

OL
430.7
M95
L35
1995

Expérimentation en vue de la mise au point d'un test d'immunotoxicité en microplaque sur hémocytes de *Mytilus edulis*

Corinne Lallement
Écotoxicologie et chimie environnementale
Laboratoire régional

CENTRE DE DOCUMENTATION CSL
105, MCGILL, 2ième étage
MONTRÉAL (Québec) H2Y 2E7
Tél.: (514) 283-2762
Fax: (514) 283-9451

Centre Saint-Laurent
Conservation de l'environnement
Environnement Canada – Région du Québec

Mai 1995

COMMENTAIRES DES LECTEURS

Veillez adresser vos commentaires sur le contenu du présent rapport au Centre Saint-Laurent, Conservation de l'environnement, Environnement Canada – Région du Québec, 105, rue McGill, 4^e étage, Montréal (Québec), H2Y 2E7.

On devra citer la publication comme suit :

Lallement, C. 1995. *Expérimentation en vue de la mise au point d'un test d'immunotoxicité en microplaque sur hémocytes de Mytilus edulis*. Environnement Canada - Région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent. Rapport scientifique et technique ST-39, 34 pages.

© Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1995

N° de catalogue En 153-71/1996F

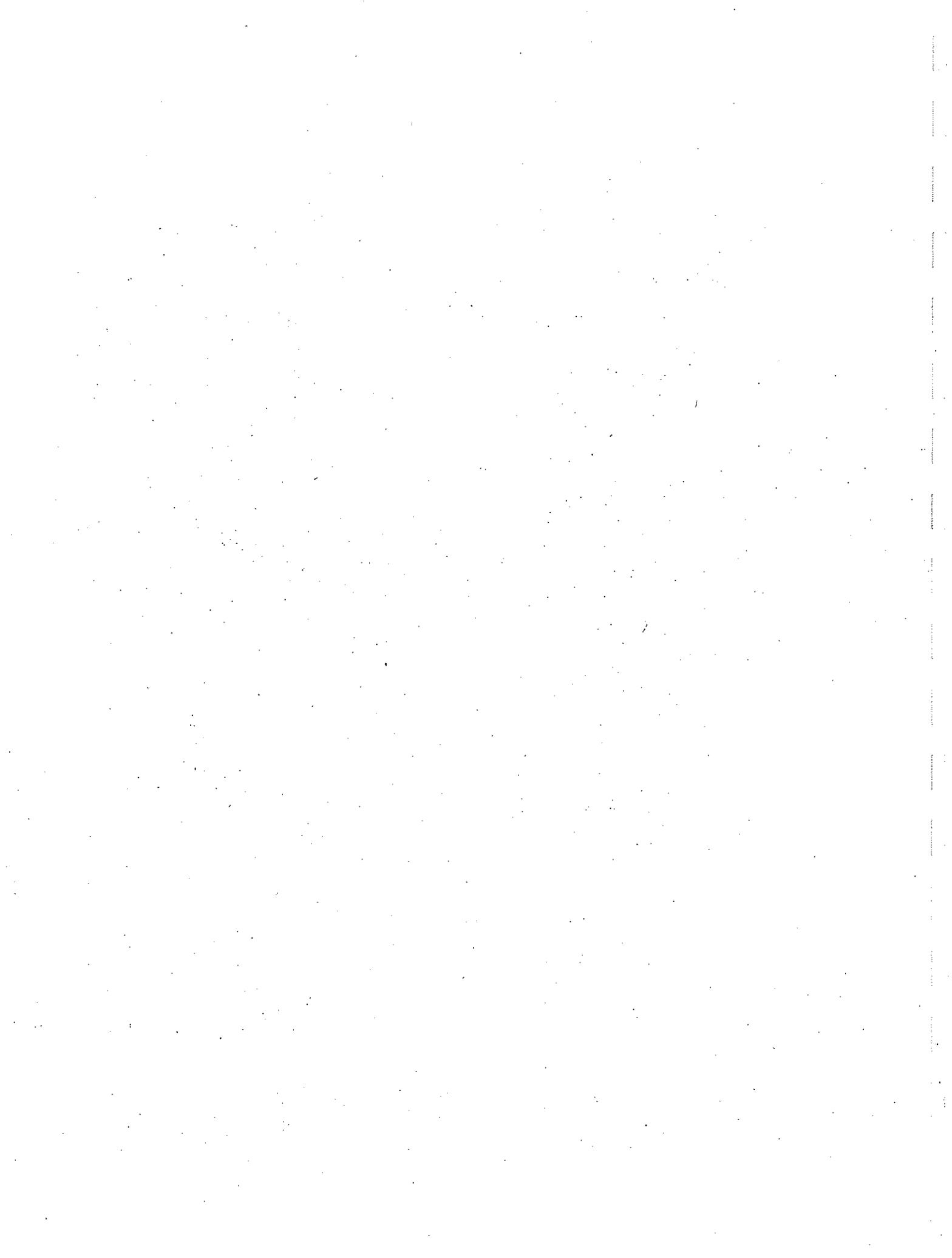
ISBN 0-662-80846-0

Perspective de gestion

Ce rapport est publié dans le cadre du plan d'action fédéral-provincial Saint-Laurent Vision 2000 (SLV 2000). Le volet «Aide à la prise de décision» du plan d'action comprend entre autres la mise au point de bioessais écotoxicologiques pour fournir aux gestionnaires de programmes des outils de décision en matière environnementale. Le présent rapport résulte de travaux d'expérimentation pour mettre au point un test d'immunotoxicité.

Management Perspective

This document is published as part of the federal-provincial St. Lawrence Vision 2000 action plan. Under the decision-support component of this action plan, ecotoxicological bioassays are being developed to provide program managers with environmental decision-support tools. This report is the result of an experimentation to develop an immunotoxicity test.



Résumé

Le présent rapport porte sur les expériences réalisées dans le but de mettre au point un test d'immunotoxicité à partir de la comparaison des capacités de phagocytose d'hémocytes de *Mytilus edulis* avec et sans exposition à des substances immunotoxiques.

Le test d'immunotoxicité, réalisé sur microplaque, se déroule en trois étapes : a) l'adhésion des hémocytes dans les puits de la microplaque; b) la phagocytose de bactéries fluorescentes par les hémocytes mis en présence de substances toxiques; et c) la mesure spécifique de la fluorescence émise par les bactéries ingérées.

Une bonne corrélation entre la densité optique de l'hémolymphe (lue à 595 nm) et le dénombrement au microscope des hémocytes a été établie. Le temps optimal nécessaire à l'adhésion des hémocytes dans les puits de la microplaque a été évalué à une heure. Sans en être un facteur indispensable, le sérum stimule la phagocytose : la réponse est d'autant plus forte que le taux de sérum est élevé. Le test de phagocytose a été complété par un test avec diacétate de fluorescéine qui permet de mesurer un effet cytotoxique (léthalité) sur les hémocytes.

Les résultats des mesures de phagocytose sur un même mélange d'hémolymphe (mélange d'hémolymphe de plusieurs moules) varient de 14 %. Afin d'éviter les erreurs d'interprétation liées à des variations dues à l'état physiologique des moules au moment du prélèvement, les résultats de fluorescence des tests avec intoxication sont comparés aux résultats des témoins. La digitonine en concentrations de 17 à 680 $\mu\text{g/L}$ semble n'avoir aucun effet sur la phagocytose, alors que l'azide de sodium aux concentrations de 0,25 à 2 g/L inhibe la phagocytose de 60 %.

Ce développement initial doit se poursuivre par une série de tests avec des métaux et d'autres toxiques, en vérifiant la répétabilité des résultats. Il est nécessaire de rechercher une substance inhibitrice de la phagocytose qui n'ait aucun effet sur la viabilité cellulaire, afin de l'intégrer comme témoin positif dans les tests.

Ce test, dans son application éventuelle à des organismes prélevés dans l'environnement, permettra de mesurer trois paramètres révélant leur état physiologique :

la concentration d'hémocytes dans l'hémolymphe;
le pourcentage de viabilité des hémocytes;
leur capacité phagocytaire.

Abstract

This paper deals with experiments conducted to develop an immunotoxicity test based on comparing the phagocytic capacity of hemocytes in two groups of *Mytilus edulis*, one having been exposed to immunotoxic substances, the other not.

