UNIVERSITE DE BORDEAUX II

U.F.R. DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

D.E.A. "BIOLOGIE-SANTE"

OPTION "PATHOLOGIE MICROBIENNE ET VIRALE"

CARACTERISATION ANTIGENIQUE DES HEMOCYTES DE L'HUITRE CRASSOSTREA GIGAS ET ANALYSE DE LEUR ACTIVITE ANTI-INFECTIEUSE OXYGENE-DEPENDANTE

ANNIE MORVAN

Juillet 1991

U.R.P.I.G.M
UNITE DE RECHERCHE EN PATHOLOGIE,
IMMUNOLOGIE ET GENETIQUE DES INVERTEBRES MARINS
B.P. 133 17390 LA TREMBLADE

Non ce n'était pas le radeau
De la méduse ce bateau,
Qu'on se le dise au fond des ports,
Dise au fond des ports.
Ses fluctuat nec mergitur,
C'était pas d'la littérature,
N'en déplaise aux jeteurs de sort,
Aux jeteurs de sort...

BRASSENS, Les copains d'abord.

Aux copains du labo, en leur souhaitant de bientôt travailler sur des huîtres sorties bien fraîches tous les matins de l'étang de Thau...

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

MATERIEL ET METHODES 6

I- PRELEVEMENT DES HEMOCYTES 6

I-1- Origine des animaux 6

I-2- Ponction d'hémolymphe 6

II- ANTICORPS MONOCLONAUX 6

III- TECHNIQUES D'IMMUNOMARQUAGE 6

III-1- Immunomarquage des hémocytes fixes: immunofluorescence et immunoperoxydase sur lames 6

III-1-1- Préparation des lames 6

III-1-2- Immunofluorescence indirecte 7

III-1-3- Immunoperoxydase 7

III-2- Immunomarquage des hémocytes vivants en suspension 8

IV- TECHNIQUES DE SEPARATION DE SOUS-POPULATIONS HEMOCYTAIRES 8

IV-1- Centrifugation isopycnique sur gradient de densité 8

IV-2- Immunoséparation à l'aide de billes magnétiques 9

IV-2-1- Typage des AcMc 9

IV-2-2- Méthode directe 9

IV-2-3- Méthode indirecte 9

V- CHIMIOLUMINESCENCE 11

V-1- Protocole général 11

V-2- Chimioluminescence des populations séparées par centrifugation isopycnique 11

V-3- Chimioluminescence des hémocytes incubés avec les AcMc 12

RESULTATS 13

I- APPLICATION DES AcMc A LA CARACTERISATION ANTIGENIQUE DES HEMOCYTES 13

I-1- Profils d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase 13

I-2- Recherche d'une corrélation entre critères antigéniques et critères physico-chimiques 13

II- APPLICATION DES AcMc A L'IMMUNOPURIFICATION DE SOUS-POPULATIONS HEMOCYTAIRES 14

II-1- Choix des AcMc utilisables 14

II-2- Séparation hémocytaire 15

III- ETUDE FONCTIONNELLE DES HEMOCYTES EN CHIMIOLUMINESCENCE ET APPLICATION DES AcMc 16

III-1- Réponse en chimioluminescence de populations séparées par centrifugation isopycnique 16

III-2- Effet des AcMc spécifiques sur la chimioluminescence 17

DISCUSSION 18

BIBLIOGRAPHIE 23

ANNEXES 26

INTRODUCTION

L'impact économique des pathologies infectieuses chez les mollusques d'élevage -en particulier les bivalves- ainsi que le rôle d'hôte intermédiaire tenu par des gastéropodes dans le cycle biologique de certains parasites, ont conduit au développement de recherches sur les interactions entre ces mollusques et différents types d'agents pathogènes.

Chez les gastéropodes, il s'agit principalement de métazoaires (trématodes), transmis par les genres *Lymnaea* et *Biomphalaria*, et qui sont à l'origine de graves parasitoses humaines (schistosomes responsables de la bilharziose), ou impliqués dans des enzooties économiquement désastreuses (*Fasciola hepatica*, agent de la douve du foie des bovins).

Dans le but de rompre les cycles de transmission de tels parasites, une alternative aux traitements molluscicides (GODAN, 1983) et à la lutte biologique (BERG, 1973) consiste en la sélection de souches d'escargots résistants. C'est pourquoi sont menées des recherches visant à la compréhension de la réponse immunitaire de ces gastéropodes (LOKER and BAYNE, 1986; VAN DER KNAAP, 1986; MEULEMAN, 1987).

Chez les bivalves, les agents pathogènes sont surtout des micro-organismes intra-cellulaires, responsables de maladies dont l'activité conchylicole reste lourdement tributaire. L'ostréiculture, qui est l'activité majeure dans ce domaine, n'est pas épargnée puisque les chutes de production d'huître plate *Ostrea edulis* (diminution de 75% sur le littoral atlantique entre 1974 et 1982) sont la conséquence de l'infection du cheptel par des protozoaires du phylum des Ascetospora: *Marteilia refringens*, parasite des cellules du système digestif (GRIZEL *et al.*, 1974) ainsi que *Bonamia ostreae*, localisé dans les cellules sanguines ou hémocytes (PICHOT *et al.*, 1980); par ailleurs, les mortalités qui ont décimé l'huître portugaise *Crassostrea angulata* au début des années 70 ont pu être associées à l'infection des animaux par un iridovirus (COMPS *et al.*, 1976). Pour remplacer cette espèce, l'huître japonaise *Crassostrea gigas* a été massivement introduite en France, où elle assure aujourd'hui la presque totalité de la production ostréicole (GRIZEL and HERAL, 1991).

Le traitement et la vaccination sont difficilement envisageables chez ces espèces du milieu marin, dépourvues de réponse immunitaire de type anticorps, et pour lesquelles la prévention contre les risques épizootiques ou enzootiques doit se cantonner à des mesures sanitaires, et à des efforts

d'amélioration génétique reposant sur des critères de résistance aux maladies. Ce type de sélection est conditionné par une meilleure connaissance des mécanismes de défense, c'est pourquoi des programmes de recherche en immunologie anti-infectieuse des mollusques sont mis en place, notamment à l'IFREMER, sur des bivalves d'intérêt commercial.

A l'instar des animaux supérieurs, les mollusques présentent une immunité "non spécifique" humorale, associée à des mécanismes de défense cellulaire.

L'immunité humorale est liée d'une part à des activités enzymatiques plasmatiques: des lysozymes, composants bactéricides, sont présents chez de nombreuses espèces (TAKAHASHI *et al.*, 1986); une activité de type sérine protéase a pu être mise en évidence dans l'hémolymphe de *Crassostrea gigas* (BACHERE *et al.*, 1990), et d'autre part à des lectines, glycoprotéines sériques qui ont un rôle opsonisant dans la phagocytose (RENWRANTZ and STAHMER, 1983).

Chez les mollusques, aucun complexe protéique de type complément n'a été décrit, et il est généralement admis que ces derniers ne produisent pas d'anticorps; récemment cependant, chez d'autres invertébrés, l'étude de la séquence d'une protéine antibactérienne -l'hémoline- , a permis de classer cette protéine, inductible chez le ver à soie *Hyalophora cecropia*, dans la superfamille des immunoglobulines (SUN *et al.*, 1990).

L'immunité cellulaire des mollusques est assurée par les hémocytes, cellules véhiculées par l'hémolymphe dans un système circulatoire ouvert, qui les met en contact avec les tissus au niveau de vastes sinus (CHENG, 1981; SMINIA and VAN DER KNAAP, 1987).

Ces cellules présentent une hétérogénéité très importante, et de nombreux travaux ont visé à identifier des types hémocytaires, dans l'objectif premier de classer ces cellules, puis de préciser, à l'aide d'expérimentations sur des sous-populations séparées, la signification ontogénique et physiologique de cette diversité hémocytaire.

L'identification de différents types cellulaires, basée essentiellement sur des critères morphologiques et ultrastructuraux est rendue très difficile par l'extrême polymorphisme des hémocytes. Ainsi, chez *Crassostrea gigas*, TANAKA (1961) ne distinguait pas moins de douze

types et sous-types en considérant la morphologie et la taille des cellules (cité par CHENG, 1980). Généralement, les auteurs s'accordent pour reconnaître chez les huîtres au moins deux types cellulaires, d'une part des populations de hyalinocytes à cytoplasme non granuleux, d'autre part des hémocytes à cytoplasme granuleux ou granulocytes (FISHER, 1986).

D'autres critères d'identification, comme le contenu enzymatique lysosomial des hémocytes ont été pris en compte pour caractériser des types hémocytaires chez *Mytilus edulis* (PIPE, 1990). Sur la base de ces critères, des différences significatives dans la distribution des types hémocytaires ont été mises en évidence, entre une souche de *Biomphalaria glabrata* résistante à *Schistosoma mansoni* et une souche sensible (GRANATH and YOSHINO, 1983).

Les déterminants antigéniques des hémocytes constituent également des marqueurs de types potentiels. L'utilisation des anticorps monoclonaux en immunologie des mollusques est encore discrète en comparaison des applications de ces marqueurs moléculaires en immunologie des vertébrés. Cependant, dès 1983, des anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes membranaires des hémocytes de *Biomphalaria glabrata* ont permis de distinguer des populations antigéniquement distinctes (YOSHINO and GRANATH, 1983) et chez *Lymnaea stagnalis*, des hémogrammes établis grâce à de tels anticorps ont révélé une hétérogénéité des formules sanguines fonction de l'âge des animaux, et de leur infestation par *Trichobilharzia ocellata* (DIKKEBOOM *et al.*, 1988).

D'un point de vue fonctionnel, la phagocytose apparaît comme le mécanisme majeur de défense cellulaire chez les mollusques (BANG, 1975; ANDERSON, 1977) dont tous les types hémocytaires sont phagocytaires (CHENG, 1980). Ce processus est abondamment décrit chez les bivalves qui sont capables d'internaliser des éléments étrangers très divers comme des particules inertes (BANG, 1975) ou des bactéries (RODRICK and ULRICH, 1984), et les progrès récents en matière d'isolement et de purification de protozoaires pathogènes des mollusques (MIALHE *et al.*, 1988) ont permis l'étude expérimentale de la phagocytose de parasites (MOURTON *et al.*, 1991).

Les hémocytes des invertébrés sont fréquemment considérés comme les ancêtres des cellules phagocytaires des vertébrés (OLAFSEN, 1986). En effet, les mécanismes mis en oeuvre parallèlement au processus de

phagocytose pour détruire les particules internalisées font appel aux mêmes processus de défense. Un premier mécanisme, oxygène-indépendant, fait intervenir les enzymes des lysosomes qui fusionnent avec le phagosome (MAC KERROW *et al.*, 1985). Le deuxième mécanisme est oxygène-dépendant ("burst" respiratoire) et englobe une série de réactions oxydatives caractérisée par la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène particulièrement actifs (BADWEY *et al.*, 1988)(Annexe 1). Ce métabolisme oxydatif a été démontré chez *Patinopecten yessoensis* (NAKAMURA *et al.*, 1985) et *Lymnaea stagnalis* (DIKKEBOOM *et al.*, 1987 ; ADEMA *et al.*, 1991), chez qui les intermédiaires réactionnels de l'oxygène pourraient être à l'origine de la cytotoxicité des hémocytes à l'égard des sporocystes de *Schistosoma mansoni* (DIKKEBOOM *et al.*, 1988).

Ces intermédiaires réactionnels instables sont capables d'émettre des photons, à l'origine de la production de lumière (chimioluminescence). La mesure de cette luminescence, après amplification, permet une quantification *in vitro* de l'activité métabolique oxydative des cellules phagocytaires (FROMTLING, 1985)(Annexe 2).

Cette technique de chimioluminescence, largement appliquée, chez les vertébrés, à l'étude des monocytes (JOHANSSON and DAHLGREN, 1989) et des polynucléaires neutrophiles (LINDENA and BURKHARDT, 1990) a été adaptée aux cellules de mollusques marins, dans l'objectif de caractériser les capacités de défense des hémocytes de ces animaux (BACHERE *et al.*, 1991). Ainsi, la chimioluminescence a permis la mise en évidence, chez *Crassostrea gigas*, d'une extrême variabilité individuelle de la réponse à des stimulants de la phagocytose de type zymosan. Cette variabilité est observée pour un nombre fixe de cellules et des conditions standard d'expérimentation, ce qui suggère qu'il existe des sous-populations hémocytaires dont les réponses en chimioluminescence sont différentes.

L'étude d'hémogrammmes établis en microscopie optique, parallèlement à l'analyse individuelle en chimioluminescence, montre que cette hétérogénéité fonctionnelle n'est pas corrélée à l'hétérogénéité morphologique des hémocytes (Annexe 3). Sa signification reste donc à préciser et l'identification des types cellulaires actifs doit être envisagée. Cette identification nécessite, d'une part, d'établir des critères plus fiables que des critères morphologiques et d'autre part d'aborder l'étude fonctionnelle de populations d'hémocytes séparées.

Dans le cadre de mon DEA, je me suis initialement attachée à la caractérisation antigénique des hémocytes de *Crassostrea gigas* à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de cette espèce. Une attention particulière a été portée aux anticorps marqueurs de sous-populations et spécifiques de déterminants membranaires. J'ai utilisé ces anticorps pour la séparation de sous-populations hémocytaires à l'aide de billes magnétiques, dans l'objectif de mettre au point une méthode d'immunopurification capable de se substituer aux méthodes classiques de séparation cellulaire basées sur des critères physico-chimiques.

