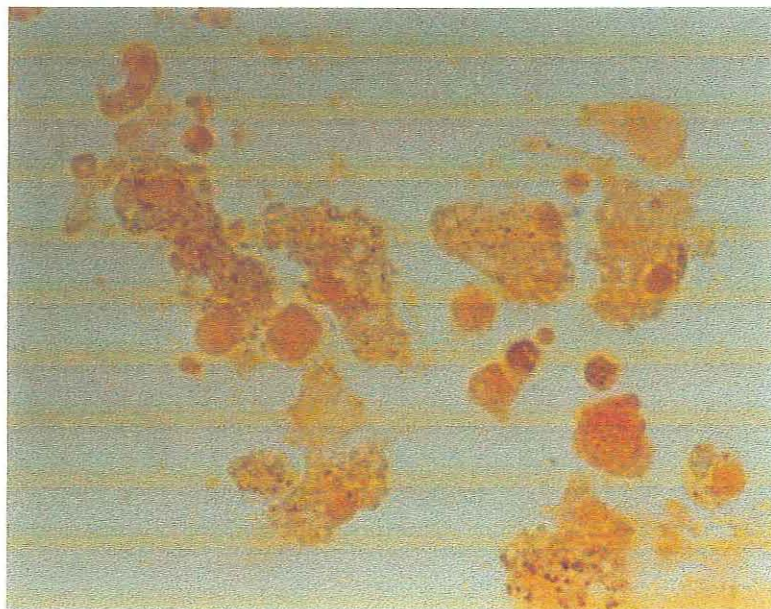


- *Naphtol AS-D chloroacétate estérase*



Cette activité enzymatique est seulement localisée dans un certain type de granulations, marquées en rouge. Les cellules agranuleuses, petits hyalinocytes et granulocytes réfringents ne sont pas marqués, ils sont colorés en jaune.