A microplate was used and testing was carried out in three stages: 1) adhesion of hemocytes in the microplate wells; 2) hemocytic phagocytosis of fluorescent bacteria in the presence of toxic substances; c) measurement of the fluorescence emitted by ingested bacteria.

There was a good correlation between the optical density of the hemolymph (read at 595 nm) and the microscopic numbering of hemocytes. Optimal time period for hemocyte adhesion in the microplate wells was determined to be one hour. Though not a determining factor, the hemolymph does stimulate phagocytosis: response was strongest when the rate of serum was highest. The phagocytosis test was complemented by a fluorescein diacetate test in order to measure cytotoxic (lethal) effects on the hemocytes.

Results of phagocytosis measurements varied by 14% within a single hemolymphic mixture (a mixture of hemolymphs from several mussels). To avoid any errors in interpretation due to variations in the physiological condition of the sampled mussels, fluorescence in intoxicated samples was compared to that of the control group. Digitonin concentrations between 17 to 680 µg/L appear to have no effect on phagocytosis, whereas sodium azide concentrations of 0.25 to 2 g/L inhibit phagocytosis by 60%.

These initial findings must be pursued using a series of tests on metals and other toxics to verify the replicability of results. A phagocytosis-inhibiting substance with no effect on cell viability must be found for use as a positive control during testing.

In its future application, this test will measure three parameters of the physiological state of organisms taken from the environment:

- hemocytic concentration in the hemolymph
- percentage of viable hemocytes
- their phagocytic capacity.

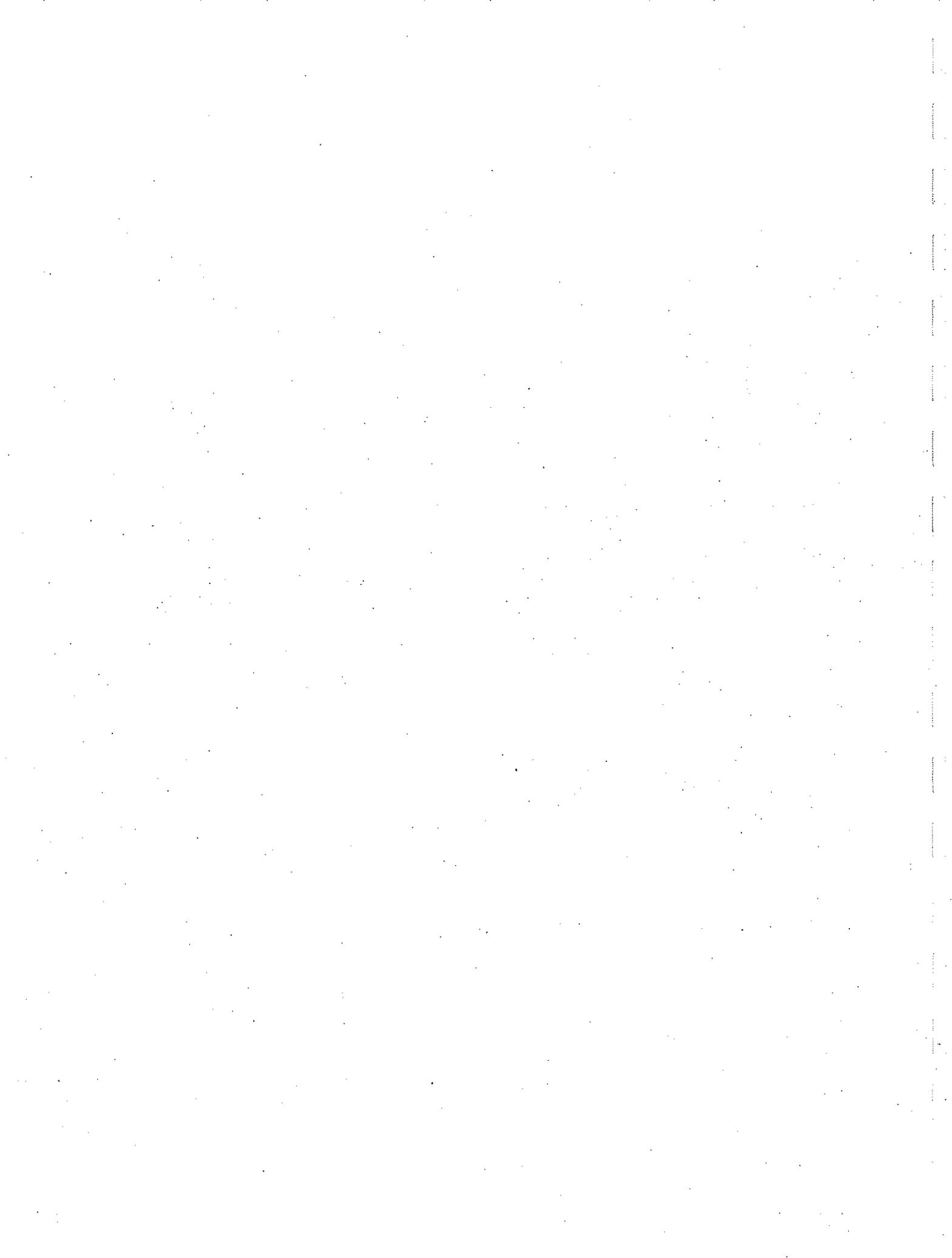


Table des matières

RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	vii
LISTE DES FIGURES	xi
DÉFINITIONS	xii
1 INTRODUCTION	1
2 MATÉRIEL ET PRÉPARATION DES ESSAIS	3
2.1 Matériel, équipement et produits chimiques pour l'élevage des moules	3
2.1.1 Matériel	3
2.1.2 Équipement	3
2.1.3 Produits, organismes et nourriture	3
2.2 Élevage des moules	4
2.2.1 Milieu d'élevage	4
2.2.2 Contrôle et entretien	4
2.3 Matériel et produits utilisés pour les tests de phagocytose et de cytotoxicité	5
2.3.1 Matériel	5
2.3.2 Équipement	5
2.3.3 Produits chimiques	5
2.4 Préparation des échantillons	7
2.4.1 Produits chimiques en solution	7
2.4.2 Effluents	7
3 MÉTHODES D'ESSAIS	8
3.1 Prélèvement de l'hémolymphe	8
3.2 Essais préliminaires	8
3.2.1 Dénombrement des hématocytes	8
3.2.2 Optimisation du temps d'adhésion	8
3.2.3 Influence du sérum sur la phagocytose	9
3.2.4 Test de viabilité cellulaire	9
3.3 Méthodes d'essais de phagocytose et de cytotoxicité	9

x

4	RÉSULTATS ET DISCUSSION	13
4.1	Essais préliminaires	13
4.1.1	Dénombrement des hémocytes	13
4.1.2	Optimisation du temps d'adhésion	15
4.1.3	Influence du sérum sur la phagocytose	16
4.1.4	Test de viabilité cellulaire	17
4.2	Tests de phagocytose et de cytotoxicité	18
5	CONCLUSION	20
	RÉFÉRENCES	21

Liste des figures

1	Mode opératoire des tests de phagocytose et de toxicité	10
2	Évolution de la densité optique à 595 nm d'une hémolymphé en fonction du dénombrement au microscope des hémocytes qu'elle contient	14
3	Hémocytes étalés (image grossie 400 fois)	14
4	Évolution de la concentration d'hémocytes dans le surnageant après différents temps d'adhésion	15
5	Évolution de la phagocytose en fonction du pourcentage de sérum	16
6	Suivi de la viabilité (FDA) et de la mortalité (BT) en fonction de la teneur en digitonine	17
7	Évolution du rapport entre les fluorescences (FDA) des essais et des témoins en fonction de la mortalité	18

Définitions

Hémocyte. - Cellule sanguine de *Mytilus edulis* et des mollusques en général, responsable de la phagocytose dans le système de défense immunitaire.

Sérum. - Liquide constituant l'hémolymphe lorsque les hémocytes ont été retirés.

Quenching ou extinction. - Passage pour une substance donnée (ici, la fluorescéine) d'un état fluorescent à un état non fluorescent.

1 Introduction

Les hémocytes jouent un rôle primordial dans le processus de défense immunitaire chez les mollusques. Sans conduire à une toxicité directe, l'exposition de ces cellules à certaines substances peut modifier la réaction de l'organisme à un agent invasif (bactéries, parasites, etc.) et avoir des conséquences graves pour la survie d'une population.