Dans un second temps, j'ai réalisé une étude fonctionnelle des hémocytes de *Crassostrea gigas*, en utilisant la chimioluminescence pour évaluer l'activité métabolique oxydative lors de la phagocytose par des sous-populations hémocytaires isolées par centrifugation isopycnique, afin de rechercher l'origine de la variabilité individuelle de la réponse observée. La technique a ensuite été utilisée, pour étudier l'implication de déterminants antigéniques des hémocytes dans l'activation des mécanismes de défense oxygène-dépendants de *C. gigas*.

MATERIEL

ET

METHODES

I- PRELEVEMENT DES HEMOCYTES

I-1- Origine des animaux

Les huîtres *Crassostrea gigas*, de taille commerciale, âgées d'environ 3 ans, proviennent d'exploitations ostréicoles du bassin de Marennes-Oléron.

I-2- Ponction d'hémolymphe

Les huîtres sont ouvertes par section du ligament puis du muscle adducteur. L'hémolymphe (environ 1 ml par animal) est ponctionnée directement dans la cavité péricardique, à l'aide d'une seringue contenant 1 ml d'une solution anti-agrégante, Solution Modifiée d'Alsever (SMA) (BACHERE *et al.*, 1988), dont la composition figure en Annexe 5.

La qualité du prélèvement et la concentration hémocytaire sont alors déterminées par comptage à la cellule de Malassez.

II- ANTICORPS MONOCLONAUX

Les anticorps monoclonaux (AcMc) spécifiques des hémocytes de *Crassostrea gigas* (HCG) ont été préparés selon la technique de l'hybridation lymphocytaire (KOHLER and MILSTEIN, 1975).

Les AcMc utilisés proviennent soit de surnageants de culture d'hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques, soit de liquides d'ascite obtenus par inoculation des hybridomes à des souris.

III- TECHNIQUES D'IMMUNOMARQUAGE

III-1- IMMUNOMARQUAGE DES HEMOCYTES FIXES : IMMUNOFLUORESCENCE ET IMMUNOPEROXYDASE SUR LAMES

III-1-1- Préparation des lames

* Population hémocytaire totale

L'hémolymphe est prélevée dans de la SMA contenant 6% de formaldéhyde. Après fixation des hémocytes (30 mn, 4°C), des lames sont préparées par cytocentrifugation d'environ 100 000 cellules (100 g, 5 mn), puis traitées à l'acétone (5 mn) et rincées à l'eau distillée.

* Hémocytes séparés par centrifugation isopycnique

Les cellules séparées par centrifugation sur gradient de densité (voir §.IV) sont cytocentrifugées puis fixées selon la même technique.

Les lames sont conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

III-1-2-Immunofluorescence indirecte

Les lames sont décongelées et réhydratées (2 mn) dans du tampon phosphate pour immunofluorescence T.I.F. (Diagnostics Pasteur).

50 µl de surnageant de culture d'hybridomes sécréteurs d'AcMc spécifiques (anticorps primaires) sont déposés sur les cellules, et les lames sont incubées pendant 30 mn, en chambre humide. Pour les témoins négatifs, l'anticorps spécifique est remplacé par un AcMc non spécifique (AcMc anti-Lymphocystivirus) ou du T.I.F.. Après 3 lavages avec du T.I.F., les préparations sont recouvertes de 50 µl d'une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (anticorps conjugué) (Diagnostics Pasteur), diluée au 1/100e dans du T.I.F. additionné de Bleu Evans (concentration finale de 1%).

Après 20 mn d'incubation, les lames sont rincées 2 fois avec du T.I.F. puis avec de l'eau distillée, et montées dans du tampon glycériné (Diagnostics Pasteur) avant examen au microscope à épifluorescence.

III-1-3- Immunoperoxydase

Les lames réhydratées par du T.I.F. (2 mn) sont plongées 20 mn dans un bain de méthanol additionné de peroxyde d'hydrogène (Sigma) à 0,3%, afin d'inhiber une éventuelle peroxydase endogène.

Après lavage à l'eau distillée (2 fois 5 mn) puis au T.I.F. (3 fois 2 mn) les lames sont traitées par 50 µl de surnageant de culture (anticorps primaires) et incubées pendant 30 mn.

Elles sont ensuites rincées par du T.I.F. (3 fois 5 mn) avant dépôt de 50 µl d'une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplés à de la peroxydase (Biosys) diluée au 1/100e dans du T.I.F., et incubées pendant 30 mn.

Après un nouveau rinçage des lames au tampon T.I.F. (3 fois 5 mn), une solution de D.A.B. (diaminobenzidine) et de peroxyde d'hydrogène

(Sigma) préparée extemporanément aux concentrations respectives de 0,5 mg/ml et 1,5 μl/ml dans du tampon T.I.F. est déposée sous 50 μl (2 dépôts successifs avec incubation de 10 mn) et un dernier lavage dans l'eau distillée (3 fois 5 mn) est pratiqué.

Les préparations sont colorées à l'hématoxyline-éosine, et montées dans l'Eukitt avant lecture au microscope optique.

III-2- IMMUNOMARQUAGE DES HEMOCYTES VIVANTS EN SUSPENSION

Environ 10^6 hémocytes (soit 1 ml de mélange hémolymphe-SMA) sont incubés dans des microtubes de type Eppendorf à 4°C pendant 30 mn, avec 500 μl de surnageant de culture d'hybridome ou avec du liquide d'ascite à la dilution finale de 1/100e.

Les microtubes sont alors centrifugés (200 g, 5 mn), les surnageants éliminés et les culots d'hémocytes lavés 2 fois par centrifugation (200 g, 5 mn) dans 1 ml de solution SMA.

Le culot issu du 2e lavage est repris dans 1 ml d'une solution d'anticorps anti-IgG de souris marqués à la fluorescéine dans de la SMA. Une incubation de 20 mn est réalisée à 4°C afin d'éviter la phagocytose des anticorps marqués et des phénomènes de fixation non spécifique, puis les hémocytes sont lavés 2 fois dans de la SMA.

Des lames sont alors préparées par cytocentrifugation (100 g, 5 mn), montées dans du tampon glycériné sans fixation et observées immédiatement au microscope à épifluorescence.

IV- TECHNIQUES DE SEPARATION DE SOUS-POPULATIONS HEMOCYTAIRES

IV-1- CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE SUR GRADIENT DE DENSITE

Une série de concentrations de Percoll (Pharmacia) de 10% à 70% dans de la SMA est préparée à partir de Percoll initialement rendu isotonique à la SMA (1000 mosm: glucose 20,8 g/l, Na_3 citrate 8,0 g/l, NaCl 22,3 g/l).

La suspension cellulaire est déposée sur les gradients de densité discontinus, constitués de 1,5 ml de chaque concentration de Percoll, et les cellules sont séparées par centrifugation à 200 g pendant 30 mn à 8°C. Les différentes interfaces et le culot sont prélevés, dilués dans un volume au moins égal de solution SMA.

- Les cellules séparées en vue d'un immunomarquage sont déposées sur un coussin de sucrose (10% dans la SMA) et centrifugées (500 g, 30 mn, 8°C) afin d'éliminer le Percoll. Le culot est repris dans une solution SMA/formaldéhyde à 3%, et des lames sont préparées par cytocentrifugation.

- Les cellules séparées en vue d'une analyse en chimioluminescence sont comptées et 200 000 cellules de chaque interface sont aliquotées, centrifugées puis reprises sous un volume de 50 µl de Percoll/SMA résiduel avant d'être diluées dans 2 ml d'eau de mer filtrée (cf § V1 et V-2).

IV-2- IMMUNOSEPARATION A L'AIDE DE BILLES MAGNETIQUES

IV-2-1- Typage des AcMc :

L'identification des classes d'immunoglobulines spécifiques de *C. gigas* utilisées pour l'immunoséparation à l'aide de billes magnétiques est nécessaire au choix des billes à utiliser pour le couplage.

Les classes et sous-classes sont déterminées à l'aide du kit " Monoclonal Typing Kit" (MILES) utilisant la technique d'immunodiffusion sur plaque (Ouchterlony).

Les AcMc à tester sont déposés dans le puits central d'une rosette, sous forme de surnageant de culture d'hybridome (75 µl). 10 µl des anti-sérums anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA et IgM sont déposés dans les 6 puits entourant ce puits central.

Les plaques sont placées en chambre humide (Température ambiante) et les arcs de précipitation permettant de classer les anticorps testés sont recherchés après 24 à 48 heures d'incubation.

IV-2-2- Méthode directe (Annexe 4)

90.10^6 microbilles magnétiques Dynabeads M450 (Dynal) couplées à un anticorps de mouton anti-IgG de souris, soit un volume de 240 µl, sont lavées 2 fois à l'aide du séparateur magnétique MPC6 (Dynal), dans environ 1 ml de tampon phosphate PBS (NaCl: 8 g/l, KH_2PO: 0,2 g/l, $Na_2HPO_4 12H_2O$: 2,9 g/l, KCl: 0,2 g/l, pH: 7,4) contenant 0,1% de sérumalbumine bovine BSA (PBS/BSA).

Un volume d'ascite de 1,5 μl contenant les AcMc (anti-hémocytes HCG 12 et 14 ou témoins) est dilué avec les microbilles sous 1 ml de PBS/BSA, et le mélange est placé sous légère agitation en étuve à 10°C, pendant 24 heures.

Les billes sont alors retenues par le séparateur magnétique; le surnageant contenant l'excès d'anticorps est rejeté et les billes sont lavées pendant 30 mn sous agitation à 10°C dans 1 ml de PBS/BSA. Ce lavage est répété 4 fois.

Les billes sont reprises dans 300 μl de PBS/BSA contenant 0,02% d'azide de sodium. Cette préparation, qui contient $3.10^5/\mu l$ de billes couplées aux AcMc anti-hémocytes, est stockée à 4°C.

Un pool d'hémolymphes/SMA est préparé et des aliquots de 10^6 hémocytes sont placés dans des tubes à hémolyse sous 1,5 ou 3 ml, auxquels sont ajoutés 1, 5, 20, 40 ou 80 μl de billes; le mélange est incubé pendant 30 mn, avec 2 agitations très douces pour remettre les billes en suspension.

Les billes sont isolées à l'aide du séparateur magnétique et des comptages à la cellule de Malassez sont effectués sur la fraction "billes", ainsi que sur la fraction "surnageant", afin de dénombrer les billes, les cellules libres et les rosettes issues de la fixation des billes sur des hémocytes.

Toutes les opérations sont réalisées à 4°C.

IV-2-3- Méthode indirecte (Annexe 4)

Les hémocytes en suspension dans la SMA sont incubés pendant 1 heure avec l'AcMc (anti-hémocytes HCG 12 ou 14, ou témoin) sous forme d'ascite diluée au 1/1000e. Les cellules sont ensuite aliquotées (10^6) et placées dans des tubes à hémolyse.

Un volume de billes non couplées, correspondant à un ratio billes/cellule de 5:1 (4 μl), 20:1 (16 μl) ou 40:1 (32 μl) est lavé 2 fois dans la solution SMA additionnée de sérum albumine bovine à 0,1% (SMA/BSA), et ajouté aux hémocytes. Le volume de l'échantillon est ajusté à 1,5 ou 3 ml avec la solution SMA/BSA.

Le mélange est incubé 30 mn à 4°C, et les billes sont séparées, avant comptage, des éléments des fractions "billes" et "surnageant" à la cellule de Malassez comme précédemment décrit (§ IV-2-2).

RESULTATS

I- APPLICATION DES AcMc A LA CARACTERISATION ANTIGENIQUE DES HEMOCYTES

I-1- PROFILS D'IMMUNOFLUORESCENCE ET D'IMMUNOPEROXYDASE

Les profils en microscopie à épifluorescence (Immunofluorescence Indirecte (I.I.F.)) et en microscopie optique (immunoperoxydase) ont permis d'établir, pour chacun des 19 AcMc testés, un "phénotype" antigénique des hémocytes de *Crassostrea gigas* (HCG) (Tableau 1).

Les anticorps monoclonaux HCG 22 et HCG 29 ont induit une réaction positive sur la totalité des cellules et ont donc été considérés comme marqueurs panhémocytaires (Figures 1A, 1B). Sept AcMc ont marqué spécifiquement, en I.I.F. comme en immunoperoxydase, un pourcentage variable (10 à 80%) d'hémocytes (anticorps HCG 4, 12, 14, 15, 16, 18, 23) (Figures 1C, 1D, 1E, 1F). Certains anticorps, positifs en I.I.F. n'ont reconnu en immunoperoxydase qu'un pourcentage plus faible de la population cellulaire totale (anticorps HCG 2, 5, 20). D'autres ont été négatifs lorsque testés par cette seconde technique (anticorps HCG 3, 9, 13, 21, 30, 31, 33).

I-2- RECHERCHE D'UNE CORRELATION ENTRE CRITERES ANTIGENIQUES ET CRITERES PHYSICO-CHIMIQUES

La technique de centrifugation isopycnique a permis une séparation basée sur une différence de densité au sein de la population hémocytaire. Les cellules collectées aux interfaces supérieures d'un gradient de Percoll et identifiées en microscopie photonique correspondent à une population hétérogène de hyalinocytes (petits, moyens, grands) alors que les fractions de Percoll les plus denses contiennent une population cellulaire très riche en granulocytes (BACHERE *et al.*, 1988). Cette technique a permis de séparer, dans chaque bande cellulaire, entre 0,31% et 4,78% des hémocytes déposés sur le gradient, ce qui représente un rendement global de 14,48% (Figure 2).

