50376
1988
111

SECTION DE SCIENCES
LILLE

50376
1988
111

N° d'ordre : 247

THÈSE

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

par

Maurice M'BERI

DEGRANULATION DES COELOMOCYTES AU COURS DES REACTIONS IMMUNITAIRES D'UN INVERTEBRE MARIN : *Nereis diversicolor* (Annélide polychète) CARACTERISATION DES COELOMOCYTES D'APRES LEURS RECEPTEURS MEMBRANAIRES, IDENTIFICATION ET ROLE BIOLOGIQUE DES PRODUITS EXTRUDES.

Soutenue le 4 Juillet 1988 devant la Commission d'Examen

Président :	M.	M.	PORCHET
Rapporteurs :	M.	J.	BIERNE
	M.	P.	VALEMBOIS
Examinateurs :	M.	A.	DHAINAUT
	M.	J.L.	BAERT

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Endocrinologie des Invertébrés (Unité Associée au CNRS n° 148) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille-Flandres-Artois, dirigé par Monsieur le Professeur Maurice Porchet. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant dans son laboratoire et d'avoir accepté de présider ce Jury.

Que Monsieur le Professeur André Dhainaut, Directeur de cette Thèse, qui m'a initié à la recherche et a suivi mon travail avec bienveillance et pour l'avoir imprégné de son enthousiasme, de sa vivacité et de son dynamisme, trouve dans ce travail l'expression de mes sentiments de grande admiration, joints à ma profonde et sincère reconnaissance.

Que Monsieur le Professeur J. Bierne, de l'Université de Reims, pour avoir accepté de participer à mon Jury, soit assuré de ma profonde gratitude et de mon grand respect.

Que Monsieur le Professeur Pierre Valembois, de l'Université de Bordeaux, dont les travaux concernant l'immunité chez les Annélides m'ont souvent servi de référence, veuille accepter mes sincères remerciements pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce Jury.

Monsieur Jean-Luc Baert, chercheur au CNRS, a accepté de faire partie de ce Jury. Il m'avait déjà appris les techniques d'électrophorèse. Qu'il veuille trouver ici mes très sincères remerciements.

Je tiens à remercier de tout mon coeur Madame Porchet-Henneré, Directeur de recherche au CNRS, de m'avoir initié pendant mon année de DEA aux techniques de microscopie électronique et avec qui j'ai fait mes premières notes de recherches ; une fois de plus qu'elle soit assurée de ma profonde reconnaissance.

Il m'est tout particulièrement agréable de remercier Monsieur le Docteur Henri Debray, du Laboratoire de Chimie Biologique, d'avoir mis à ma disposition une batterie de lectines et de m'avoir fait bénéficier de son expérience dans l'étude des récepteurs membranaires.

Ma reconnaissance va également à Monsieur Bernard Lassalle, du Laboratoire de Morphogenèse avec qui j'ai effectué l'étude des cellules par analyse d'images au SAMBA 200.

Je remercie Monsieur Ali Assan, du Laboratoire de Microbiologie de m'avoir initié aux techniques de microbiologie.

Je remercie également Mademoiselle Maryse Masson pour le temps investi dans la lecture critique de ce mémoire au fur et à mesure de sa constitution.

Je tiens également à remercier Madame Françoise Bonet pour les coupes ultrafines et la dactylographie de ce mémoire, ainsi que Madame Adeline Auger et Monsieur Daniel Lazarecki pour les reproductions photographiques.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce mémoire, et particulièrement à Monsieur Philippe Bulet (Chercheur au CNRS), en me permettant de travailler dans une ambiance chaleureuse depuis mon arrivée dans le laboratoire.

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODES 4

I - MATERIEL BIOLOGIQUE 4
a. Elevage des animaux 4
b. Préparation des coelomocytes 4

II - METHODES BIOLOGIQUES 4

A. Techniques microscopiques 4
1. Microscopie photonique 4
1.1. Préparation des frottis 4
1.2. Coloration cytologique à l'hématoxyline de Harris-colorant de Shorr 5
1.3. Distinction des catégories cellulaires par la méthode d'analyse d'images au S.A.M.B.A. 200 5
1.4. Technique de fluorescence 6
2. Microscopie électronique 7
2.1. Observations en microscopie électronique à transmission 7
2.2. Observations en microscopie électronique à balayage 7
2.3. Visualisation des lectines en microscopie électronique 7

B. Technique d'agglutination par des lectines 8
1. Lectines utilisées 8
2. Préparation des cellules 10
3. Test d'agglutination 10
4. Séparation cellulaire par des agglutinations sélectives 10

C. Technique de dégranulation in vitro 11
1. Agents dégranulants 11
2. Dégranulation des cellules étalées 12
3. Dégranulation des cellules en suspension 12

D. Technique d'encapsulation in vitro 12
1. Préparation des cellules 12
2. Encapsulation 13

E. Immunisation des vers et prélèvement du liquide coelomique 13
1. Souches bactériennes 13
2. Milieu de culture liquide 13
3. Milieu de culture gélosé 13
4. Injection des bactéries 14
5. Prélèvement du liquide coelomique 14