Il est donc intéressant d'employer des mollusques marins ou d'eau douce comme bio-indicateurs de substances (ou de conditions) immunotoxiques dans leur milieu. Par extension, la réalisation d'un test *in vitro* utilisant directement les hémocytes permettrait d'évaluer rapidement et spécifiquement les effets immédiats d'une substance sur la défense immunitaire d'un organisme.

Il existe plusieurs techniques qui permettent de quantifier l'activité phagocytaire des hémocytes de différents mollusques. Ces techniques diffèrent par le type de particules invasives utilisées (bactéries, levures, billes de polystyrène) et par la méthode de quantification des particules ingérées :

- le dénombrement microscopique des particules ingérées après fixation et coloration des hémocytes, employé par Abdul-Salam et Michelson (1980) et Beckmann *et al.* (1992);
- l'utilisation de billes de polystyrène fluorescentes (Eisher et Tamplin, 1988), ce qui facilite leur visualisation et leur dénombrement;
- la technique de quenching par le bleu de trypan (Hed, 1986) qui permet de dénombrer spécifiquement les particules fluorescentes ingérées par les hémocytes par rapport aux particules adsorbées sur leur membrane.

Toutes ces techniques présentent l'avantage d'obtenir une lecture directe du nombre de particules ingérées, mais les comptages microscopiques les rendent longues et fastidieuses.

Parmi les autres techniques plus rapides, on compte :

- l'ingestion de billes de latex, suivie de plusieurs lavages et d'une lyse totale des hémocytes, dont la quantité est ensuite mesurée par densité optique (Cheng, 1984);
- la cytométrie en flux utilisée par Alvarez *et al.* (1989) sur les hémocytes après phagocytose, qui permet de connaître le nombre de particules fluorescentes ingérées par cellule;

- la mesure de la baisse de luminescence causée par l'ingestion de *Photobacterium phosphoreum* par les hémocytes de *Mytilus edulis* (Hansen *et al.*, 1991);
- et la chimiluminescence appliquée à la mesure de la phagocytose utilisée par Roszell *et al.* (1994), Bachère *et al.* (1991) et Anderson *et al.* (1992).

L'objectif de la présente étude est de mettre au point un test simple et rapide permettant d'évaluer, *in vitro*, les effets d'une substance donnée sur le système immunitaire de la moule bleue, *Mytilus edulis*. Dans ce but, le test de phagocytose en microplaque sur macrophages de souris, décrit par Wan *et al.* (1993), a été adapté à des hémocytes de moules marines et complété par un test de viabilité (Alvarez *et al.*, 1991), indispensable pour distinguer un effet immunotoxique d'un effet cytotoxique.

Les bactéries *E. coli* marquées à la fluorescéine, adsorbées sur les hémocytes sont différenciées des bactéries phagocytées par l'utilisation du bleu de trypan (Hed, 1986) parce que ce colorant des cellules mortes a également la capacité de *quencher* la fluorescéine.

2 Matériel et préparation des essais

2.1 MATÉRIEL, ÉQUIPEMENT ET PRODUITS CHIMIQUES POUR L'ÉLEVAGE DES MOULES

2.1.1 Matériel

Le matériel nécessaire à l'élevage des moules comprend :

- aquarium en verre de 45 L (Ward's Natural Science Ltd.);
- système de filtration sur mousse synthétique et charbon (Aquaclear 200, Hagen Inc.);
- corail (Atlantic Crushed Coral, Nature's Ocean, World Wide Import Plantation, Floride).

2.1.2 Équipement

L'équipement nécessaire à l'élevage des moules comprend :

- pièce thermostatée à 15 °C, avec une photopériode de 12 h/24 h;
- réfractomètre (Leica 10419);
- appareil pour hacher la nourriture;
- trousse de mesure colorimétrique de la teneur en nitrites (Aquarium System).

2.1.3 Produits, organismes et nourriture

Les produits nécessaires à l'élevage des moules comprennent :

- sels pour reconstituer l'eau de mer (Tropic Marine Center Ltd.);
- eau déchlorée;
- nourriture 1 : nourriture congelée hachée (Sally's Emerald Entrée™, San Francisco Bay Brand), dont des aliquotes de 5 mL ont été congelés dans des tubes de plastique;
- nourriture 2 : nourriture liquide pour filtreurs marins (Coralife Invertebrate, Energy Savers Unlimited);
- moules bleues sauvages (*Mytilus edulis*) provenant de la poissonnerie (livraison le jeudi à la poissonnerie Waldman, rue Roy, Montréal).

2.2 ÉLEVAGE DES MOULES

2.2.1 Milieu d'élevage

L'aquarium doit être préparé (dans une pièce conditionnée à 15 °C) au moins un jour avant l'arrivée des moules. Le corail déposé en couche d'environ 2 cm permet de tamponner le pH (7,8) de l'eau de mer. Cette dernière est préparée avec de l'eau déchlorée à une salinité de 30 g/L qui correspond au milieu naturel des moules. L'aquarium est rempli à raison d'au moins 500 mL d'eau de mer par moule. Le contact de l'eau de mer avec le corail brouille l'eau pendant une journée environ. Il est nécessaire d'éviter de provoquer des remous à chaque prélèvement ou dépôt pour conserver l'eau claire.

Les moules, transportées sur de la glace, sont placées pendant une demi-journée à 15 °C dans un bac d'eau de mer reconstituée à 30 g/L. Cette étape permet de retirer les moules mortes et de nettoyer les autres pour éviter de polluer l'aquarium. Les moules sont ensuite déposées dans l'aquarium, directement sur le corail, et le système de filtration est branché.

2.2.2 Contrôle et entretien

La teneur en nitrites est mesurée hebdomadairement. Lors de l'installation de l'aquarium, un pic de nitrites apparaît dans les 15 premiers jours et doit être considéré comme un phénomène normal qui précède la croissance des bactéries dénitrifiantes sur le filtre à charbon. Un accroissement de la teneur en nitrites peut survenir en raison d'une surpopulation des moules (pas assez d'eau ou d'espace par moule) ou à cause d'une surabondance de nourriture.

Dans le cas d'une population de 20 moules, les deux types de nourritures sont donnés en alternance (un jour sur deux) cinq jours par semaine, à raison de 1 mL de nourriture 1 ou de 10 gouttes de nourriture 2.

Chaque semaine, une portion d'eau de mer (10 %) est remplacée, et la salinité est mesurée au réfractomètre et, le cas échéant, ajustée. Chaque mois, le filtre au charbon ou l'éponge synthétique sont rincés alternativement pendant une minute à l'eau déchlorée.

2.3 MATÉRIEL ET PRODUITS UTILISÉS POUR LES TESTS DE PHAGOCYTOSE ET DE CYTOTOXICITÉ

2.3.1 Matériel

Le matériel nécessaire à la réalisation des essais comprend :

- microplaques noires à fond plat Fluoroplate Titertek Flow;
- couvercles pour microplaques recouverts de papier d'aluminium;
- microplaques transparentes à fond rond;
- seringue et aiguille 23GTW Becton-Dickinson (Fisher);
- tubes Eppendorf de 2 mL;
- tubes en plastique de 5 à 10 mL;
- bac à glace;
- lames pour microscopie;
- hématimètre Neubauer.

2.3.2 Équipement

L'équipement nécessaire à la réalisation des essais comprend :

- microscope à fluorescence Leitz;
- spectrophotomètre Titertek ABS de 595 nm;
- appareil à ultrasons Sonifier Cell Disruptor 350 Branson Sonic Power Co., muni d'une sonde Tapered Micro Tip utilisée en mode pulsé, avec 10 % de cycles actifs et puissance minimale;
- microfluorimètre Titertek Fluoroskan II 371 (Ex à 492 nm; Em à 538 nm), couplé au logiciel Automate;
- hotte pour la manipulation de produits dangereux.