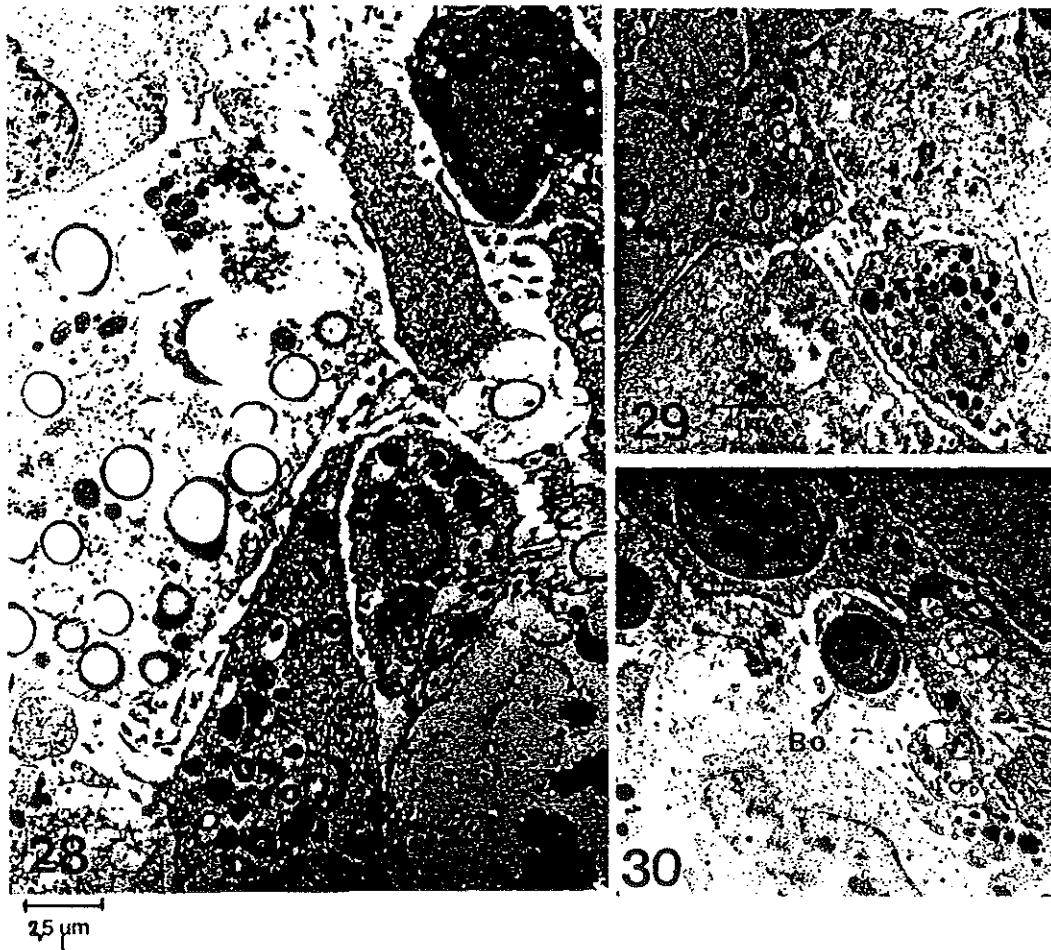
- *$\alpha$ -Naphthyl acétate estérase*



L'activité de cette enzyme se manifeste par un faible marquage noir de certaines granulations. Cependant, beaucoup de granulocytes ne sont pas marqués.

#### 4.3. MET

- L'activité de la *Glycérophosphatase*, étudiée selon le protocole pour les invertébrés marins de Barka et Anderson, n'a pas été localisée sur les hémocytes.
- Localisation de l'activité de la  $\beta$ -*Glycérophosphatase*, selon le protocole de Robinsori-Karnovsky

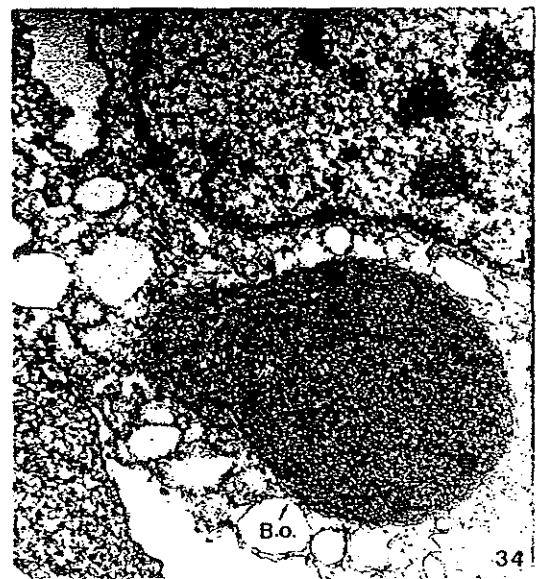
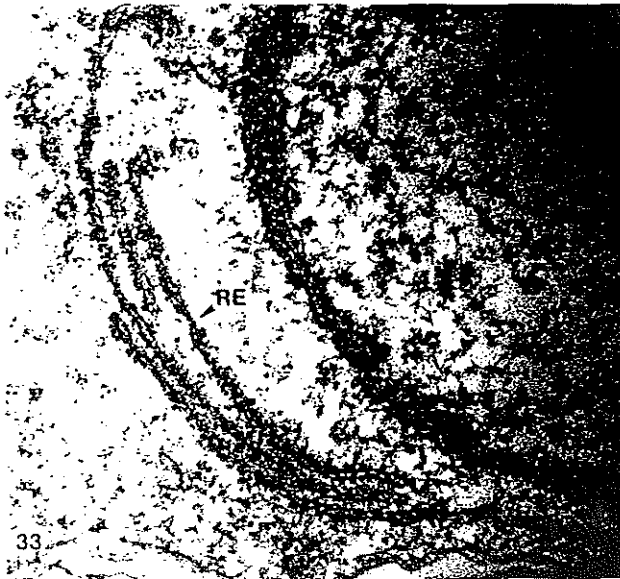


Figs. 28 et 29. Localisation de l'activité enzymatique sur des granulations de grande taille.