Les AcMc spécifiques de sous populations hémocytaires ont été testés, en I.I.F. et en immunoperoxydase, sur les cellules des bandes 20-30% et 30-40%, et celles prélevées au culot (Figure 3).

AcMc	IMMUNO-FLUORESCENCE *	IMMUNO-PEROXYDASE *	IIF/ hémocytes non fixés . **	. classe et sous-. classe ...**
HCG2	+ 100%	+ 10%	nd	IgM
HCG3	± 33%	-	nd	nd
HCG4	++ 33%	++ 20%	-	IgG1
HCG5	++ 100%	+ 5%	nd	IgM
HCG9	+ 100%	-	nd	IgG1
HCG12	++ 50%	+ 30%	++	IgG3
HCG13	± 100%	-	nd	nd
HCG14	+ 25%	+ 40%	-	IgG
HCG15	+ 20%	+ 15%	+	IgM
HCG16	++ 80%	++ 75%	++	IgG3
HCG18	+ 50%	+ 10%	+	IgG1
HCG20	± 100%	+ 3%	nd	nd
HCG21	± 100%	-	nd	IgM
HCG22	++ 100%	++ 100%	nd	IgG1
HCG23	++ 50%	+ 20%	+	IgG1
HCG29	+ 100%	++ 100%	++	IgG3
HCG30	± 66%	-	nd	IgG1
HCG31	++ 80%	-	nd	IgG1
HCG33	± 100%	-	nd	nd

*+++ = intensité forte
+ = intensité moyenne
± = intensité faible
- = négatif

** = non réalisé

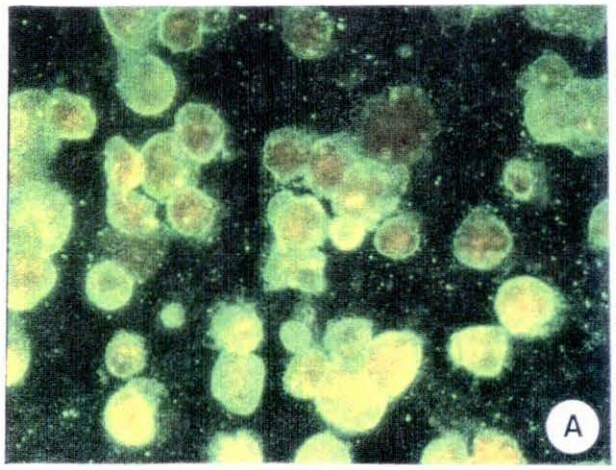
TABLEAU 1 : CARACTERISATION DES ACMC SPECIFIQUES DES HEMOCYTES DE C. GIGAS : POURCENTAGE DE CELLULES REACTIVES EN IMMUNOFLURESCENCE ET IMMUNOPEROXYDASE, REACTIVITE SUR CELLULES NON FIXEES, CLASSES ET SOUS-CLASSES DES IMMUNOGLOBULINES.

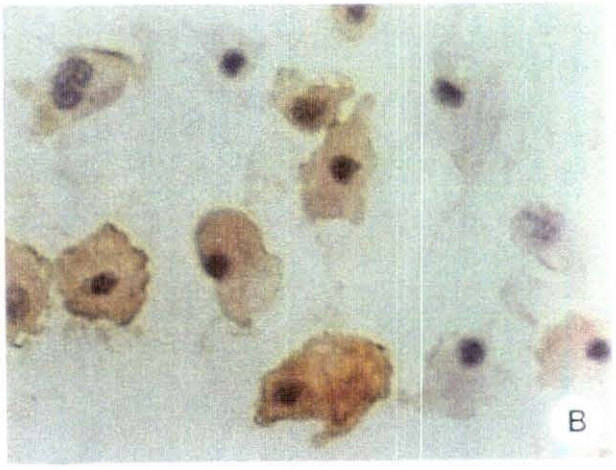
Figure 1: Profils d'immunofluorescence (A C E) et d'immunoperoxidase (B D F) des anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes de *Crassostrea gigas* (X 1000).

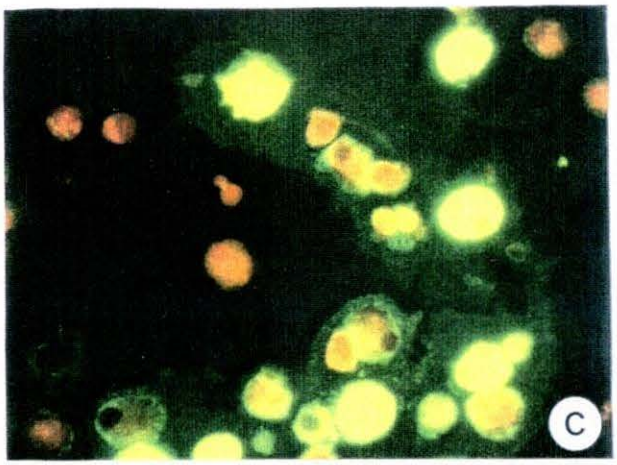
A-B: Anticorps panhémocytaire (HCG 29).

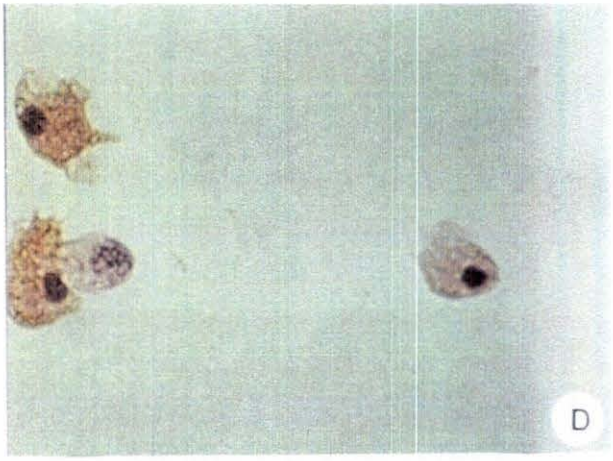
C-D: Anticorps spécifique de sous-populations (HCG 14).

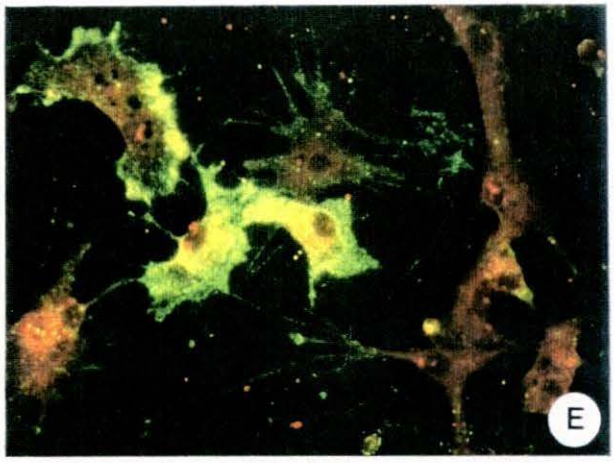
E-F: Anticorps spécifique de sous-populations (HCG 15).

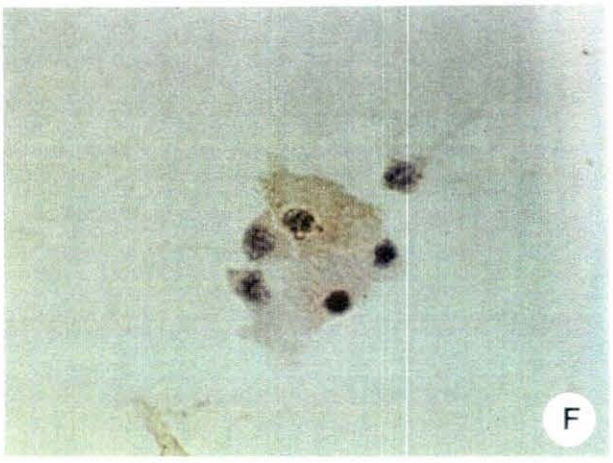

A


B


C


D


E


F

INTERFACE PERCOLL	POURCENTAGE RECUPERE (± SD)		% DE REACTIVITE avec HCG12	HCG14
10%-20%	1,38%	± 0,92%	nd	nd
20%-30%	2,91%	± 0,76%	95%	10%
30%-40%	4,78%	± 2,02%	60%	20%
40%-50%	1,20%	± 0,67%	nd	nd
50%-60%	0,92%	± 0,57%	nd	nd
60%-70%	0,31%	± 0,27%	nd	nd
culot	2,98%	+ 1,46%	20%	80%
TOTAL	14,48%			

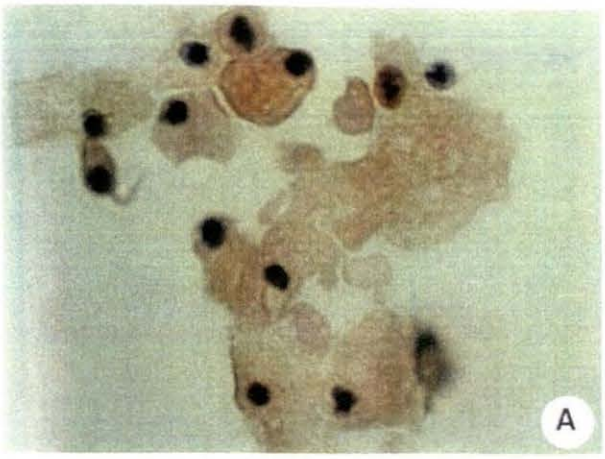
Figure 2 : SEPARATION DES HEMOCYTES DE C. GIGAS PAR CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE (45.10^6 CELLULES) : POURCENTAGES DE RECUPERATION (moyenne sur 4 expériences) ET REACTIVITE DES FRACTIONS 30-30%, 30-40% ET CULOT VIS-A-VIS DES ACMC 12 ET 14.

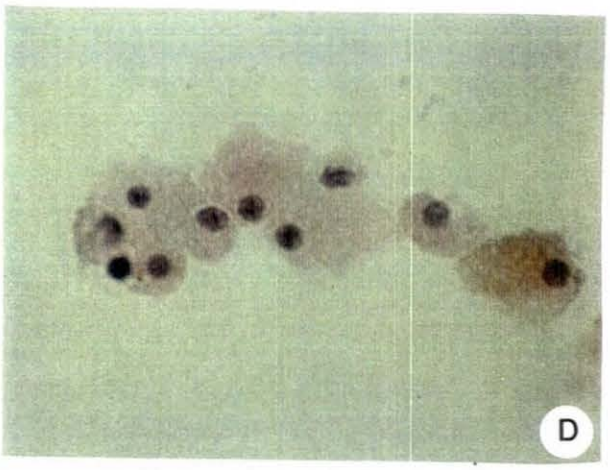
Figure 3: Réactivité en immunoperoxidase des anticorps monoclonaux HCG 12 (A B C) et HCG 14 (D E F) sur les hémocytes séparés par centrifugation isopycnique sur gradient de Percoll (X 1000).

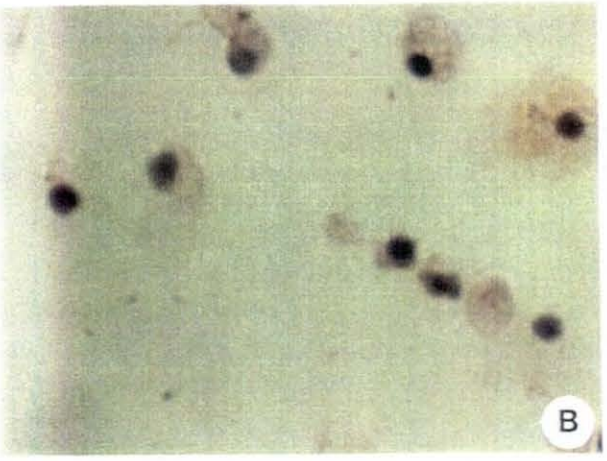
A-D: Cellules collectées à l'interface 20-30%.

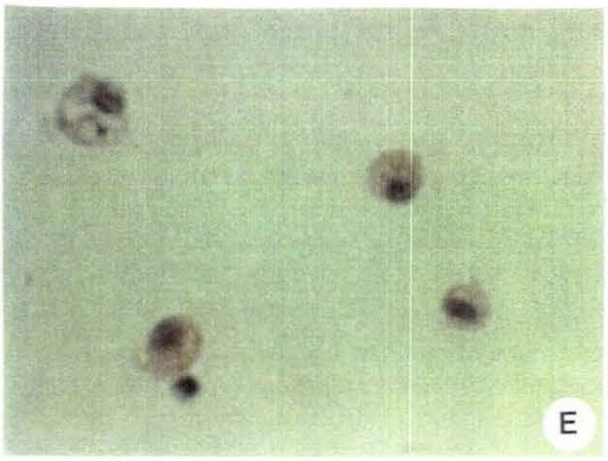
B-E: Cellules collectées à l'interface 30-40%.