2.3.3 Produits chimiques

Les produits chimiques nécessaires à la réalisation de l'essai comprennent :

- tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) de 1000 mosm composé de 1,8 mmol/L de KH_2PO_4 , de 10,1 mmol/L de Na_2HPO_4 , de 4860 mmol/L de NaCl et de 10 mmol/L de KCl; le pH de la solution est ajusté à 7,4 (pH mesuré de l'hémolymphe); l'osmolarité correspond à celle de l'eau de mer dans l'aquarium;

- bactéries *E. coli* marquées à la fluorescéine (Molecular Probe), lyophilisées et conditionnées à 10 mg par flacon; elles sont mises en suspension dans un flacon de verre fumé avec 10 mL d'eau de mer à 30 g/L par vortex durant 20 s, à trois reprises, à la puissance maximale et séparées par ultrasons (30 impulsions); cette étape doit être réalisée dans les cinq minutes qui précèdent le dépôt des bactéries sur la microplaque pour éviter leur ré-agrégation; la solution de bactéries doit être maintenue à la température ambiante lorsqu'elle est versée dans les puits de la microplaque; la concentration de bactéries dans la solution est de $36 \times 10^8/\text{mL} \pm 6,3 \times 10^8/\text{mL}$; la portion de la solution de bactéries qui n'est pas utilisée dans la journée doit être congelée à -20°C parce que la fluorescence des bactéries décroît très rapidement après quelques jours de conservation à 4°C ;
- solution PBS de 340 mosm (de préférence à l'eau de mer) pour mettre les bactéries en suspension lorsqu'on ne dispose pas de sonde à ultrasons pour empêcher l'aggrégation des bactéries, et que seul le bain à ultrasons est disponible (moins puissant que la sonde), à laquelle on ajoute de l'eau de mer concentrée pour ajuster la salinité lors du contact entre les bactéries et les hémocytes; en réduisant la salinité du milieu, les risques d'agglomération sont moindres et la distribution des bactéries dans les puits est plus homogène;
- solution MAS (Modified Alsever's Solution) : solution désagrégante utilisée par Bachère *et al.* (1988) pour mettre en suspension des hémocytes d'huîtres, composée de 20,8 g/L de glucose, de 8g/L de citrate de sodium, de 3,80 g/L de EDTA, de 100 $\mu\text{L/L}$ de Tween 80 et de 23,3 g/L de NaCl;
- tampon citrate de 0,02 mol/L, à pH de 4,4 et dont l'osmolarité est ajustée à 1000 mosm avec du NaCl;
- bleu de trypan (BT) qui sert de colorant spécifique des cellules mortes, préparé par pesée différentielle (sous la hotte) d'une solution de bleu de trypan à 1 mg/mL dans le tampon citrate, puis par filtration sur filtre de porosité de 0,2 μm ;
- fluorescéine utilisée ici comme étalon du fluorimètre à $1,47 \times 10^{-4}$ mmol/L dans l'eau SQ pour contrôler la stabilité des lectures de l'appareil dans le temps;
- digitonine (toxique cellulaire) à 68 mg/L, préparée en diluant au 100^e, dans l'eau de mer, une solution de digitonine à 6,8 g/L dans du méthanol;
- azide de sodium (inhibiteur de la phagocytose) : solution à 20 g/L préparée dans l'eau de mer;
- diacétate de fluorescéine (FDA) : marqueur vital des cellules de mammifères, appliqué avec succès par Alvarez *et al.* (1991) sur des hémocytes d'huîtres, qui a permis de tester en microplaque et par fluorimétrie, la viabilité des hémocytes; la viabilité d'une cellule est révélée par l'activité des enzymes estérases, qui clivent le FDA et libèrent ainsi la fluorescéine. La fluorescence lue est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

2.4 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

2.4.1 Produits chimiques en solution

Les produits chimiques sont préparés dans l'eau de mer à des concentrations deux fois plus fortes que celles que l'on veut tester. À partir de ces solutions, une gamme de dilutions de la substance est testée.

2.4.2 Effluents

La salinité et le pH doivent être ajustés à 1000 mosin et à 7,4 respectivement. Les résultats du test se rapportent à l'effluent dilué à 50 %, parce que le volume introduit dans chaque puits était de 50 μL pour un volume total de 100 μL (voir 3.3d). Une gamme de dilutions de l'échantillon ont également été testées.

3 Méthodes d'essais

3.1 PRÉLÈVEMENT DE L'HÉMOLYMPHE

L'hémolymphe est prélevée dans le muscle adducteur postérieur de la moule à l'aide d'une aiguille insérée entre les valves, sans briser la coquille, à une profondeur d'environ 0,5 cm. Le volume aspiré dépend de la position de l'aiguille dans le muscle et peut atteindre 2 mL. Le prélèvement est transféré dans un tube Eppendorf refroidi dans la glace. L'hémolymphe est conservée dans la glace jusqu'au moment de son dépôt sur la microplaque.

Une goutte est mise sur une lame et observée au microscope (image grossie 400 fois avec contraste de phase) pour confirmer la présence d'hémocytes et éliminer les hémolymphe contaminées par des microorganismes (il est parfois possible que le liquide retiré soit de l'eau de mer). Une seconde sélection est effectuée en microplaque transparente en mesurant la densité optique (DO) à 595 nm de 100 μ L d'hémolymphe. Cette mesure permet de ne conserver pour le test que les hémolymphe qui contiennent une quantité suffisante d'hémocytes pour réaliser le test ($DO > 0,1$). Les hémolymphe sont mélangées dans un tube en plastique préalablement placé dans la glace. La DO du mélange est également mesurée à 595 nm.

3.2 ESSAIS PRÉLIMINAIRES

3.2.1 Dénombrement des hémocytes

Une corrélation entre la DO d'une hémolymphe lue à 595 nm et le dénombrement au microscope des hémocytes qu'elle contient est préalablement établie à partir de 20 moules. Pour faciliter le dénombrement au microscope sur hématimètre, les hémolymphe doivent généralement être diluées au quart ($0,1 < DO < 0,2$) ou au huitième ($DO > 0,2$) dans la solution MAS, qui permet de séparer les hémocytes fortement agrégés. Les hémocytes doivent être mis en contact au moins 10 min avec la solution MAS pour obtenir un effet désagréant.

3.2.2 Optimisation du temps d'adhésion

Un essai est réalisé pour déterminer le temps minimal nécessaire à l'adhésion des hémocytes sur la microplaque. Il consiste à déposer 100 μL d'hémolymphe dans les puits d'une microplaque noire et à dénombrer sur hématimètre les hémocytes qui restent dans les surnageants après différentes périodes de temps.

3.2.3 Influence du sérum sur la phagocytose

L'influence du sérum sur la phagocytose est évaluée en laissant, après adhésion des hémocytes sur la microplaque, différents volumes (0 à 70 μL) de surnageant (sérum). Un volume constant de solution de bactéries fluorescentes (30 μL) est ajouté, et les volumes de chaque puits sont complétés à 100 μL avec de l'eau de mer. Le déroulement de cet essai suit ensuite le protocole d'essai général du test de phagocytose décrit dans la section 3.3.

3.2.4 Test de viabilité cellulaire

Afin de valider la mesure de la viabilité par le FDA, le taux de mortalité est mesuré parallèlement avec le bleu de trypan. Cet essai est effectué sur microplaque noire avec des hémocytes mis en contact pendant une heure avec des concentrations de 0,68 mg/L à 68 mg/L de digitonine dans le PBS. Dans les puits destinés à recevoir le FDA pour la mesure de la viabilité, la fluorescence émise est mesurée par fluorimétrie (méthode décrite à la section 4.1.4). Dans les puits destinés aux dénombrements avec BT, les hémocytes sont remis en suspension avec une micropipette et déposés sur une lame de verre. Une goutte de bleu de trypan est déposée sur la lame, et le pourcentage d'hémocytes morts (colorés en bleu) est déterminé au microscope (image grossie 400 fois) par rapport aux hémocytes vivants (dénombrement total de 200 cellules).

3.3 MÉTHODES D'ESSAI DE PHAGOCYTOSE ET DE CYTOTOXICITÉ

La méthode décrite dans les paragraphes qui suivent est illustrée à la figure 1.