Fig. 30. Localisation de l'activité enzymatique dans le cytoplasme du parasite.

2 μm

• *Cytidine monophosphatase*



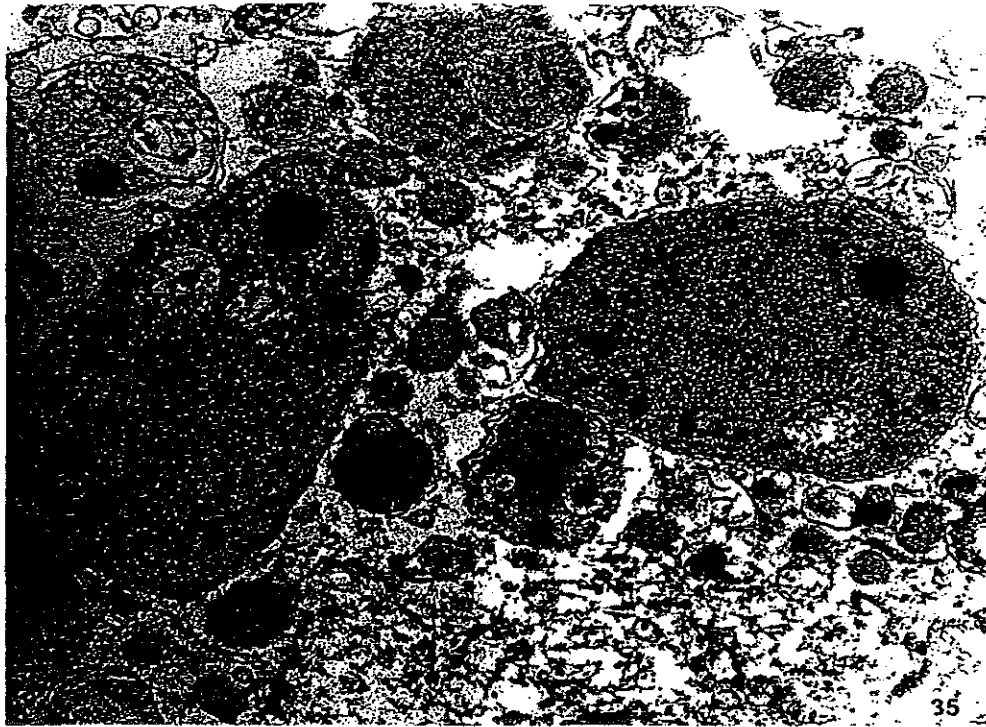


Fig. 31. Localisation de l'activité enzymatique sur la membrane nucléaire et le réticulum endoplasmique.  $\overline{16\mu\text{m}}$

Figs 32 et 33. Détails du marquage enzymatique sur le réticulum endoplasmique.

Fig. 34. Localisation enzymatique dans le cytoplasme du parasite.  $\overline{0.6\mu\text{m}}$

Fig. 35. Localisation de l'activité enzymatique au niveau de la membrane nucléaire du parasite.  $\overline{0.5\mu\text{m}}$

• *Thiamine pyrophosphatase*

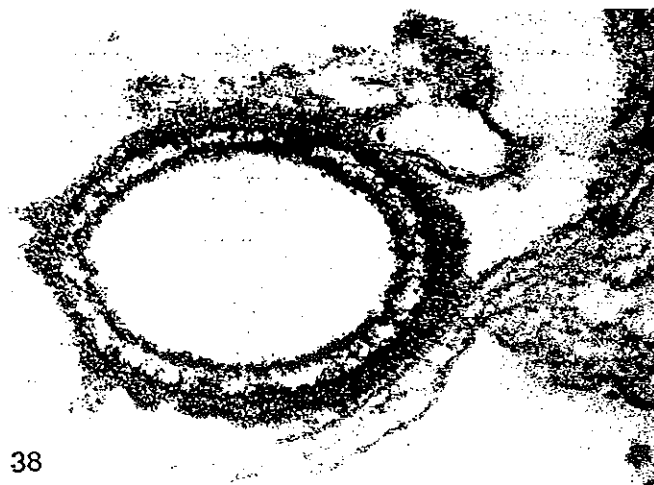


Fig 36. Localisation de l'activité enzymatique dans la lumière de granulations.