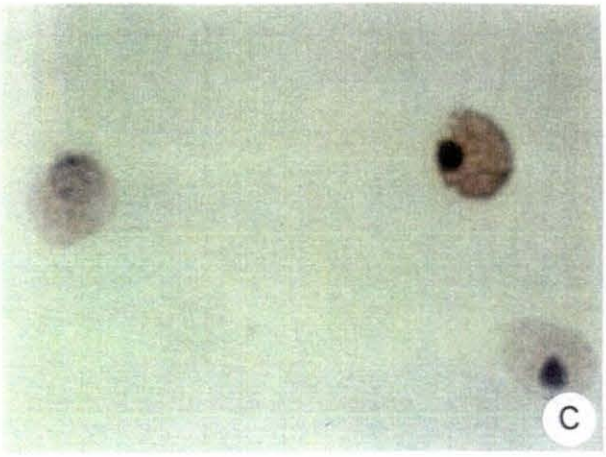
C-F: Cellules collectées au culot.

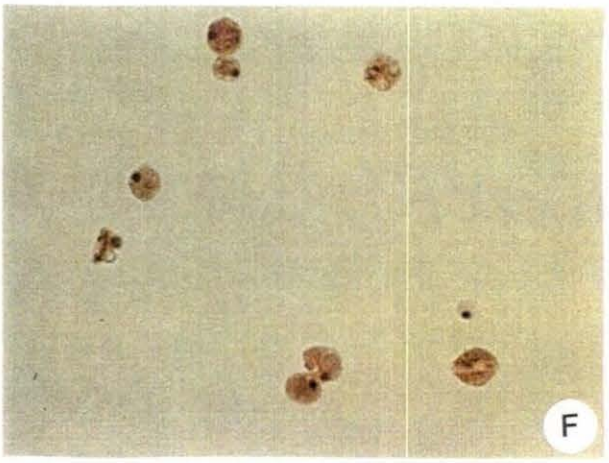

A


D


B


E


C


F

Parmi ces anticorps, HCG 12 a marqué 95% des cellules de la bande 20-30% en immunoperoxydase et 60% des cellules de la bande 30-40%, alors que seulement 20% des cellules du culot ont été positives.

Inversement, les hémocytes marqués par HCG 14 ont été localisés essentiellement au niveau du culot (bande 20-30%: 10%, bande 30-40%: 20%, culot: 90%).

II- APPLICATION DES AcMc A L'IMMUNOPURIFICATION DE SOUS-POPULATIONS HEMOCYTAIRES

La séparation à l'aide de billes magnétiques est une des techniques de purification cellulaire reposant sur la réactivité différentielle de cellules vis-à-vis d'anticorps spécifiques d'épitopes membranaires.

II-1- CHOIX DES AcMc UTILISABLES

Lors de l'examen des hémocytes fixés, certains AcMc ont semblé reconnaître des épitopes cytoplasmiques (organites intra-cellulaires des granulocytes par exemple). Il a par contre été difficile de repérer des marqueurs membranaires, c'est pourquoi des tests d'I.I.F. ont été réalisés sur des cellules vivantes dans des conditions prévenant la phagocytose des AcMc (suspension dans la solution modifiée d'Alsever, incubation à 4°C).

Parmi les AcMc spécifiques de sous-populations hémocytaires, seuls les AcMc HCG 12, 16 et 29 ont montré une fluorescence membranaire très marquée et homogène. La fluorescence a été plus faible et localisée pour HCG 15, 18 et 23. Les cellules n'ont pas fixé HCG 4 et 14 (Figure 4).

A l'issue de ce test, HCG 12, dont l'épitope membranaire est bien représenté et qui marque la majorité des cellules de type hyalinocyte, a été retenu pour les expériences d'immunopurification.

Les classes et sous-classes des AcMc ont été déterminées par la technique d'immunodiffusion sur plaque, dans l'objectif de préciser le type de billes magnétiques à utiliser. Les AcMc HCG 12 et 14 ainsi que la majorité des AcMc testés sont des immunoglobulines de classe G (Tableau 1).

Figure 4: Immunofluorescence sur des hémocytes vivants.

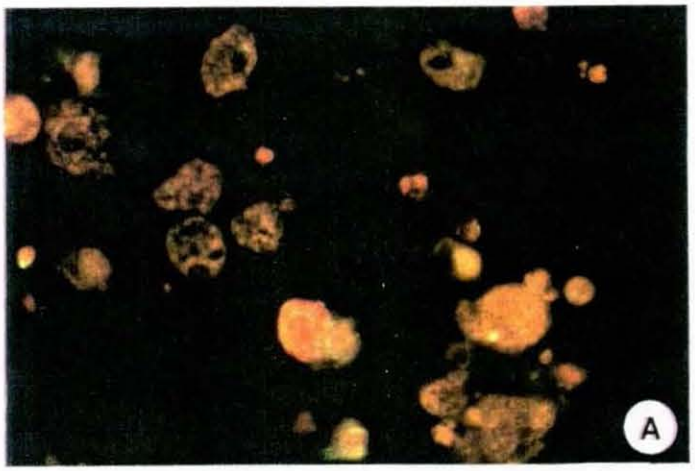
A: Anticorps témoin (X 400).

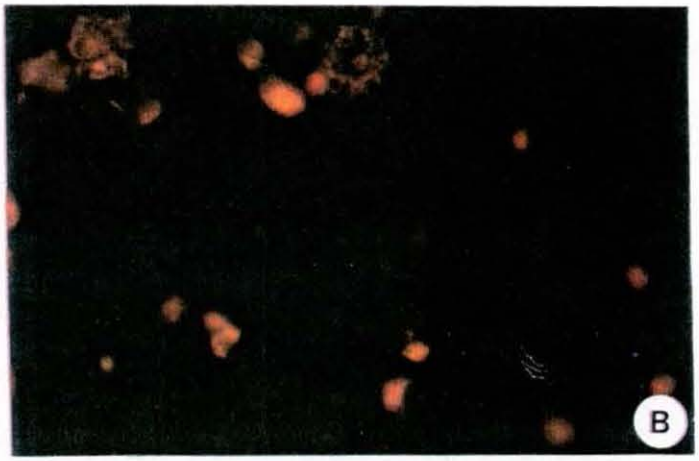
B: Anticorps spécifique cytoplasmique (HCG 14) (X 400).

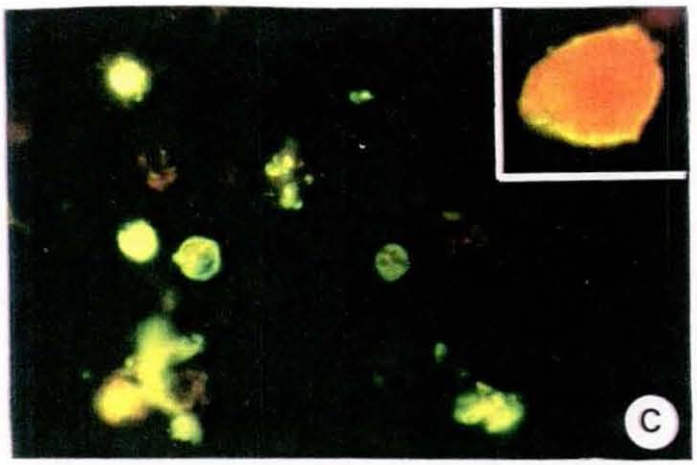
C-D: Anticorps spécifiques membranaires.

C: HCG 12 (X 300).

D: HCG 16 (X 1000).


A


B


C

D

II-2- Séparation hémocytaire

Des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-IgG de souris ont été utilisées selon deux méthodes dites respectivement "directe" (l'AcMc spécifique des hémocytes est couplé aux billes avant la mise en contact billes/cellules) et "indirecte" (les hémocytes sont incubés avec l'AcMc anti-hémocytes préalablement à la mise en contact avec des billes non traitées) (Annexe 4).

Les expériences ont été réalisées pour un nombre standard d'hémocytes (10^6) sous 2 volumes réactionnels (1,5 et 3 ml), et le ratio billes:cellule étant compris entre 0,3:1 et 24:1.

HCG 14, déterminé non membranaire, a été utilisé comme témoin négatif. Dans ce cas, aucune cellule n'a été retenue sur les billes, que ce soit par la méthode directe ou indirecte.

L'utilisation de HCG 12 a conduit à la formation de rosettes (Figure 5), avec un rendement variable: le dénombrement, à la cellule de Malassez, des cellules couplées montre des variations importantes en fonction du protocole utilisé (Tableau 2a). La méthode indirecte a permis l'obtention de rosettes en quantité supérieure (au maximum 184.000) à celle produite par la méthode directe (au maximum 44.000), avec une densité en billes au niveau des rosettes plus élevée (12-16 billes par rosette, au lieu de 2-6).

Le meilleur résultat, en terme de rendement, a été obtenu pour un ratio billes:hémocyte de 12:1, sous 3 ml par la technique indirecte: 184 000 rosettes ont été dénombrées, ce qui correspond à un rendement de 18,4% par rapport au nombre initial de cellules. Etant donné que HCG 12 marque environ 30% des hémocytes, les "rosettes" représentent donc environ 60% des cellules porteuses de l'épitope de HCG 12. Le contrôle en I.I.F. des hémocytes présents dans le surnageant a révélé des cellules "HCG 12 positives" dans cette fraction et ce, même après 3 opérations de capture par des billes.

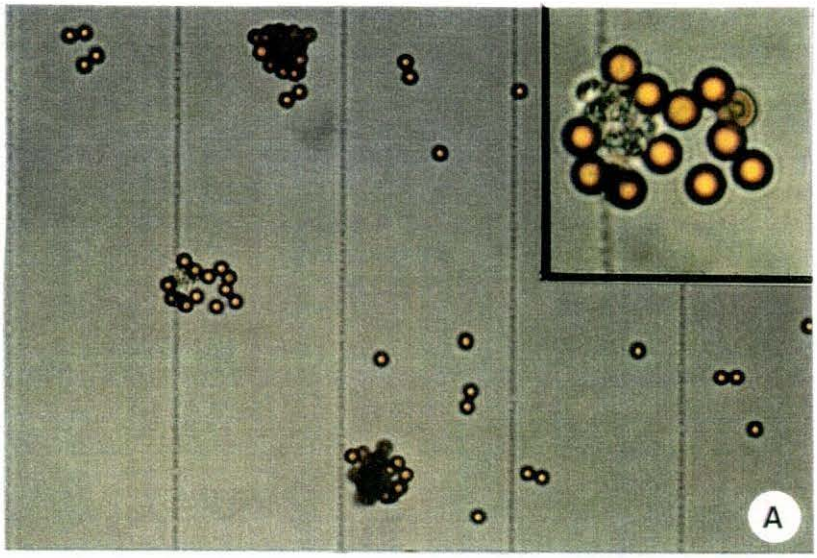
La spécificité de la purification par les méthodes directe et indirecte a été vérifiée en testant par I.I.F. la réactivité de l'AcMc HCG 12 vis-à-vis des hémocytes. Il a été établi que ceux-ci sont effectivement porteurs des épitopes spécifiques.

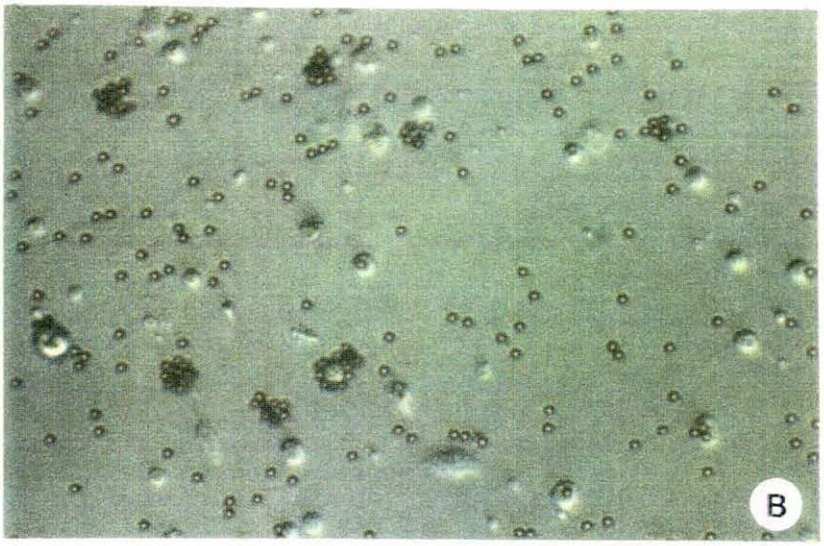
Figure 5: Immunoséparation des hémocytes de *Crassostrea gigas* à l'aide de billes magnétiques.

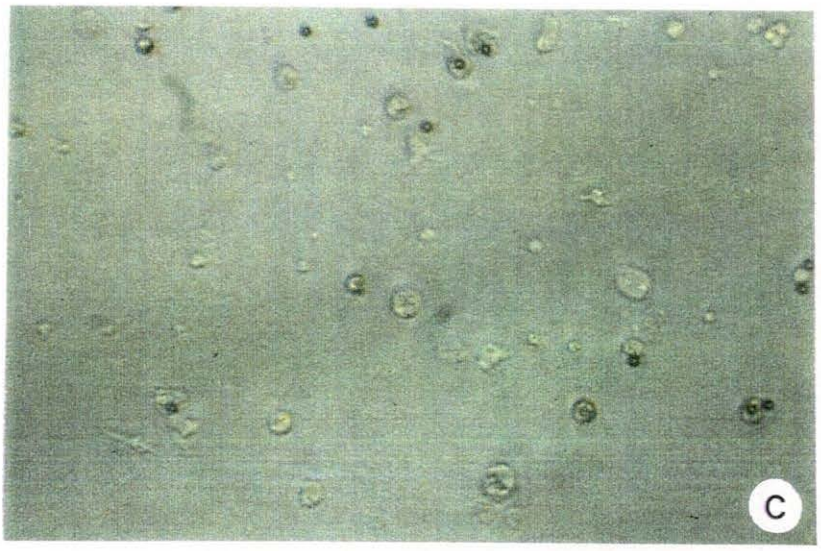
A: Rosettes formées avec l'anticorps HCG 12: fraction "billes" (méthode indirecte) (X 400 et X 1000).