F. Test d'inhibition de la croissance bactérienne 15
1. Préparation des échantillons à tester 15
2. Test de digestion enzymatique 15

III - METHODES BIOCHIMIQUES 16

A. Analyses électrophorétiques 16
1. Analyse en milieu acide 16
2. Electrophorèse monodimensionnelle en milieu non dénaturant 16
3. Electrophorèse monodimensionnelle en milieu dénaturant (SDS) 17
4. Electrophorèse bidimensionnelle 17
5. Transfert électrophorétique des protéines 17

B. Tests d'activité lysozymique 18
1. Test de turbidimétrie 18
2. Test lyso-plate 19
3. Test sur gel électrophorétique 19

C. Autre activité enzymatique 19
1. Dosage de la β-glucuronidase 19
2. Test sur feuille de nitrocellulose 20

D. Dosage des protéines 20

E. Chromatographie 20
1. Gel filtration 20
2. Echangeuse d'ions 21

CHAPITRE II - CYTOLOGIE DES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS DE COELOMOCYTES DE NEREIS DIVERSICOLOR 22

Introduction 22

1 - Etude en microscopie photonique 22
a) Les éléocytes 22
b) Les granulocytes 22

2 - Observations en microscopie électronique 25
a) Les éléocytes 25
b) Les granulocytes 25

3 - Etude par analyse d'images au SAMBA 200 27

DISCUSSION 31

CHAPITRE III - CARACTERISATION DES COELOMOCYTES PAR LES LECTINES APPLICATION A UNE METHODE DE SEPARATION DES GRANULOCYTES 33

Introduction 33

1 - Test d'agglutination 34

2 - Visualisation des sucres membranaires par l'utilisation de lectines fluorescentes 36
a) Marquage des coelomocytes 36
b) Intensité de la fluorescence en fonction de la concentration en lectine 36

3 - Visualisation des lectines en microscopie électronique 38
a) Récepteurs contenant des résidus mannose 38
b) Récepteurs contenant des résidus galactose 41
c) Récepteurs contenant des résidus fucose 41

4 - Séparations cellulaires par des agglutinations sélectives 41
a) Agglutination par des lectines spécifiques du galactose 43
b) Agglutination par des lectines spécifiques du fucose 43

DISCUSSION 45

CHAPITRE IV - CYTOPHYSIOLOGIE DES GRANULOCYTES
ETUDE DE LA DEGRANULATION 48

Introduction 48

A - Etude cytologique 49
1. Action de l'ionophore A23187 et du Calcium 49
2. Action du LPS (E. coli) 54
3. Action de la laminarine ou β 1-3 glucan 54
4. Action du Cadmium (Cd) sur les coelomocytes de Nereis diversicolor 55
5. Dégranulation in vivo après injection de bactéries 56
6. Effets des lectines sur le processus de dégranulation 56
a. Action des lectines seules 58
b. Action combinée des lectines puis des agents dégranulants 58

B - Etudes biochimiques des milieux de dégranulation 59
1. Analyses électrophorétiques des milieux de dégranulation 59
a. Analyse des protéines relarguées par action de l'ionophore A23187 et du calcium 60
b. Analyse protéique des contenus libérés sous l'action du LPS 60
c. Analyse du milieu dû à l'action du cadmium 60
d. Analyse des milieux d'encapsulation 60

2. Analyse électrophorétique des protéines solubles des coelomocytes 62
a. Analyse des protéines des éléocytes 62
b. Analyse des protéines solubles des granulocytes non dégranulés 62
c. Analyse des protéines solubles des cellules après dégranulation 62
3. Analyse du liquide coelomique 62
a. Vers normaux 62
b. Vers immunisés par injection de Cd et de LPS 64

DISCUSSION 64

CHAPITRE V - MISE EN EVIDENCE DE PROTEINES A ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE 68

Introduction 68

A - Activité bactériolytique de type lysozyme. 69
1. Tests utilisés 69
2. Recherche du lysozyme sans immunisation préalable 69
- Activité du lysozyme dans le liquide coelomique 69
- Activité du lysozyme dans les homogénats cellulaires 72
3. Recherche du lysozyme après immunisation 72
4. Recherche du lysozyme dans les milieux de dégranulation 72
a) Test lyso-plate 72
b) Test de turbidimétrie 72
5. Caractérisation du lysozyme sur gel d'électrophorèse 74

B - Recherche de la β-glucuronidase 75
1. Activité de la β-glucuronidase dans le liquide coelomique des vers normaux 75
2. Activité de la β-glucuronidase dans les fractions solubles des cellules 75
3. Activité β-glucuronidasique des animaux immunisés 77
4. Activité de la β-glucuronidase dans les milieux de dégranulation 77
5. Identification de l'enzyme après électrophorèse 77