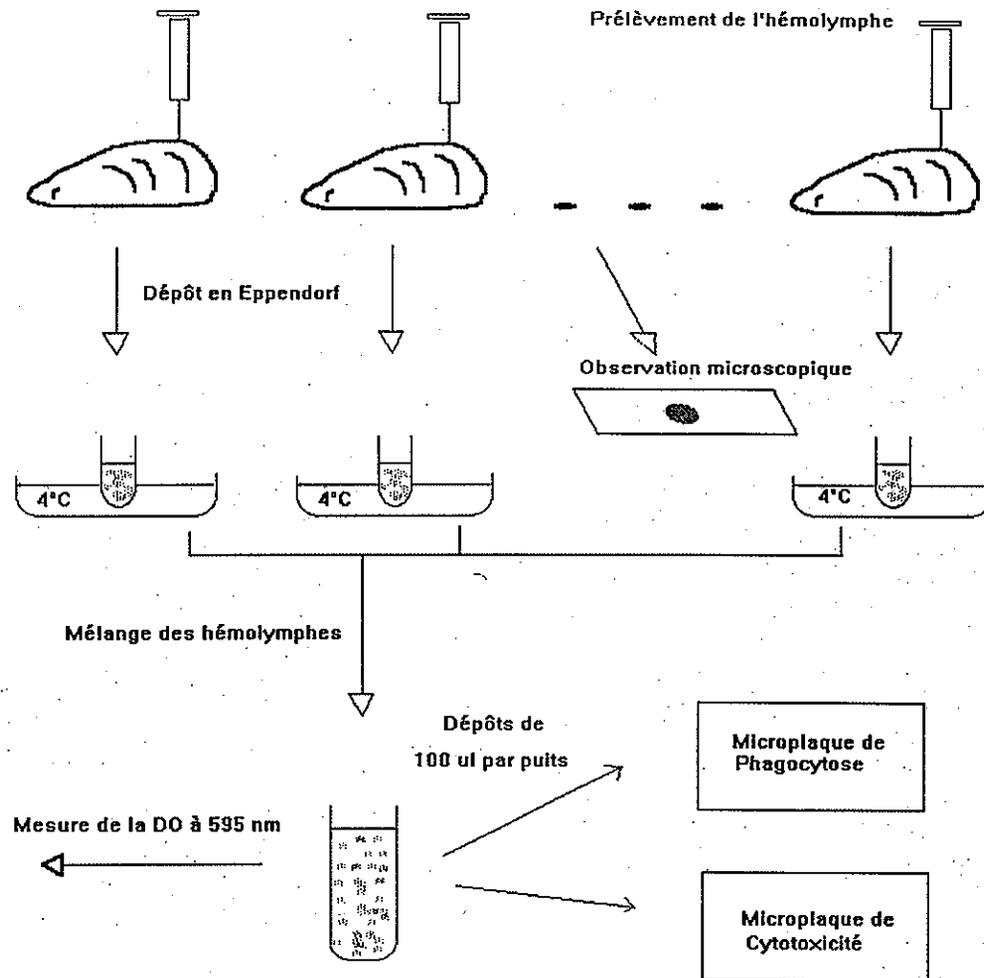
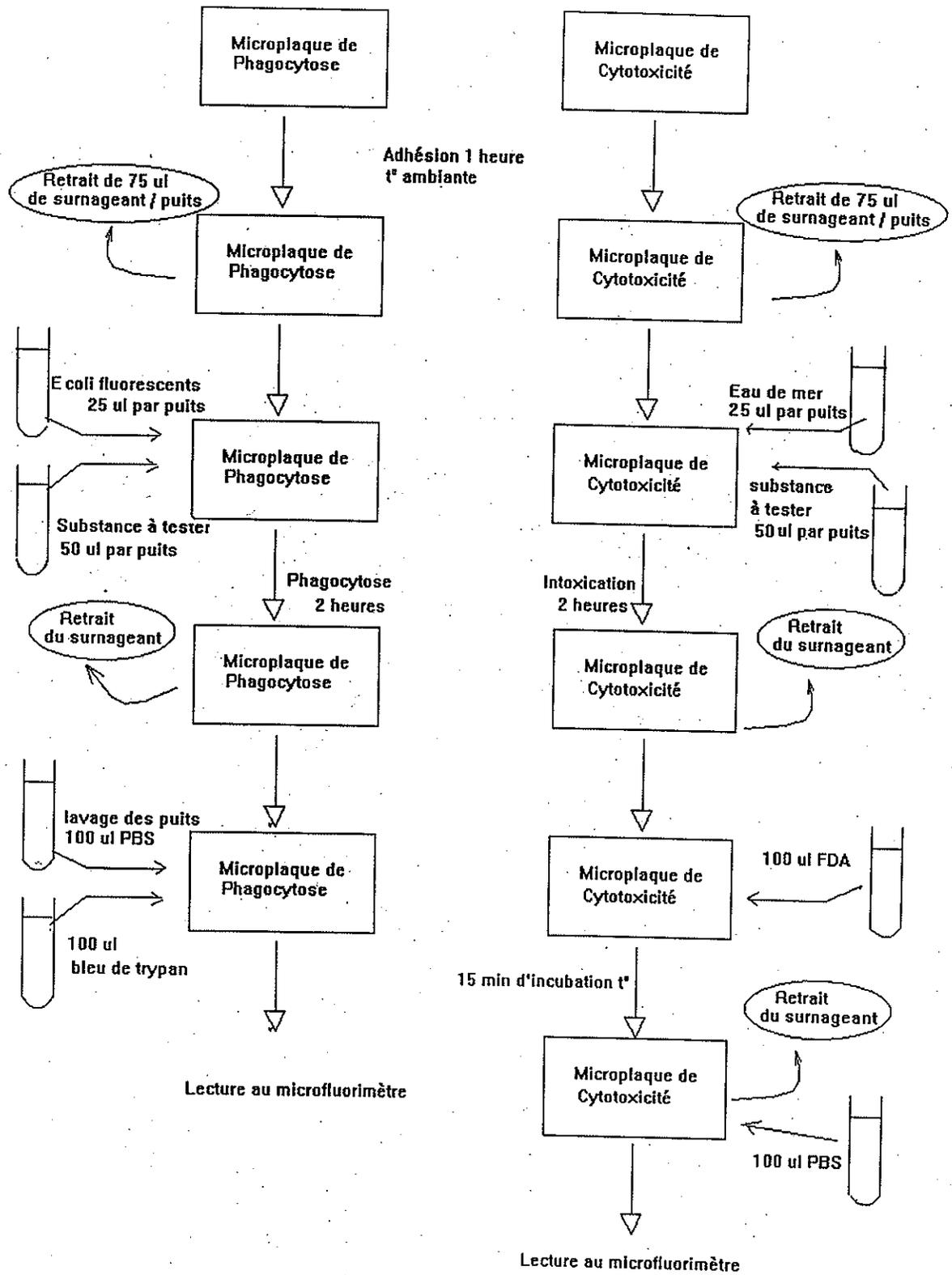


Figure 1 Mode opératoire des tests de phagocytose et de toxicité



- a) Déposer 100 μL d'hémolymphe dans chaque puits d'une microplaque noire, et recouvrir cette dernière de son couvercle. La microplaque est divisée en deux parties : une partie des puits est réservée au test de phagocytose (puits P), et l'autre partie est destinée au test de cytotoxicité (puits C). Les deux tests peuvent également être réalisés en même temps sur deux microplaques.
- b) Laisser adhérer les hémocytes pendant une heure à température ambiante ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- c) Retirer délicatement 75 μL de surnageant avec la micropipette (en inclinant la plaque et en plaçant la pointe de la micropipette dans un angle du puits).
- d) Déposer dans chaque puits P 25 μL de solution de bactéries et 50 μL de solution à tester (ou 50 μL d'eau de mer pour les témoins). Recouvrir la microplaque de son couvercle opaque. Déposer dans chaque puits C 25 μL d'eau de mer et 50 μL de solution à tester (ou 50 μL d'eau de mer pour les témoins).
- e) Incuber deux heures à température ambiante et à l'obscurité.
- f) Retirer les surnageants. ATTENTION! LES PUIITS NE DOIVENT JAMAIS ÊTRE SECS PLUS D'UNE MINUTE (entre les étapes de retrait et d'ajout), PARCE QUE LES HÉMOCYTES RISQUERAIENT D'ÊTRE ENDOMMAGÉS. Par conséquent les étapes f à k doivent être planifiées minutieusement.
- g) Rincer délicatement les puits P et C (pour la phagocytose et la cytotoxicité) en ajoutant 100 μL de PBS et en les retirant immédiatement.
- h) Ajouter 100 μL de FDA dans chaque puits C et laisser en contact pendant 15 min (suite du test de cytotoxicité à l'étape K).
- i) Pendant ce temps, sous la hotte, ajouter dans chaque puits P 100 μL de bleu de trypan (BT) à 1 mg/mL de tampon citrate de 1000 mosm et à pH de 4,4.
- j) Lire les résultats immédiatement au fluorimètre (Ex à 492 nm, Em à 538 nm).
- k) Immédiatement à la fin des 15 min, le FDA est retiré des puits C, 100 μL de PBS sont ajoutés dans chaque puits, et la microplaque est lue au fluorimètre (Ex à 492 nm, Em à 538 nm).