B: Hémocytes incubés avec les billes portant HCG 12 avant séparation (méthode directe) (X 300).

C: Hémocytes incubés avec les billes portant HCG 12 : fraction "surnageant" après séparation (méthode directe) (X 300).


A


B


C

VOLUME D'INCU-BATION	RATIO BILLES: CELLULE	METHODE DIRECTE FRACTION : BILLES	METHODE DIRECTE FRACTION : SURNAGEANT	METHODE INDIRECTE FRACTION : BILLES	METHODE INDIRECTE FRACTION : SURNAGEANT
1,5 ml	0,3:1	**00** 40 000	**00** 840 000	**nd** nd	**nd** nd
	1,5:1	**00** 32 000	**00** 822 000	**44 000** 56 000	**00** 855 000
	6:1	**20 000** 40 000	**00** 744 000	**76 000** 72 000	**00** 1 035 000
	12:1	**nd** nd	**nd** nd	**124 000** 72 000	**00** 980 000
3 ml	0,3:1	**4 000** 52 000	**00** 660 000	**nd** nd	**nd** nd
	1,5:1	**4 000** 24 000	**00** 696 000	**28 000** 140 000	**00** 930 000
	6:1	**4 000** 12 000	**00** 600 000	**88 000** 104 000	**00** 960 000
	12:1	**44 000** 20 000	**00** 900 000	**184 000** 76 000	**00** 690 000
	24:1	**24 000** 48 000	**00** 696 000	**nd** nd	**nd** nd

TABLEAU 2A : NOMBRE DE "ROSETTES" (gras) ET D'HEMOCYTES LIBRES (fin) ETABLI DANS LES FRACTIONS "BILLES" ET "SURNAGEANT" APRES SEPARATION PAR DES BILLES MAGNETIQUES.

NOMBRE DE LAVAGES	BILLES	ROSETTES	HEMOCYTES LIBRES
1	8 920 000	36 000	88 000
2	8 825 000	44 000	12 000
3	7 166 000	28 000	0

TABLEAU 2B : INFLUENCE DU NOMBRE DE LAVAGES SUR LE NOMBRE DE "ROSETTES" ET D'HEMOCYTES LIBRES DANS LA FRACTION BILLES.

VOLUME D'INCU-BATION	RATIO BILLES: CELLULE	T_0	T_0 + 24H
1,5 ml	1,5:1	44 000	30 000
	6:1	76 000	33 000
	12:1	124 000	88 000

TABLEAU 2C : STABILITE DES ROSETTES FORMEES

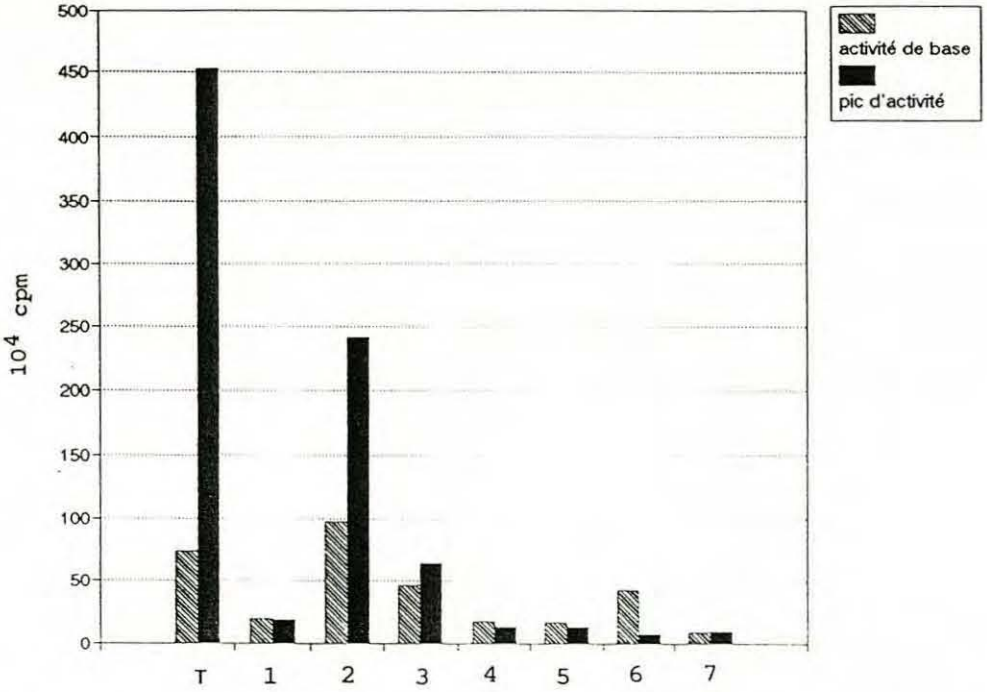


Figure 6-A: Chimioluminescence d'hémocytes de *C. gigas* séparés par centrifugation isopycnique sur gradient de Percoll.
T: témoin, interfaces 1: 10-20%, 2: 20 -30%, 3: 30-40%, 4: 40-50%, 5: 50-60%, 6: 60-70%, 7: culot.

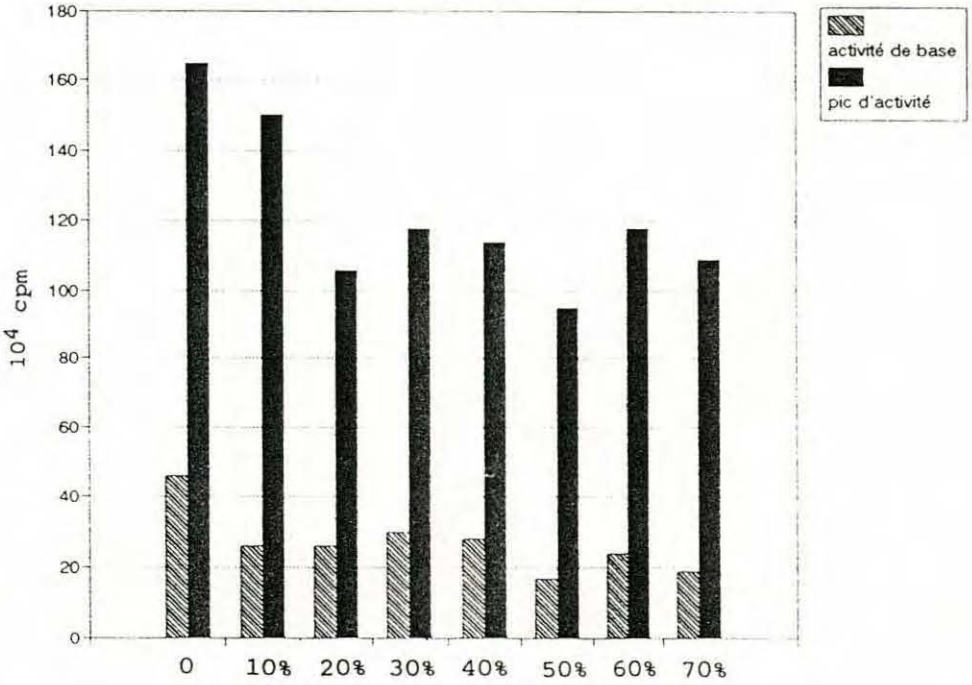


Figure 6-B: Chimioluminescence d'hémocytes de *C. gigas* incubés dans différentes concentrations de Percoll

Des cellules libres ont été aussi observées dans la fraction "billes" retenue par l'aimant du dispositif de séparation, ces cellules présentant une réactivité variable en immunofluorescence. Des rinçages successifs sous 1 ml de SMA ont conduit à l'obtention d'une fraction exempte de cellules libres (Tableau 2b). Dans cette fraction, la stabilité de la liaison antigène-anticorps a été estimée (Tableau 2c) : après 24h le nombre de rosettes reste pratiquement inchangé.

III- ETUDE FONCTIONNELLE DES HEMOCYTES EN CHIMIOLUMINESCENCE ET APPLICATION DES AcMc

III-1- REPONSE EN CHIMIOLUMINESCENCE DE POPULATIONS SEPAREES PAR CENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE

Les activités des fractions cellulaires collectées aux différentes interfaces d'un gradient de Percoll ont été comparées.

Deux fractions cellulaires ont répondu à la stimulation par le zymosan. Les hémocytes des interfaces 20-30% et 30-40%, pour des activités de base respectives de 98.10^4 cpm et 46.10^4 cpm, ont montré un pic d'activité s'élevant à 242.10^4 et 65.10^4 cpm (Figure 6A). L'intensité de ces pics a été toutefois inférieure à la valeur observée après stimulation du pool cellulaire témoin (454.10^4 cpm).

Pour les hémocytes de l'interface 10-20% et au-delà de 40%, aucun pic d'activité n'a été observé.

L'effet du Percoll sur l'activité de chimioluminescence des hémocytes a été étudié (Figure 6B). Les résultats obtenus ont révélé une légère diminution de la réponse des hémocytes incubés dans des concentrations supérieures à 10% de Percoll. En effet pour ces derniers, des pics d'activité de 100.10^4 cpm environ ont été enregistrés, alors qu'avec les échantillons témoins préparés dans de l'EMF, la valeur moyenne du pic a été de 160.10^4 cpm.

III-2- EFFET DES AcMc SPECIFIQUES SUR LA CHIMIOLUMINESCENCE

L'effet d'AcMc sur l'activité des hémocytes a été étudié en chimioluminescence après incubation des échantillons avec les surnageants de culture des hybridomes secrétant les différents AcMc ce qui évitait de devoir purifier ces derniers. Aucune réponse en chimioluminescence (Tableau 3) n'a été observée, et ce même pour des hybridomes témoins non spécifiques. Parallèlement, l'effet de l'incubation des hémocytes dans le milieu de culture des hybridomes (RPMI) sans AcMC a donc été testé, et a révélé une inhibition croissante de la réponse en chimioluminescence, en fonction de la concentration en RPMI: pour des dilutions respectives au 1/10e, au 1/5e et au 1/2, les pics d'activité ont été respectivement réduits de 40%, 70% et 80% par rapport au pic mesuré pour l'échantillon témoin (Figure 7A).

Ces expériences qui ont suggéré un effet négatif non spécifique du RPMI ont été ensuite basées sur des incubations des hémocytes avec des liquides d'ascite.

Parmi les 11 AcMc testés, 10 n'ont pas modifié la réponse des hémocytes alors qu'avec HCG 22, la réponse obtenue correspond à des valeurs d'activité de base d'hémocytes non stimulés (15.10^4 cpm) (Figure 7B). L'observation des hémocytes cytocentrifugés après les essais de chimioluminescence a révélé une inhibition de l'internalisation des particules de zymosan par les hémocytes.

	anti LDV	HCg 2	HCg 9	HCg 12	HCg 14	HCg 16	HCg 18	HCg 20	HCg 21	HCg 22	HCg 23	HCg 29
SURNA-GEANT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ASCITE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-

- = pas d'effet ++ = effet marqué (inhibition de la chimioluminescence)

TABLEAU 3 : EFFET DES ANTICORPS MONOCLONAUX SPECIFIQUES SUR LA CHIMIOLUMINESCENCE DES HEMOCYTES DE CRASSOSTREA GIGAS.

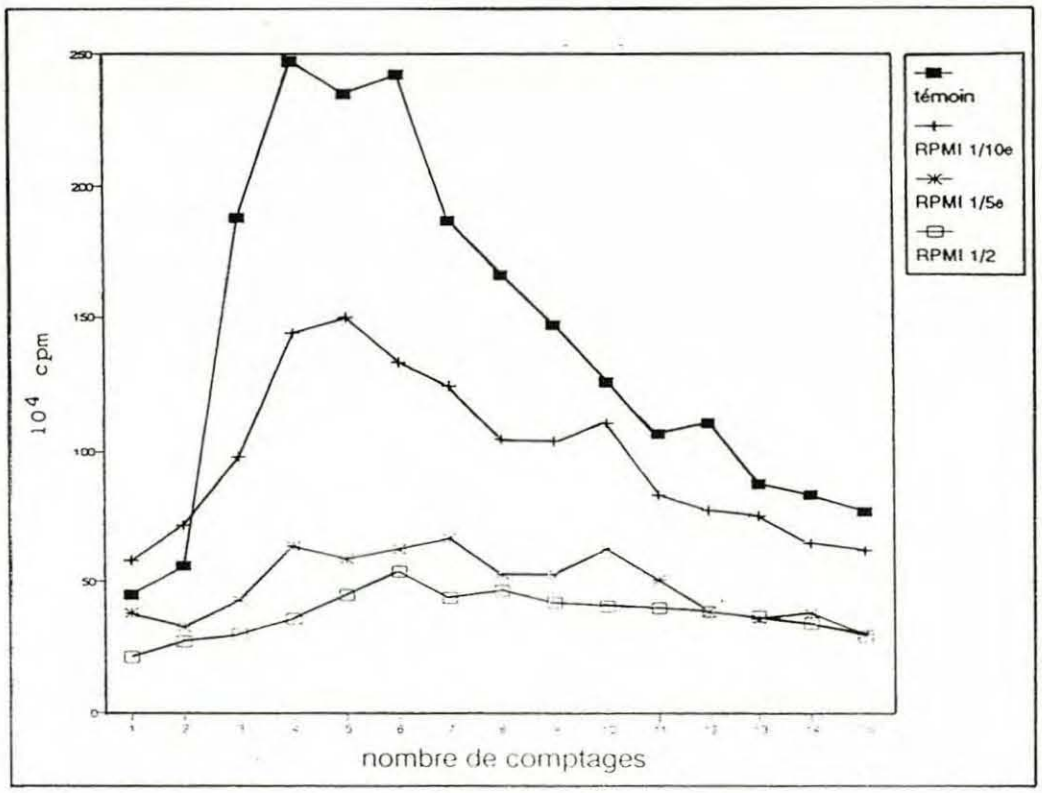


Figure 7-A: Cinétique de chimioluminescence d'hémocytes de *C. gigas* incubés dans du milieu de culture RPMI.