Figs 37 et 38. Détails de marquage enzymatique au niveau des granulations.

# DISCUSSION

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les résultats reproductibles obtenus à partir des numérations d'hémocytes sains, mis en culture séparément dans le milieu L15-Alsever additionné d'antibiotiques à la concentration 2X et de sérum de veau foetal 10 %, confirment des résultats déjà obtenus. A savoir que ce milieu de primoculture, sans renouvellement de milieu, permet le maintien et la survie des hémocytes pendant plus d'une dizaine de jours. Même s'il n'y a pas de pic de croissance entre 24 et 48 heures de culture, comme il a été décrit, on peut tout de même observer une croissance cellulaire à différents temps, suivant les expériences.

De plus, le faible pourcentage de mortalité pendant une semaine de culture, permet un intervalle de temps suffisant pour étudier les mécanismes de défense, comme la phagocytose.

Le comptage du nombre de cellules parasitées, mises en culture dans le milieu L15-Alsever, montre que celui-ci diminue au cours du temps. De plus, la mortalité de ces cellules est bien plus importante que celle des cellules saines. Par conséquent, cela laisse à penser que les hémocytes parasités ne meurent pas à cause du milieu dans lequel ils sont mis en culture, mais plutôt à cause de leur infestation par *Bonamia ostreae*, qui induirait la mort des cellules dans lesquelles il se trouve. De plus, il est intéressant de noter que ce milieu permet également la survie du parasite, et il a même été observé lors d'une expérience, un cycle de croissance de ce parasite.

Au vu de ces résultats, il est apparu intéressant de savoir si un type de cellule particulier était touché par ce phénomène de mortalité du à l'infestation par *Bonamia ostreae*.

La reconnaissance de trois types cellulaires a déjà été décrite dans la littérature. La technique de cyto centrifugation donne de bons résultats morphologiques et a permis de retrouver ces trois types : les granulocytes, les cellules agranuleuses, et les petits hyalinocytes. Cependant, il existe des différences morphologiques au sein des populations, comme différentes sortes de granulations chez les granulocytes ou des différences de forme chez les petits hyalinocytes (comme des prolongements cytoplasmiques), qui laisseraient supposer l'existence de sous-populations.

La technique de cyto centrifugation a permis de déterminer la répartition hémocytaire des hémocytes sains et parasités au cours du temps. Les résultats des hémogrammes montrent que dans ces conditions de culture, les hémocytes sains ont la même répartition cellulaire au cours

du temps. Les pourcentages de cellules agranuleuses, de granulocytes et de petits hyalinocytes restent constants, pendant une dizaine de jours. Cette formule a déjà été décrite *in vivo*, chez les huîtres sensibles à l'infestation par *Bonamia ostreae*.

Les formules hémoctaires de cellules parasitées varient à partir du troisième jour de culture. En effet, il apparaît alors une diminution irréversible durant six jours, du nombre de cellules agranuleuses et une augmentation du nombre de granulocytes, le nombre de petits granulocytes restant constant. Cette modification de la répartition peut s'expliquer soit par une augmentation réelle du nombre de granulocytes, soit par une augmentation compensative de la destruction de cellules agranuleuses. La seconde hypothèse semble la plus adaptée car la numération n'a pas montré d'augmentation significative du nombre d'hémocytes parasités.

De plus, il est intéressant de remarquer qu'aux premiers jours de primoculture (J0-J1), les hémocytes sains et parasités ont la même formule hémoctaire. Cela est probablement dû au fait que le pourcentage de cellules parasitées est faible, et à un stade précoce d'infestation. Le fait de la proximité des cellules en culture facilite sûrement l'infestation des cellules.