4 Résultats et discussion

4.1 ESSAIS PRÉLIMINAIRES

4.1.1 Dénombrement des hémocytes

La corrélation établie entre le nombre d'hémocytes présents dans une hémolymphe et sa DO_{595} , est illustrée à la figure 2. Elle a été calculée à partir des hémolymphe de 20 moules, et le coefficient de détermination r^2 est égal à 0,91. La corrélation permettra ainsi, dans les essais ultérieurs, de ne lire que la DO_{595} d'une hémolymphe pour pouvoir estimer sa concentration cellulaire, ce qui représente un gain de temps appréciable.

La figure 3 montre des hémocytes de *Mytilus edulis* observés au microscope (image grossie 400 fois) après 15 min d'adhésion sur lame de verre. Deux types cellulaires sont présents dans l'hémolymphe de *Mytilus edulis* : des hyalinocytes et des granulocytes (Renwranz, 19??). Ils représentent tous deux une activité phagocytaire, mais cette dernière est prépondérante chez les granulocytes (Foley et Cheng, 1975).

Les dénombrements et mesures de DO_{595} effectués portent sur toutes les cellules de l'hémolymphe.

La densité cellulaire de l'hémolymphe d'un individu pourra ainsi être utilisée en tant qu'indicateur à part entière de son état physiologique, dans le cas d'études sur le terrain ou en laboratoire. En effet, dans un essai d'intoxication réalisé *in vivo* sur *Crassostrea virginica*, Cheng (1988) a montré que le cadmium stimulait l'hématopoïèse sans modifier l'activité phagocytaire.

Aucun ajustement de la concentration d'hémocytes n'est effectué avant le dépôt de l'hémolymphe dans les puits, parce que la centrifugation qu'il nécessite provoque une forte agglomération des hémocytes. Le stress induit par la remise en suspension du culot de centrifugation rend préférable d'éviter cette étape (Robohm, 1984). De plus, les valeurs de fluorescence, élevées ou non, sont rapportées aux valeurs lues pour les témoins non intoxiqués réalisés avec la même hémolymphe.

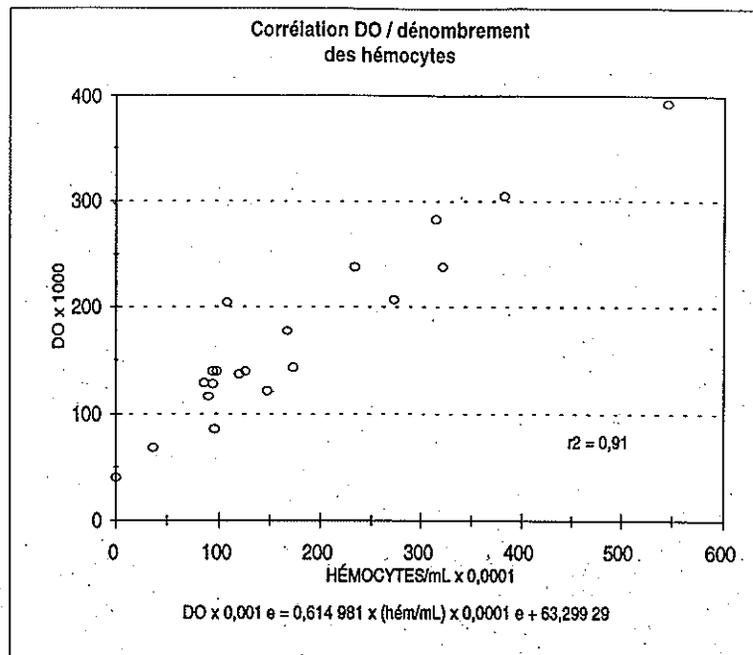


Figure 2 Évolution de la densité optique à 595 nm d'une hémolymphé en fonction du dénombrement au microscope des hémocytes qu'elle contient

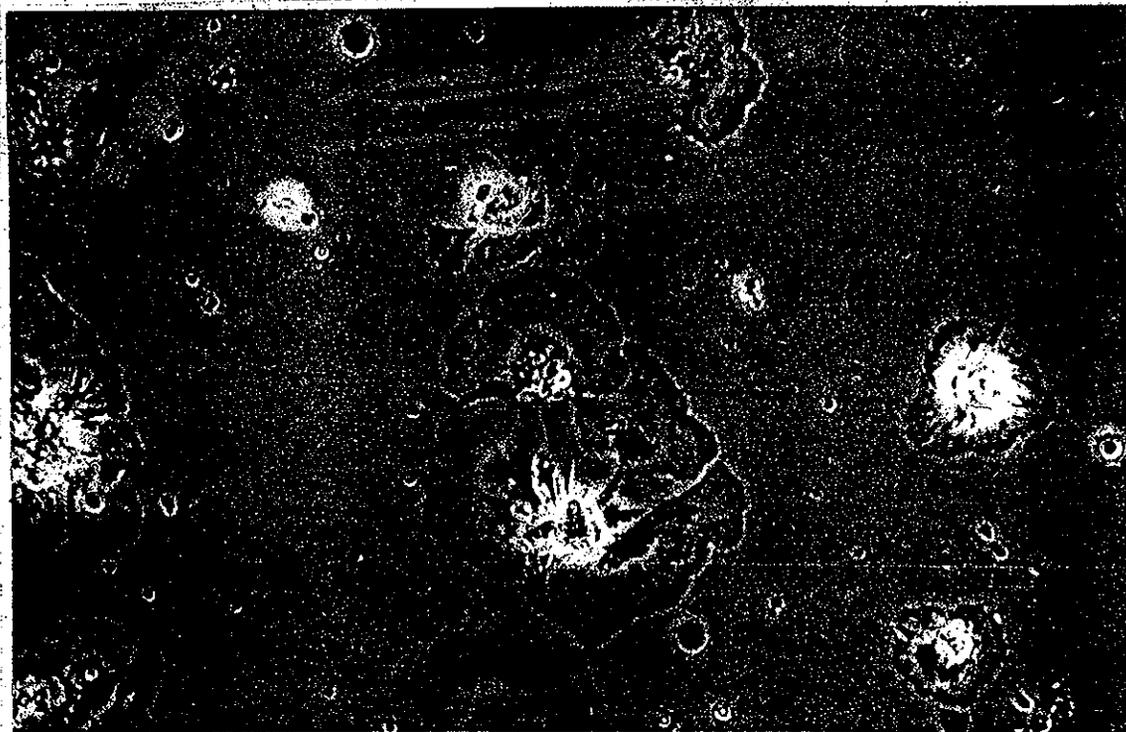


Figure 3 Hémocytes étalés (image grossie 400 fois)

4.1.2 Optimisation du temps d'adhésion

Le temps nécessaire à l'adhésion des hémocytes au fond des puits est déduit de la figure 4 où la relation entre le temps d'adhésion et le pourcentage d'hémocytes non adhérents est exprimée. Après 60 min d'adhésion, le pourcentage d'hémocytes non adhérents n'est pas significativement différent des valeurs obtenues pour des temps supérieurs. La durée d'adhésion optimale des hémocytes de *Mytilus edulis* sur microplaque noire est donc d'une heure.