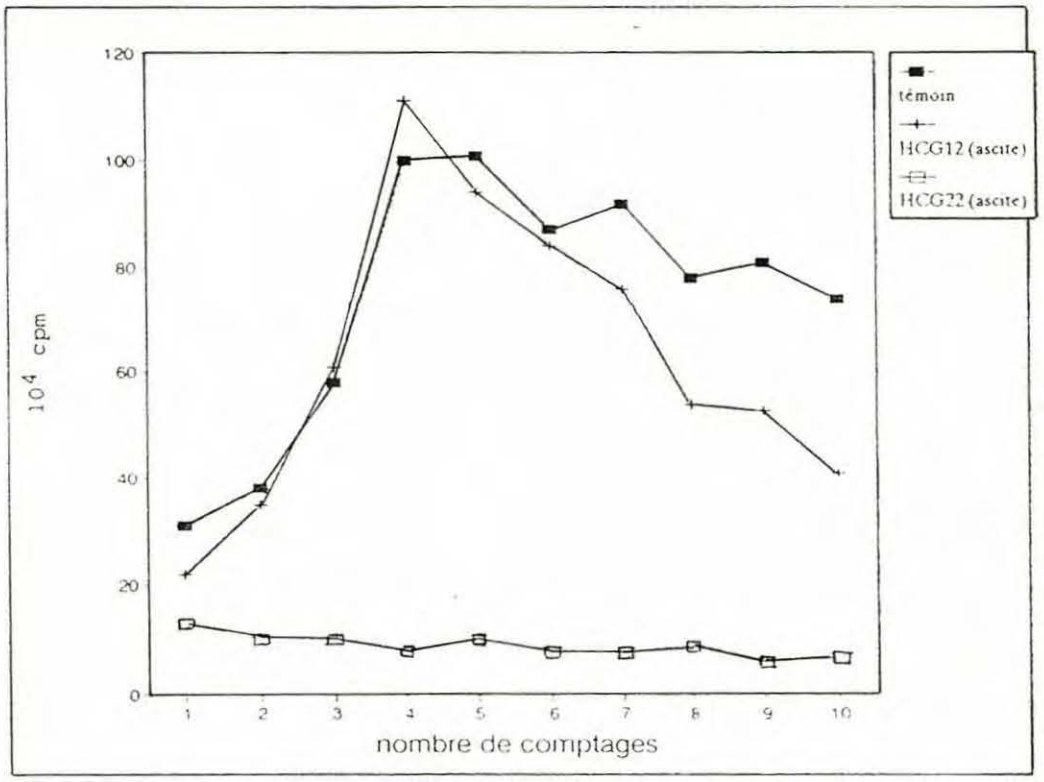


Figure 7-B: Cinétique de chimioluminescence d'hémocytes de *C. gigas* incubés avec les AcMc HCG 12 et HCG 22.

DISCUSSION

En immunologie des vertébrés, et plus particulièrement en médecine humaine, les anticorps monoclonaux se sont avérés des réactifs de choix pour caractériser des types cellulaires (TAKEYA *et al*, 1989), isoler les sous-populations identifiées (FLO *et al.*, 1991; LEVEN and RODRIGUEZ, 1991; NAUME *et al.*, 1991) et analyser des mécanismes d'activation des cellules immunitaires.

Cette exploitation méthodologique des AcMc en immunologie des mollusques bivalves a été abordée au cours de ce travail, des hybridomes spécifiques de l'hémolymphe ayant été récemment préparés par l'équipe de l'URPIGM.

La caractérisation antigénique des hémocytes a été entreprise dans le but de pouvoir identifier plus précisément des types cellulaires, les critères morphologiques et physico-chimiques utilisés jusqu'alors étant insuffisants pour préciser les processus de filiation des hémocytes et analyser leurs fonctions spécifiques.

Deux techniques d'immunomarquage ont été utilisées : l'immunofluorescence et l'immunoperoxydase. La première s'est montrée de réalisation rapide et d'une très bonne sensibilité. L'immunoperoxydase a été généralement moins sensible ce qui a conduit pour certains anticorps à ne pouvoir détecter les hémocytes spécifiques. Des modifications dans le traitement des hémocytes avant leur marquage par des anticorps conjugués à la peroxydase devrait contribuer à accroître la sensibilité de cette technique, notamment en évitant l'utilisation de méthanol car ce produit est susceptible d'induire une altération des épitopes (SMOLOWITZ and REINISCH, 1986). Par contre l'identification morphologique des cellules s'est avérée plus facile qu'en immunofluorescence.

Plusieurs AcMc se sont révélés être spécifiques de sous-populations cellulaires et constituent de ce fait un ensemble de marqueurs de déterminants antigéniques des hémocytes de *Crassostrea gigas*. Cette caractérisation antigénique apparaît beaucoup plus résolutive que la morphologie à l'échelle de la microscopie photonique, mais devra être complétée par des observations en microscopie électronique afin d'intégrer des critères ultrastructuraux et histochimiques, mais aussi pour préciser la localisation des épitopes. Cette dernière sera prochainement abordée sur la base d'immunomarquages à l'or colloïdal (immunogold) (SLOT and GUEUZE, 1984).

La signification des marqueurs antigéniques des hémocytes a été ensuite étudiée en relation avec le critère densité cellulaire, ce dernier pouvant être directement exploitable pour la séparation de populations cellulaires et leur analyse fonctionnelle ultérieure.

La recherche de corrélations entre les phénotypes antigéniques et la densité des hémocytes a conduit à condidérer que les AcMc HCG 12 et HCG 14 constituent des marqueurs de sous-populations qui sont relativement bien séparées par centrifugation isopycnique en gradient de Percoll. Ainsi l'interface 20-30% contient 95% d'hémocytes "HCG 12 positifs", et 80% de

cellules collectées au culot sont "HCG 14 positives". Pour tous les autres phénotypes antigéniques, cette méthode de séparation est totalement inadéquate, les hémocytes d'un phénotype donné étant répartis dans l'ensemble du gradient. C'est pourquoi le critère antigénique a été directement pris en compte pour purifier les hémocytes correspondant selon un principe d'immunopurification.

Le développement en biologie cellulaire des techniques immmunologiques de séparation s'explique par les avantages apportés par ces techniques (NAUME *et al.*, 1991) : elles sont globalement rapides, de rendement élevé, et certaines ne nécessitent pas d'investissement important en matériel. De plus la pureté des fractions cellulaires est généralement excellente, l'extrême spécificité de l'immunopurification étant expliquée par la sticte reconnaissance par l'anticorps des épitopes qui doivent être membranaires.

Parmi les différentes techniques d'immunopurification, celles basées sur l'utilisation de billes magnétiques couplées à des AcMc ont été récemment appliquées avec succès à la purification de cellules immunitaires de vertébrés. La sélection est dite positive lorsque les cellules sont retenues sur les billes par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques : mégacaryocytes de cobaye / anticorps anti-GPIb de thrombocytes (LEVEN and RODRIGUEZ, 1991); cellules humaines NK "natural killer" / anticorps anti CD 56 (NAUME *et al.*, 1991) (Annexe 4).

La sélection dite négative concerne les cellules non fixées sur les billes: monocytes humains / monoclonaux anti-lymphocytes (FLO *et al.*, 1991) (Annexe 4).

L'anticorps HCG 12, dont la localisation membranaire de l'épitope a été établie sur des suspensions d'hémocytes vivants, a été retenu pour des essais d'immunopurification.

Plusieurs paramètres expérimentaux ont été optimisés (volume réactionnel, ratio billes:cellule, couplage initial de l'AcMc spécifique avec les billes ou avec les hémocytes) sur la base de comparaisons du nombre de "rosettes" obtenues (Annexe 4). Dans les conditions considérées comme optimales, il a été estimé qu'environ 60% des billes possédant l'épitope de HCG 12 sont effectivement retenues. Le rendement de cette technique est à souligner par comparaison aux techniques de centrifugation. En effet, pour les hémocytes "HCG 12 positifs", qui pourtant sont relativement homogènes du point de vue de leur densité, les rendements de purification par centrifugation isopycnique sont beaucoup plus faibles, de l'ordre de 5%. Ces mauvais résultats sont largement expliqués par la dispersion des hémocytes dans toute la hauteur du gradient, ce qui se traduit par de faibles rendements totaux, estimés dans nos expériences aux environs de 15%, ce qui est tout à fait similaire aux données publiées pour la séparation d'hémocytes d'insectes (RATCLIFFE, 1986).

En pratique l'immunopurification apparaît donc être une technique particulièrement performante qui doit être considérée en priorité chez les mollusques dans la mesure où des anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes membranaires sont disponibles. Par ailleurs la méthode indirecte semble devoir être préférentiellement utilisée.

La spécificité de l'immunopurification est également remarquable, puisqu'il a été possible d'obtenir, après quelques lavages, une fraction correspondant à une sous-population d'hémocytes strictement homogène du point de vue de leur antigénicité. Contrairement aux travaux précédemment cités concernant des cellules immunitaires de vertébrés (NAUME *et al.*, 1991), nous n'avons pas observé un détachement spontané des cellules formant avec les billes des "rosettes", et ce même après 24 heures de maintien *in vitro*. Ce phénomène est à rapprocher des difficultés de culture *in vitro* des cellules de mollusques dont le métabolisme est altéré (BOULO, comm. pers.) en particulier pour le turn-over des protéines membranaires.

D'un point de vue fonctionnel, les hémocytes peuvent être perturbés par cette rétention de plusieurs billes magnétiques à la surface cellulaire. Des enzymes protéolytiques telles que la papaïne ou la chymotrypsine, qui peuvent couper les immunoglobulines, pourraient être avantageusement utilisées pour dissocier les hémocytes des billes. Cependant des difficultés peuvent être inhérentes à la toxicité de ces enzymes sur les cellules (LEVEN and RODRIGUEZ, 1991). Une alternative pourrait consister à pratiquer la rétention des hémocytes d'un phénotype antigénique donné dans les puits de microplaques préalablement "coatés" par des AcMc spécifiques. En effet, dans ces conditions expérimentales, la majorité de la surface hémocytaire serait biologiquement disponible, et de plus les hémocytes ne subiraient pas de contacts avec des billes susceptibles de correspondre à des stimuli.

Ces différentes limitations sont par contre inexistantes pour les cellules présentes dans le surnageant et qui correspondent à une purification dite "négative". A l'instar des travaux réalisés avec des AcMc spécifiques des lymphocytes B et T utilisés pour purifier négativement des monocytes (FLO *et al.*, 1991), la purification négative des hémocytes "HCG 12 négatifs" a été prise en considération. D'une part, la population hémocytaire du surnageant est à l'évidence hétérogène et, d'autre part, des hémocytes "HCG 12 positifs" sont présents dans cette population et ne peuvent en être éliminés, même après plusieurs essais successifs de capture par des billes spécifiquement activées. Cette persistance d'hémocytes "HCG 12 positifs" peut être incriminée à une faible affinité entre l' anticorps et les épitopes présents sur certaines cellules.

En pratique, la purification négative semble peu fiable quant à l'homogénéité des suspensions hémocytaires obtenues, ce qui constitue un facteur limitant majeur pour les différents types d'études évoquées. Cependant cette méthode est particulièrement intéressante pour analyser les modifications fonctionnelles engendrées par l'élimination ou la réduction notable des hémocytes d'un seul phénotype antigénique.

Une technique alternative d'"immuno-élimination", basée sur la cytotoxicité induite par le système du complément en présence d'un complexe cellule-anticorps à été prise en considération sur la base des travaux de NAKANISHI *et al.* (1990). Cependant, les résultats préliminaires (données non montrées) suggèrent une relative résistance des hémocytes de mollusques, ce qui corrobore les données de MORGAN (1989) sur la faible sensibilité des cellules nucléées vis-à-vis du système du complément.

Ces techniques de séparation ont permis des études fonctionnelles, notament en chimioluminescence, sur des sous-populations hémocytaires antigéniquement distinctes. Il faut rappeler qu'une variabilité individuelle de la réponse des animaux en chimioluminescence a été démontrée (Annexe 3), et que les variations des hémogrammes pourraient en être la cause, s'il s'avérait que certains types antigéniques soient directement impliqués dans la génération de radicaux oxygéne. Dans cette optique, les résultats obtenus en parallèle sur la caractérisation antigénique et sur l'activité en chimioluminescence des hémocytes séparés par centrifigation isopycnique, sont particulièrement intéressants. En effet, il a été possible d'associer pour des hémocytes de la fraction 20-30% une activité élevée en chimioluminescence et un caractère "HCG 12 positif". De plus, ces hémocytes sont présents en proportion moindre dans la fraction 30-40% dont l'activité est aussi plus faible. Par ailleurs les hémocytes du phénotype antigénique HCG 14 ont une activité phagocytaire importante détectée en histologie mais ne sont pas associés à une activité de chimioluminescence.