Il serait intéressant par la suite, de travailler sur populations séparées pour vérifier les résultats obtenus, et notamment la diminution du nombre de cellules agranuleuses chez les hémocytes parasités, et de travailler sur des populations ayant un degré d'infestation à *Bonamia* bien défini.

L'étude du taux d'infestation de chaque type hémoctaire montre que les cellules agranuleuses sont les hémocytes les plus parasités. Deux hypothèses peuvent alors être émises : soit le parasite ne peut entrer dans les granulocytes, soit il rentre dans ceux-ci et est ensuite détruit. La première hypothèse semble écartée car bien que le pourcentage de granulocytes soit faible, ce type cellulaire est trouvé infesté dans les préparations observées.

L'ensemble de ces résultats obtenus lors des primocultures confirment les résultats obtenus *in vivo* lors de la comparaison d'animaux résistants et d'animaux sensibles, et qui amèneraient à penser que le parasite est plus apte à se multiplier dans un type cellulaire particulier : les cellules agranuleuses.

Il est alors paru intéressant de savoir si l'équipement enzymatique des différents types cellulaires pouvait corroborer ces observations, et la recherche d'hydrolases acides a été menée afin de tenter d'analyser les rôles respectifs des types cellulaires dans les phénomènes de dégradation phagocytaire.



Le système API ZYM a permis tout d'abord une approche générale et facile à mettre en oeuvre de la présence de douze enzymes chez les hémocytes sains et parasités, avec des niveaux d'intensité pas toujours similaires, qui peuvent s'expliquer par la présence du parasite. De plus, d'autres galeries API ZYM, réalisées sur hémolymphe et sur cellules hémocytaires, ont montré leurs activités hydrolytiques. Il serait par la suite intéressant de faire ces recherches d'activités enzymatiques sur des populations séparées d'hémocytes.

La recherche d'hydrolases acides sur préparations cytocentrifugées a montré la présence de ces enzymes sur différents types cellulaires en fonction des enzymes utilisées. Il apparaît au vu de ces résultats, que les granulocytes sont les cellules hémocytaires qui ont l'équipement enzymatique, pour ces enzymes, le plus important, ce qui est cohérent et qui a déjà été décrit chez les palourdes.

La microscopie électronique à transmission a permis la localisation ultrastructurale des enzymes sur les hémocytes. Pour la recherche de  $\beta$ -glycérophosphatase, deux protocoles ont été testés dont un a permis de visualiser l'activité enzymatique, dans les cellules ayant des granulations de petite taille ainsi que dans le cytoplasme du parasite. Les marquages enzymatiques de la thiamine et de la cytidine n'ont jamais été réalisés sur *Ostrea edulis*. L'activité de la thiamine est visualisée seulement dans la lumière de granulations. L'activité de la cytidine est plus forte à pH 5 qu'à pH 2.7 et est localisée sur les trois types cellulaires mais pas sur les granulations. Il apparaît donc que les granulocytes ont un équipement enzymatique plus développé que les autres types hémocytaires et notamment pour les deux enzymes :  $\beta$ -glycérophosphatase et thiamine.

# **ANNEXES**

# **BIBLIOGRAPHIE**

## ANNEXE 1

### 1. Solution d'Alsever

Glucose.....	20.80 g/l
Chlorure de sodium.....	22.50 g/l
Citrate de sodium .....	8.00 g/l
EDTA .....	3.36 g/l
Eau distillée.....	qsp 1000 ml

Ajuster le pH à 7.5. Filtrer stérilement sur 0.22 µm.

Conservation au réfrigérateur à 4°C.

N.B. : l'osmolarité est de 1000 mOsm.

### 2. Solution mère d'antibiotiques à 1000 X

- Solution de Fluméquine

Peser 30 mg de Fluméquine pour un volume final de 1 ml d'eau distillée.

Dissoudre avec NaOH.

Filtrer sur 0.22 µm puis aliquoter stérilement.

Conservation au congélateur à -20°C.