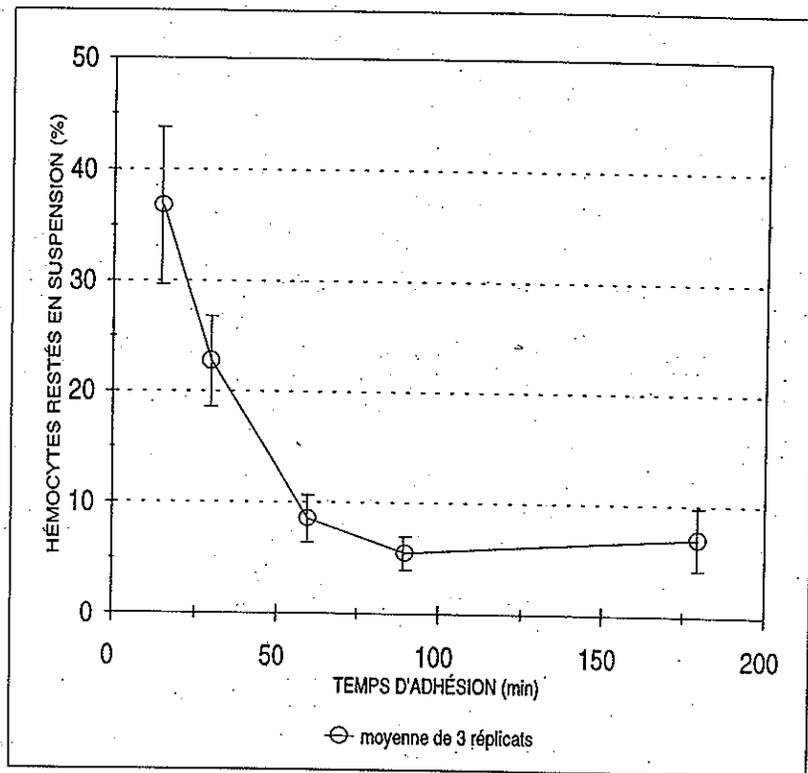


Figure 4 Évolution de la concentration d'hémocytes dans le surnageant après différents temps d'adhésion

4.1.3 Influence du sérum sur la phagocytose

Le sérum, liquide constituant l'hémolymphe, a été testé pour connaître son influence sur la phagocytose. La figure 5 représente les rapports entre les valeurs de fluorescence de la solution traitée et celles du témoin en fonction du taux de sérum dans le puits. Le nombre de bactéries

ingérées est d'autant plus élevé que le pourcentage de sérum présent pendant la phagocytose est important. Ce résultat confirme celui obtenu par Renwranz (19??) avec une baisse de la phagocytose de 63 % à 10 % lorsque la proportion de sérum varie de 50 % à 2,5 %. Il explique cet effet par la présence de lectines dans le sérum et sur les membranes des hémocytes. Les lectines sont des glycoprotéines secrétées par les hémocytes et sont responsables de l'agglutination des particules invasives. Elles favorisent les contacts entre les hémocytes et les particules et stimulent donc la phagocytose.

Lors d'une mesure de la phagocytose par chimiluminescence sur des hémocytes d'huîtres, Anderson *et al.* (1992) ont mis en évidence un effet protecteur du sérum contre une intoxication par le cadmium. Ils interprètent cet effet par la liaison du cadmium avec des ligands présents dans le sérum tels que les métallothionéines.

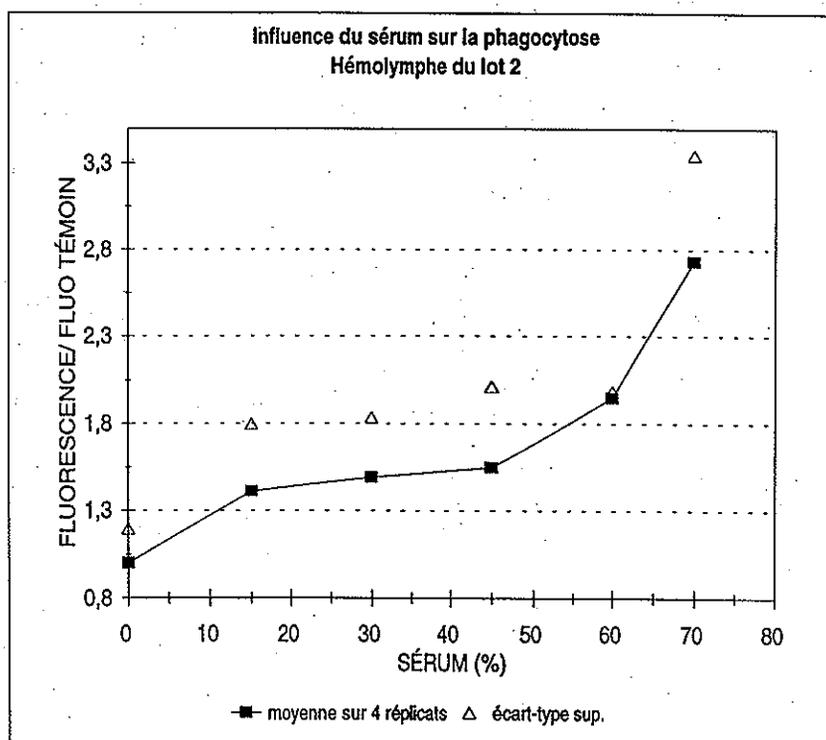


Figure 5 Évolution de la phagocytose en fonction du pourcentage de sérum

4.1.4 Test de viabilité cellulaire

Le test de mesure microfluorimétrique de la viabilité cellulaire par le FDA a été comparé au test de mesure microscopique de mortalité par le bleu de trypan. Les différentes concentrations de digitonine, toxique cellulaire, ont permis de créer une gamme de mortalités. La figure 6 illustre, en fonction de la concentration de digitonine, l'évolution de la fluorescence due au clivage du FDA dans les cellules vivantes et l'évolution du pourcentage de cellules mortes lors du dénombrement microscopique en présence de bleu de trypan. Une bonne corrélation entre la fluorescence lue par la technique du FDA et le pourcentage de mortalité mesuré par la technique du bleu de trypan a été établie (figure 7).

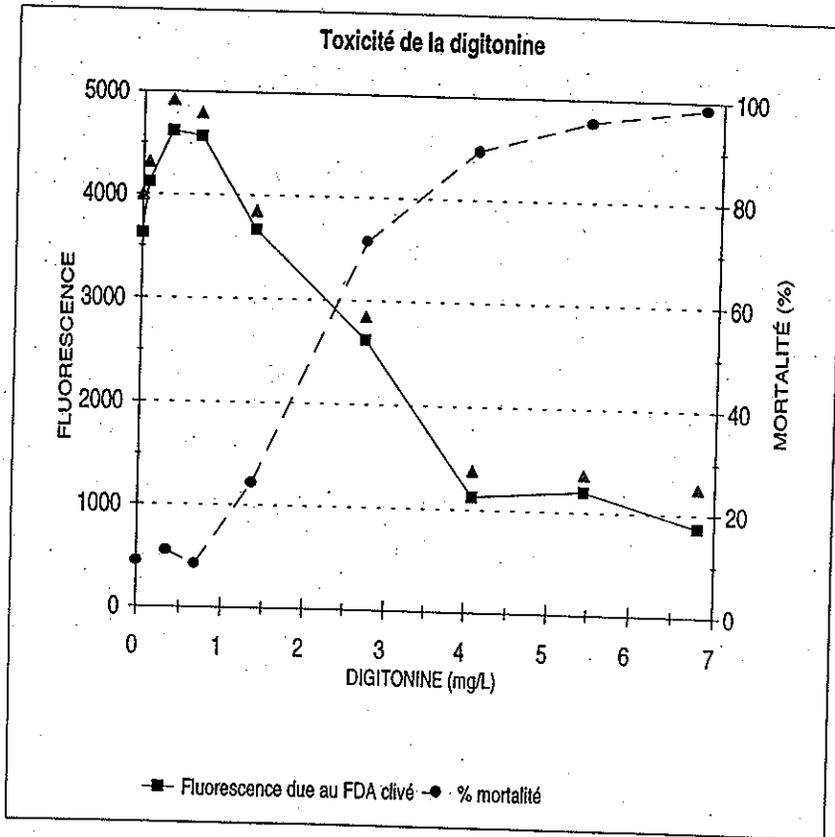


Figure 6 Suivi de la viabilité (FDA) et de la mortalité (BT) en fonction de la teneur en digitonine