L'épitope de l'AcMc HCG 12, présent sur les hémocytes les plus actifs en chimioluminescence, pourrait donc correspondre à un marqueur fonctionnel. Cette hypothèse méritera d'être prise en compte, d'une part en étudiant l'activité en chimioluminescence de cette sous-population préalablement immunopurifiée et, d'autre part, en recherchant à l'échelle individuelle une corrélation entre l'hémogramme et l'activité de chimioluminescence.

L'implication éventuelle des protéines membranaires, correspondant aux épitopes des AcMc spécifiques, dans les phénomènes de phagocytose et de génération du "burst" respiratoire a été étudiée sur la base d'expériences de chimioluminescence, pratiquées avec des hémocytes préalablement incubés avec ces AcMc.

Initialemnt, des surnageants de culture d'hybridomes ont été utilisés dans la mesure où des volumes importants de ces réactifs étaient facilement disponibles pour l'ensemble des AcMc sans qu'il soit nécessaire de les purifier (IgG, IgM). Une forte inhibition de la réponse en chimioluminescence a été observée quelque soit l'hybridome considéré mais aussi pour des hybridomes témoins ou du milieu de culture RPMI. Cette inhibition a été reliée à la présence dans le RPMI de gluthation qui, par son oxydation, joue un rôle de détoxification vis-à-vis des molécules oxydantes générées par le "burst" respiratoire des cellules (ROSS, 1988).

Des liquides d'ascite, très concentrés en AcMc, ont été par la suite utilisés et n'ont pas mis en évidence de modification de la réponse en CL pour 10 des AcMc testés spécifiques d'épitopes membranaires, alors que HCG 22 s'est avéré induire une inhibition totale de la réponse en CL des hémocytes. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu pour des macrophages de cobaye avec un anticorps monoclonal responsable de l'inhibition de la génération d'ions superoxyde par ces cellules (YAGAWA *et al.*, 1985). L'observation histologique des hémocytes mis en contact avec les particules de zymosan après incubation avec HCG 22 a montré une réduction de la phagocytose

du zymosan, ce qui pourrait indiquer que l'épitope de HCG 22 corresponde à un récepteur membranaire du zymosan et non pas à une protéine impliquée dans le déclenchement du "burst" respiratoire, telle que la NADPH oxydase (Annexe 1). La nature exacte de cette protéine pourrait être précisée dans la mesure où la disponibilité de l'AcMc HCG 22 permet d'envisager son immunopurification (KASPER *et al.*, 1983).

En conclusion, ce travail basé sur l'utilisation d'AcMc spécifiques ouvre la voie à la caractérisation et à l'analyse fonctionnelle des différents types d'hémocytes chez les mollusques. Mais ces maîtrises méthodologiques permettent aussi d'envisager d'utiliser des réactifs hétérologues préparés par les immunologistes de vertébrés.

D'ores et déjà, des activités de type IL1 et TNF ont été mises en évidence chez la moule *Mytilus edulis* par des tests immunologiques (HUGUES *et al.*, 1990, 1991) et des hémocytes de *C. gigas* ont été marqués en immunohistologie par des anticorps monoclonaux spécifiques de cytokines humaines anti-IL1, anti-IL6 et anti-TNF (données non montrées).

Par référence aux travaux réalisés sur la stimulation des neutrophiles humains avec des cytokines recombinantes tels que le TNF (BERKOW and DODSON, 1988) ou le GM-CSF (KOWANKO *et al.*, 1991), il sera possible d'effectuer des expériences similaires avec les hémocytes de mollusques, ces recherches s'inscrivant délibérément dans une perspective d'immunologie comparée.

BIBLIOGRAPHIE

ADEMA C. M., VAN DEUTEKOM-MULDER E. C., VAN DER KNAAP W. P. W., MEULEMAN E. A. and SMINIA T., 1991. Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. Dev. comp. Immunol., 15:17-26.

BACHERE E., CHAGOT D. and GRIZEL H., 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. Dev. comp. Immunol, 12:549-559.

BACHERE E., HERVIO D. and MIALHE E., 1991. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalve species, *Ostrea edulis and Crassostrea gigas*. Dis. aquat. Org., in press.

BACHERE E., HERVIO D., MIALHE E. and GRIZEL H., 1990. Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. Dev. comp. Immunol., 14:261-268.

BADWEY J. A. and KARNOSKY M. L., 1980. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. Ann. Rev. Bioch., 49:695-726.

BANG F.B., 1975. Phagocytosis in Invertebrates. In "Invertebrate Immunity", Maramorosch K. and Hope R. E. (Eds), Acad. Press, New-York, pp 137-151.

BECH G., O'BRIEN R. F. and HABICHT G. S., 1989. Invertebrate cytokines: the phylogenic emergence of interleukin 1. BioEssays, 11:62-67.

BERG C. O., 1973. Biological control of snail-borne diseases: a review. Exp. Parasitol., 33:318-330.

BERKOW R. L. and DODSON M. R., 1988. Biochemical mechanisms involved in the priming of neutrophils by tumor necrosis factor. J. Leuk. Biol., 44:345-352.

CHENG T.C., 1980. Bivalves. In "Invertebrate Blood Cells", Ratcliffe N. A.and Rowley A. F. (Eds), Acad. Press, London, pp 233-300.

COMPS M., BONAMI J. R., VAGO C. et CAMPILLO A., 1976. Une virose de l'huître portugaise *(Crassostrea angulata* LMK). C.R. Acad. Sc., Paris, Série D, 282:1991-1993.

DIKKEBOOM R., BAYNE C. J., VAN DER KNAAP W. P. W. and TIJNAGEL J. M. G., 1988. Possible role of reactive forms of oxygen in *in vitro* killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnea stagnalis*. Parasitol. Res., 75:148-154.

DIKKEBOOM R., TIJNAGEL J. M. G., MULDER E. C., VAN DER KNAAP W. P. W., 1987.Hemocytes of the pond snail *Lymnea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. J. Invertebr. Pathol., 49:321-331.

DIKKEBOOM R., VAN DER KNAAP W. P. W., MAASKANT J. J., DE JONGE A. J. R., 1985. Different subpopulations of haemocytes in juvenile, adult and *Trichobilharzia ocellata* infected *Lymnea stagnalis* : a characterization using monoclonal antibodies. Z. Parasitenkd, 71:815-819.

FISHER W. S., 1986. Structure and functions of oyster hemocytes. In "Immunity in Invertebrates. Cells, molecules and defense reactions", Brehélin M. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin. pp 25-35.

FLO R. W., NAESS A., LUND-JOHANSEN F., MAEHLE B. O., SJIRSEN H., LEHMANN V. and SOLBERG C. O., 1991. Negative selection of human monocytes using magnetic particles covered by anti-lymphocyte antibodies. J. immunol. Methods, 137:89-94.

FROMTLING R. A. and ABRUZZO G. K., 1985. Chemiluminescence as a tool for evaluation of antimicrobial agents: a review. Meth. Find. exper. clin. Pharmacol., 7:493-500.

GODAN D., 1983. Pest slugs and snails. Springer-Verlag, Berlin, pp 445.

GRANATH W. O. and YOSHINO T. P., 1983. Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzyme markers. J. exp. Zool., 226:205-210.

GRIZEL H. and HERAL M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas)*. J. Cons. int. Explor. Mer, 47:399-403.

GRIZEL H., COMPS M., BONAMI J. R., COUSSERANS F., DUTHOIT J. L. et LE PENNEC M. A., 1974. Recherche sur l'agent pathogène de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* L.. Sci. Pêche, Bull. Inst. Pêches marit., 240:7-30.

HUGUES T. K., SMITH E. M., CHIN R., CADET P., SINISTERRA J., LEUNG M. K., SHIPP M. A., SCHARRER B. and STEFANO G. B., 1990. Interaction of immunoactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. Proc. natl. Acad. Sci., USA, 87:4426-4429.

HUGUES T. K.,SMITH E. M., BARNETT J. A., CHARLES R. and STEFANO G. B., 1991. LPS stimulated invertebrate hemocytes : a role for immunoreactive TNF and IL-1. Dev. comp. Immunol., 15:117-122.

JOHANSSON A. and DAHLGREN C., 1989. Characterization of the luminol-amplified light-generating reaction induced in human monocytes. J. Leuk. Biol., 45:444-451.

KASPER L.H., CRABB J.H. and PFEFFERKORN E.R., 1983. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. J. Immunol, 130:2407-2412.

KOHLER G. and MILSTEIN C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. Nature, 256:495-497.

KOWANKO I. C., FERRANTE A., HARVEY D. P. and CARMAN K. L., 1991. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments neutrophil killing of *Torulopsis glabrata* and stimilates neutrophil respiratory burst and degranulation. Clin. exp. Immunol., 83:225-230.

LEVEN R. M. and RODRIGUEZ A., 1991. Immunomagnetic bead isolation of megacaryocytes from guinea-pig bone marrow : effect of recombinant interleukin-6 on size, ploidy and cytoplasmic fragmentation. British J. Haematol., 77:267-273.

LINDENA J. and BURKHARDT H., 1990. Chemiluminescence properties of human, canine and rat polymorphonuclear cells. J. Biolum. Chemilum., 5:165-170.

LOKER E. S. and BAYNE C., 1986. Immunity to trematode larvae in the snail Biophalaria. Symp. zool. Soc. Lond., 56:199-220.

McKERROW J. H., JEONG K. H. and BECKSTEAD J. H., 1985. Enzyme histochemical comparison of *Biomphalaria glabrata* amebocytes with human granuloma macrophages. J. Leuk. Biol., 37:341-347.

MEULEMAN E. A., BAYNE C. J. and VAN DER KNAAP W. P. W., 1987. Immunological aspects of snail-trematode interactions. in "Developmental and comparative immunology", Alan R. Liss, Inc., pp 113-127.

MIALHE E., BACHERE E., CHAGOT D. and GRIZEL H., 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L.. Aquaculture, 71:293-299.

MORGAN B. P., 1989. Complement membrane attack on nucleated cells : resistance, recovery and non-lethal effects. Biochem. J., 264:1-14.

MOURTON C., BOULO V., CHAGOT D., HERVIO D., BACHERE E., MIALHE E. and GRIZEL H., 1991. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): *in vitro* model establishment. J. Invertebr. Pathol., in press.

NAKAMURA M., MORI K., INOOKA S. and NOMURA T., 1985. *In vitro* production of hydrogen peroxyde by the amoebocytes of the scallop *Patinopecten yessoensis*. Dev. comp. Immunol., 9:407-417.

NAKANISHI M., YAGAWA K., AIDA Y., HAYASHI S., ICHINOSE Y. and YOSHIDA M., 1990. The *in vivo* and *in vitro* use of monoclonal antibody for the deletion of phagocytic cells in guinea pigs. Hybridoma, 9:443-451.

NAUME B., NONSTAD U., STEINKJER B., FUNDERUND S., SMELAND E. and ESPEVIK T., 1991. Immunomagnetic isolation of NK and LAK cells. J. immunol. Methods, 136:1-9.

OLAFSEN J. A., 1986. Invertebrates lectins : biochemical heterogeneity as a possible key to their biological function. In "Immunity in Invertebrates. Cells, molecules, and defense reactions". BREHELIN M. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp.94-111.

PICHOT Y., COMPS M., GRIZEL H. et RABOUIN M.A., 1980. Recherches sur *Bonamia ostreae*, gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L.. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 43:131-140.

PIPE R. K., 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Histochem. J., 22:595-603.

RATCLIFFE N. A., MEAD G. P. and RENWRANTZ L. R., 1986. Insect haemocyte separation : an essential prerequisite to progress in understanding insect cellular immunity. In "Immunity in Invertebrates. Cells, molecules, and defense reactions". Bréhelin M. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp.3-11

RENWRANTZ L. and STAHMER A., 1983. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. J. comp. Physiol., 149:535-546.

RODRICK G. E. and ULRICH S. A., 1984. Microscopical studies on the hemocytes of bivalves and their phagocytic interaction with selected bacteria. Helgoländer Meeresunters, 37:167-176.

ROSS D., 1988. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents . Pharmac. Ther., 37:231-249.

SLOT J.W. and GUEUZE H.J., 1984. Gold markers for single and double immunolabelling of ultrathin cryosections. Immunolabelling for Electron Microscopy. POLAK J.M. and VARNDELL I.M., Eds, Elsevier Science Publishers B.P., pp 129-140.

SMINIA T. and VAN DER KNAAP W. P. W., 1987. Cells and molecules in molluscan immunology. Dev. comp. Immunol., 11:17-28

SMOLOWITZ R. M. and REINISCH C. L., 1986. Indirect peroxidase staining using monoclonal antibodies specific for *Mya arenia* neoplastic cells. J. Invertebr. Pathol.,48:139-145.

SUN S., LINDSTROM I., BOMAN H. G., FAYE I. and SCHMIDT O., 1990. Hemolin : an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. Science, 250:1729-1732.

TAKAHASHI K., MORI K. and NOMURA T., 1986. Occurrence and characterization of lysozyme in the marine bivalves. Bull. japan. Soc. Sci. Fisheries, 52:863-868.