- Solution d'antibiotiques

Pénicilline G.....	0.75 mg / ml
Streptomycine sulfate.....	1.50 mg / ml
Kanamycine.....	0.1 mg / ml
Erythromycine.....	0.1 mg / ml
Acide oxolinique .....	0.1 mg / ml

Filtrer la solution sur 0.22 µm puis aliquoter.

Conservation au congélateur à -20°C.

## ANNEXE 2

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

#### • Réactifs :

Cacodylate de sodium 0.4 M : 8.6 g dans 100 ml

Glutaraldéhyde à 3 % :

glutaraldéhyde à 25 %.....2.5 ml  
cacodylate 0.4 M .....5 ml  
NaCl 10 % .....3.5 ml  
Eau distillée.....9 ml

Tampon cacodylate (pH 7.4, 1100 mOsm) :

cacodylate 0.4 M .....10 ml  
NaCl 10 % .....4 ml  
Eau distillée.....6 ml

Acide osmique à 1 % :

OsO<sub>4</sub> 4 %.....1 vol.  
cacodylate 0.4 M .....1 vol.  
NaCl 10 % .....1 vol.  
Eau distillée.....1 vol.

Mélange EPON :

Epon 812 .....3.0 g  
DDSA .....1.5 g  
MNA .....1.5 g  
DMP 30 .....0.075 g

A préparer extemporanément. Mélanger et laisser reposer jusqu'à élimination des bulles d'air.

#### • Protocole :

##### 1. Fixation :

Glutaraldéhyde à 3 % en tampon cacodylate ..... 30 min  
Rincer en tampon cacodylate ..... 2 x 10 min  
Post-fixer à l'acide osmique à 1 % en tampon cacodylate (réfrigérateur) ..... 60 min  
Rincer en tampon cacodylate ..... 2 x 10 min

##### 2. Déshydratation :

Alcool à 70° ..... 10 min  
Alcool à 95° ..... 2 x 15 min  
Alcool à 100° ..... 3 x 20 min  
Oxyde de propylène ..... 2 x 15 min

### 3. Imprégnation :

Mélange 50 % oxyde de propylène - 50 % Epon..... 60 min  
Mélange Epon ..... 60 min

### 4. Inclusion :

Placer les pièces dans des moules remplis d'Epon et mettre à l'étuve à 60°C jusqu'à polymérisation.

## Coloration des grilles pour la microscopie électronique à transmission

- Réactifs :

Acétate d'uranyle :

. Solution mère d'acétate d'uranyle à 5 % en eau distillée

. Solution pour contraste : 50 % d'acétate d'uranyle à 5 %, 50 % d'alcool à 50°

- Protocole :

Acétate d'uranyle, à l'obscurité..... 70 min

Rincer à l'alcool 25° .....

Rincer à l'eau distillée .....

Sécher sur papier filtre ..... ~ 15 min

## BIBLIOGRAPHIE

- N. COCHENNEC, T. RENAULT, B. CHOLLET, P. MAFFART, NAARU-GRABEN Y. And A. GERARD (Soumis). Comparison of haemograms from resistant and susceptible European flat oyster, *ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*.
- P.M HINE, B. WESNEY. Interaction of phagocytosed *Bonamia sp.* (Haplosporidia) with haemocytes of oysters *Triostrea chilensis*. Diseases of aquatic organisms, 1994 20 : 219-229.
- P.M HINE, B. WESNEY. The functional cytologie of *Bonamia sp.* (Haplosporidia), infecting oysters *Triostrea chilensis* : an ultracytochemical study. Diseases of aquatic organisms, 1994 20 : 207-217.
- JEAN CHAGOT D. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Asctospora).
- LOPEZ GOMEZ Carmen. Etude pathologique de l'huître *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) et ses mécanismes de défense. Thèse de doctorat de l'université de Santiago de Compostela.
- TENDEL Véronique. La bonamiose, maladie de l'huître plate. Thèse de doctorat vétérinaire à l'université de Toulouse (1989).
- PASTEELS JJ. Phosphatase acide et polarité golgienne dans les cellules absorbantes de la branchie de *Mytilus edulis*. Histochemie, 1971 28 : 296-304.