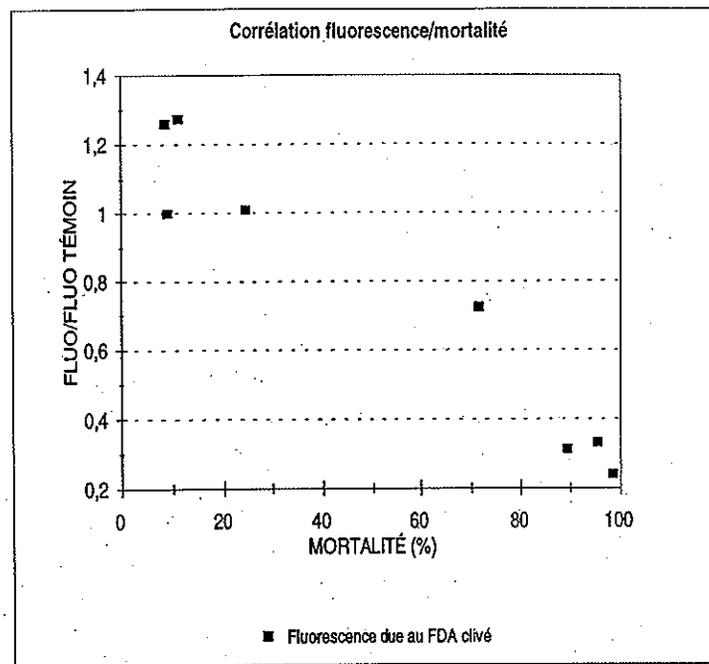


Figure 7 Évolution du rapport entre les fluorescences (FDA) des essais et des témoins en fonction de la mortalité

La mesure microfluorimétrique de la viabilité par le FDA est donc étroitement corrélée à la mesure de la mortalité par le bleu de trypan. Cette méthode, appliquée parallèlement au test de phagocytose permettra un gain de temps considérable et indiquera, à chaque test, le degré d'intoxication des hémocytes. L'effet cytotoxique d'une substance, à une concentration donnée, sera ainsi systématiquement différencié d'un effet immunotoxique.

Il sera important d'intégrer au test de viabilité un témoin positif, telle la digitonine, à 68 mg/L.

4.2 TESTS DE PHAGOCYTOSE ET DE CYTOTOXICITÉ

Un premier essai a été réalisé afin d'évaluer la variabilité des mesures de phagocytose. Un test témoin (sans substance ajoutée) a permis de mettre en évidence une variabilité de 14 %

(test sur 30 puits). Une variation de 14 % ou moins d'un essai par rapport au témoin ne sera donc pas significative.

Les résultats suivants, obtenus pour les tests d'immunotoxicité, ne permettent pas de tirer de conclusion puisqu'ils n'ont pas encore été répétés. Ils doivent donc être examinés ici avec circonspection.

Dans le contexte de la recherche d'un témoin positif d'inhibition de la phagocytose à intégrer systématiquement dans un test de phagocytose, la digitonine (à des concentrations de 17 µg/L à 680 µg/L, non cytotoxiques) et l'azide de sodium (250 mg/L à 2 g/L) ont été testés.

Les valeurs de fluorescence lues pour les essais en présence de digitonine ne sont pas significativement différentes du témoin.

Les essais en présence d'azide de sodium donnent un rapport (R) de fluorescence $f(\text{essai})/F(\text{témoin})$ de 0,4, qui ne varie pas en fonction de la concentration testée. L'azide de sodium provoque donc une inhibition partielle de la phagocytose (dans la gamme des concentrations testées).

5 Conclusion

Le mode opératoire des tests de phagocytose et de cytotoxicité a été établi, incluant le temps optimal d'une heure pour l'adhésion des hémocytes, la bonne corrélation entre la DO_{595} et le dénombrement des hémocytes, l'efficacité du test de viabilité par le FDA et la stimulation de la phagocytose par le sérum.

Il est essentiel de compléter cette étude par :

- la recherche d'un témoin positif d'inhibition et éventuellement d'un témoin positif de stimulation de la phagocytose;
- un test de métaux lourds comme le chrome, le cadmium, le fer, le mercure, le cobalt ou l'étain :
 - Cheng et Sullivan (1984) ont observé une stimulation de la phagocytose chez les hémocytes d'huîtres, *Crassostrea virginica*, lors de leur exposition pendant deux au Sn^{2+} (5 ppm);
 - Alvarez *et al.* (1991) ont comparé les effets d'un fongicide (la triforine) et de la cytochalasine B (témoin positif d'inhibition) sur des hémocytes d'huîtres *Crassostrea virginica*; la triforine conduit à une baisse conjointe de la viabilité des hémocytes et de leurs capacités de phagocytose, contrairement à la cytochalasine B qui inhibe la phagocytose sans affecter la viabilité cellulaire; la précipitation de certains métaux en présence d'eau de mer risque cependant de poser des problèmes d'interprétation;
- des tests de répétabilité.

Lorsque ce test sera appliqué à des moules prélevées dans l'environnement, trois paramètres pourront permettre d'évaluer leur état physiologique : le nombre d'hémocytes par millilitre d'hémolymphe prélevée, la viabilité de ces hémocytes et leur capacité de phagocytose.

Références

- Abdul-Salam, J.M. et E.H. Michelson (1980). «*Biomphalaria glabrata* amoebocytes: Assay of factors influencing *in vitro* phagocytosis», *J. Invert. Pathol.*, 36 : 52-59.
- Alvarez, M.R., F.E. Frield et C.M. Hudson (1991). «Effects of a commercial fungicide on the viability and phagocytosis of hemocytes of the American oyster, *Crassostrea virginica*», *J. Invert. Pathol.*, 57 : 395-401.
- Alvarez, M.R. F.E. Frield, J.S. Johnson et G.W. Hinsch (1989). «Factors affecting *in vitro* phagocytosis by oyster hemocytes», *J. Invert. Pathol.*, 54 : 233-241.
- Anderson, R.S. et R.H. Goods (1976). «Opsonic involvement in phagocytosis by mollusk hemocytes», *J. Invert. Pathol.*, 27 : 57-64.
- Anderson, R.S., L.M. Oliver et D. Jacobs (1992). «Immunotoxicity of cadmium for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): Effects on hemocytes chemiluminescence», *J. Shellfish Research*, 11 : 31-35.
- Bachere E. D. Chagot et H. Grizel (1988). «Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counter flow elutriation», *Developmental and Comparative Immunology*, 12 : 549-559.
- Bachere, E., D. Hervio et E. Mialhe (1991). «Luminol-dependant chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea virginica*», *Disease of Aquatic Organisms*, 11 : 173-180.
- Beckmann, N. M.P. Morse et C.M. Moore (1992). «Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*», *J. Invert. Pathol.*, 52 : 124-132.
- Cheng, T.G. (1988a). «*In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: total and differential count», *J. Invert. Pathol.*, 51 : 207-214.
- Cheng, T.G. (1988b). «*In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: phagocytosis and phagocytic indices», *J. Invert. Pathol.*, 51 : 215-220.
- Cheng, T.G. et J.T. Sullivan (1984). «Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes», *Marine Environ. Research*, 14 : 305-315.
- Fischer, S.W. et M. Tamplin (1988). «Environmental influence on activities and foreign-particle binding by hemocytes of American oysters, *Crassostrea virginica*», *Can. J. Fish Aquatic. Sci.*, 45.
- Foley, D.A. et T.C. Cheng (1975). «A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*», *J. Invert. Pathol.*, 25 : 189-197.

- Hansen, P.D., R. Bock et F. Brauer (1991). «Investigation of phagocytosis concerning the immunological defense mechanism of *Mytilus edulis* using a sublethal luminescent bacterial assay (*Photobacterium phosphoreum*)», *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C : 129-132.
- Hed, J. (1995). «Methods for distinguishing ingested from adhering particles», *Methods in enzymology*, 132 : 198-204.
- Renwranz, L. (19??). «Internal defense system of *Mytilus edulis*», dans George B. Stephano (éd.), *Neurobiology of Mytilus edulis*, Manchester University Press.
- Robohm, R.A. (1984). «*In vitro* phagocytosis by molluscan hemocytes: A survey and critique of methods», dans T.C. Cheng (éd.), *Comparative Pathology*, Plenum, New York, vol. 6, pp. 147-172.
- Roszell, L.E., R.S. Anderson et B.H.S. Lau (1993). «Inhibition of phagocytosis and superoxide production by pentachlorophenol in two leucocytes subpopulation from *Fundulus heteroclitus*», *Marine Environ. Research*, 38 : 195-206.
- Wan, C.P., C.S. Park et B.H.S. Lau (1995). «A rapid and simple microfluorimetric phagocytosis assay», *J. Immun. Meth.*, 162 : 1-7.