TAKEYA M., HSIAO L., SHIMOKAWA Y. and TAKAHASHI K., 1989. Heterogeneity of rat macrophages recognized by monoclonal antibodies : an immunohistochemical and immunoelectron microscopic study. J. Histochemistry and Chytochemistry, 37:635-641.

VAN DER KNAAP W. P. W. and MEULEMAN E. A., 1986. Interaction between the immune system of lymnaeid snails and trematode parasites. Symp. zool. Soc. Lond., 56:179-198.

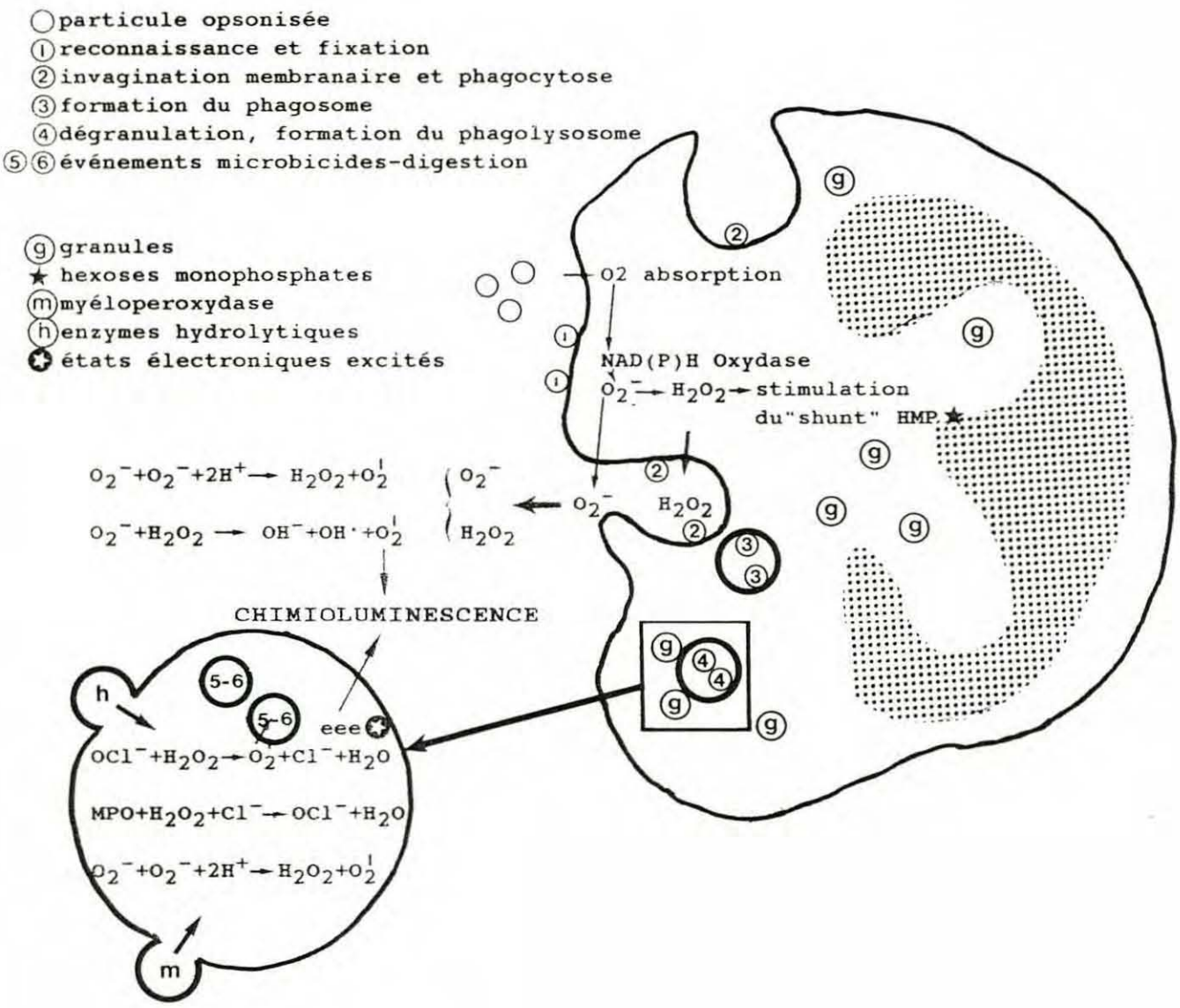
YAGAWA K., KAKU M., ICHINOSE Y. AIDA Y. and TOMODA A., 1985. Characterization of three monoclonal antibosies which induce and modulate superoxide anion generation in guinea pig macrophages. J. Immunil., 134:4107-4111.

YOSHINO T. P. and GRANATH W. O., 1983. Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers. Cell Tissue Res., 232:553-564.

ANNEXES

ANNEXE I

"BURST" RESPIRATOIRE DANS LES CELLULES PHAGOCYTAIRES ET PHENOMENE DE CHIMIOLUMINESCENCE.



ANNEXE II

PROTOCOLE UTILISE POUR LES MESURES DE CHIMIOLUMINESCENCE CHEZ *CRASSOSTREA GIGAS*.

1. PONCTION D'HEMOLYMPHE

Ponction (V/V)
Hémolymphe (H)/ Alsever (SMA)
(anti-agrégante)

↓

Numération → Aliquots de 200.000 hémocytes

↓

centrifugation

↓

50 µl hémocytes (H/SMA) remis en suspension dans l'eau de mer filtrée

→ Activité de base CL

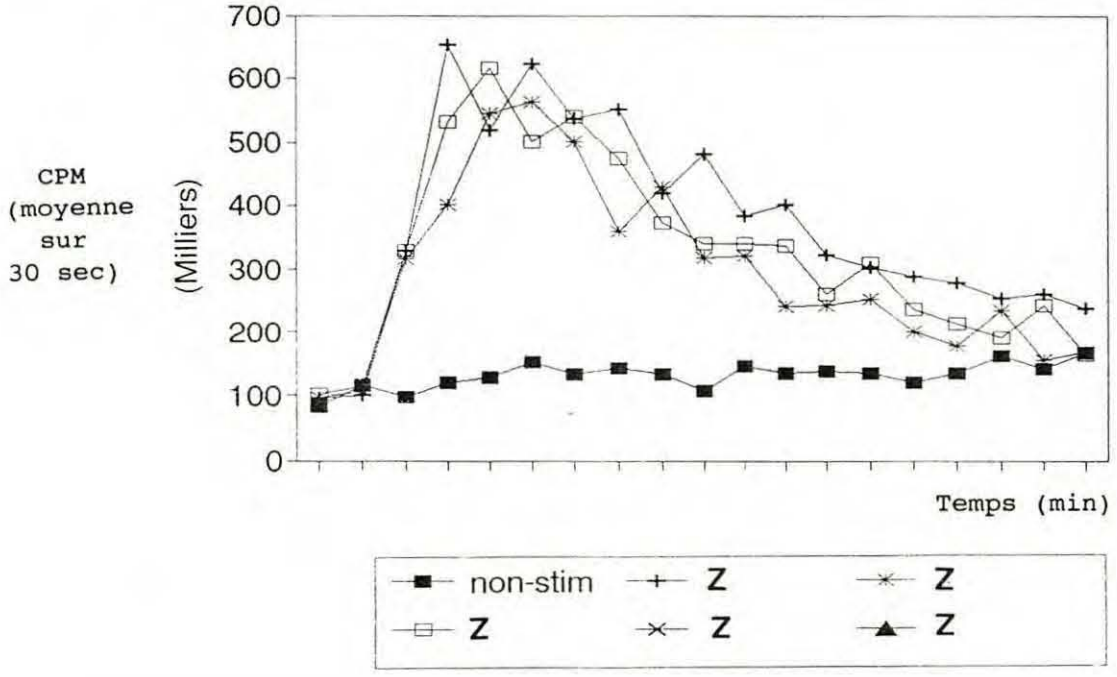
→ Stimulation Zymosan

2. PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Hémocytes : 200.000
Luminol : 10^{-4} M
Eau de mer filtrée (0.22µm) qsp 2 ml
Zymosan : 80 particules/hémocyte additionnées après deux comptages.

3. MESURE DE L'ACTIVITE DE CHIMIOLUMINESCENCE

Activité de chimioluminescence de l'échantillon mesurée dans un compteur à scintillation liquide placé hors coïncidence.



ANNEXE III

ACTIVITE DE CHIMIOLUMINESCENCE ET HEMOGRAMMES DES INDIVIDUS DE TROIS LOTS D'HUITRES *C. GIGAS* (MOYENNE ± ECART-TYPE)

	LOT A (n=9)	**LOT B** (n=11)	**LOT C** (n=18)
C.LUMINESCENCE* (10^4 cpm)	28,0 ± 23,0	65,6 ± 42,3	24,7 ± 17,3
HYALINOCYTES (%)			
-GRANDS	10,3 ± 9,4	16,9 ± 9,7	34,5 ± 13,1
-MOYENS	16,3 ± 7,1	26,4 ± 12,7	15,5 ± 7,4
-PETITS	53,8 ± 19,8	27,3 ± 18,6	10,2 ± 7,5
GRANULOCYTES (%)	19,4 ± 9,9	29,2 ± 15,3	39,6 ± 12,4

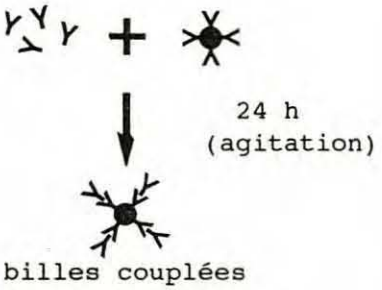
* différence entre la valeur du pic observé après stimulation par le zymosan et la valeur de l'activité de base

ANNEXE IV

IMMUNOPURIFICATION D'HEMOCYTES A L'AIDE DE BILLES MAGNETIQUES

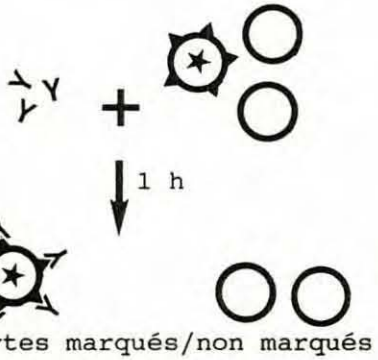
METHODE DIRECTE

1/ Couplage des Ac Mc spécifiques d'épitopes membranaires avec des billes magnétiques activées sur lesquelles sont fixées des Ac anti-IgG de souris.

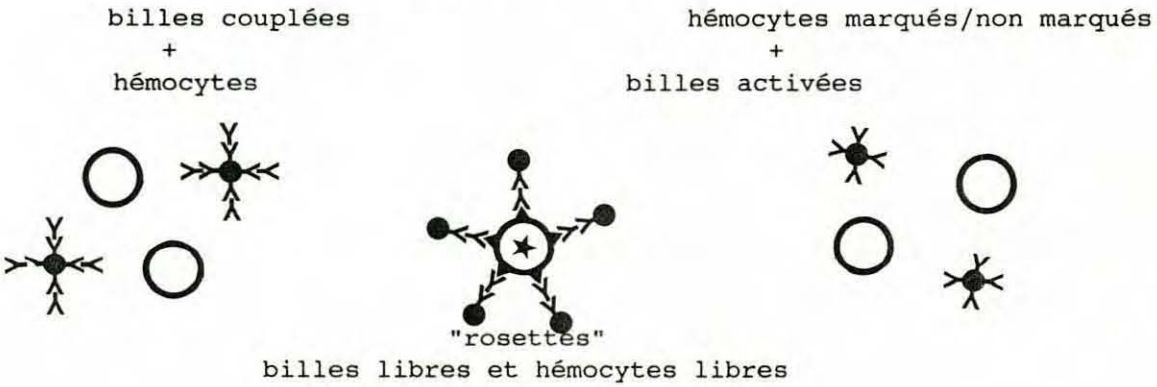


METHODE INDIRECTE

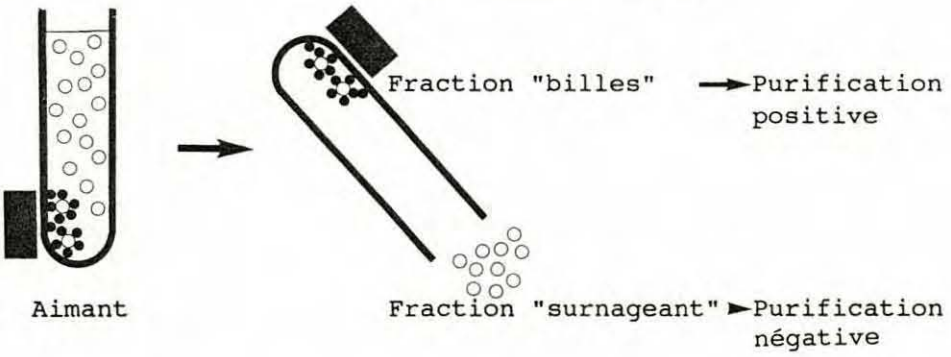
1/ Couplage des Ac Mc spécifiques d'épitopes membranaires avec les hémocytes.



2/ Formation de "rosettes"



3/ Immunoséparation



Annexe V

Solution Modifiée d'Alsever : composition

- Glucose ..... 20,80 g
- Na_3 citrate ..... 8,00 g
- EDTA ..... 3,36 g
- NaCl ..... 22,50 g
- Eau distillée ..... q.s.p. 1 litre

Le pH de la solution est ajusté à 7,5.