C - Recherche d'activités de type bactériostatique 79
1. Test d'inhibition de la croissance bactérienne 79
2. Activité bactériostatique du liquide coelomique de vers immunisés 24 heures auparavant 79
3. Activité bactériostatique du liquide coelomique provenant des animaux intoxiqués avec du cadmium 80
4. Effet bactériostatique de milieux de dégranulation 80
5. Analyse des protéines antibactériennes par électrophorèse 83
6. Purification des protéines ayant des activités bactériostatiques 83
6.1. Chromatographie de gel filtration 83
6.2. Chromatographie d'échange d'ions 83

DISCUSSION 86

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES 89

BIBLIOGRAPHIE 96

Abréviations

D.M.S.O.	: Dimethyl sulfoxide
E.D.T.A.	: Ethylenediaminetetra acetic acid
LPS	: Lipopolysaccharide
pg	: picogramme
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
S.A.M.B.A.	: Système d'analyse microscopique à balayage automatique

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Chez les Annélides, les Oligochètes constituent la classe où la biologie des cellules coelomiques a été la mieux étudiée. Après les études réalisées en microscopie électronique sur la morphologie des coelomocytes (Valembois, 1971c ; Linthicum et al., 1977), la participation de ces cellules dans des réactions d'immunité cellulaire a été démontrée à la fois chez Lumbricus terrestris (Russel et Cooper, 1972 ; Stein et al., 1977 ; Chateaureynaud-Duprat et Lestage, 1980 ; Stein et Cooper, 1981 ; Cooper et Roch, 1984) et Eisenia fetida (Valembois et Roch, 1977 ; Cotuk et Dales, 1984 ; Valembois et al., 1985).

Parallèlement, il était démontré que le liquide coelomique présentait vis-à-vis des hématies de Vertébrés des propriétés agglutinantes (Cooper et al., 1974 ; Stein et al., 1982 ; Wojdani et al., 1982 ; Lassègues et al., 1984 ; Roch et al., 1984 ; Valembois et al., 1984) et hémolytiques (Valembois, 1982, 1984 ; Tuckova et al., 1986). Le polymorphisme allélique des hémolysines a été étudié chez Eisenia fetida par Roch (1979b).

La finalité de ces réactions immunitaires est vraisemblablement d'assurer une défense de l'organisme vis-à-vis des agressions bactériennes. Effectivement, il a été démontré que diverses bactéries provoquent l'apparition des facteurs antibactériens dans le liquide coelomique (Valembois et al., 1982 ; Valembois et al., 1986).

Chez les Polychètes, les connaissances relatives aux cellules coelomiques sont beaucoup plus restreintes. Chez diverses familles, un certain nombre d'études relatives à la cytophysiologie des coelomocytes sont maintenant anciennes ; Kermack (1955) chez Arenicola marina, Fretter (1953) chez Platynereis dumerilii, Dales (1964) chez Amphitrite johnstoni et Rattenbury (1966) chez Hermodice carunculata.

Du point de vue des processus immunitaires les données sont encore fragmentaires. Dans le domaine humoral, des substances hémagglutinantes et hémolytiques ont été décelées chez Glycera dibranchiata (Anderson, 1980), chez Neoamphitrite figulus (Dales, 1982), chez Nereis virens (Russel et al., 1983) et chez Spirographis spallanzanii (Parrinello et Rindone, 1981).

Dans le domaine des activités cellulaires, des réactions de phagocytose liée à la défense antibactérienne ont été observées chez Arenicola marina (Fitzgerald et Ratcliffe, 1982).

Chez les Néréidiens, alors que des investigations approfondies ont été réalisées sur la biologie des gamètes et leurs régulations endocrines (Dhainaut, 1967, 1968, 1970 ; Dhainaut et Porchet, 1977 ; Porchet, 1970 ; Porchet et Durchon, 1968), assez paradoxalement les données relatives aux cellules coelomiques sont restées beaucoup plus discrètes.

D'un point de vue morphologique, après des descriptions assez épisodiques (Dhainaut, 1966a, 1966b ; Baskin, 1974), ce n'est qu'en 1984 que Dhainaut présente une analyse détaillée des différentes catégories de coelomocytes, et propose une classification et une terminologie. Les coelomocytes sont ainsi subdivisés en éléocytes, en granulocytes (eux-mêmes répartis en plusieurs sous-populations : granulocytes I, II et III), et en quelques types cellulaires plus rares.

D'un point de vue physiologique, c'est d'abord le rôle trophique des coelomocytes vis-à-vis des gamètes qui a été démontré. Les éléocytes constituent la catégorie cellulaire impliquée dans ce processus. Baert et Slomianny (1987) démontrent que ceux-ci élaborent une vitellogénine qui est ensuite captée par les ovocytes et stockée sous forme de vitelline. Les éléocytes sont également impliqués dans la synthèse des lipides neutres (Fontaine et al., 1984a) et des phospholipides (Taki et al., 1988), substances qui participent à la formation des réserves lipidiques de l'ovocyte. Les éléocytes assurent également le nettoyage du milieu intérieur en capturant les sarcolytes libres dans le coelome (Dhainaut, 1966 ; Baskin, 1974).

Les granulocytes représentent la deuxième grande catégorie de cellules coelomiques. Très peu de données relatives à leurs fonctions étaient connues jusqu'à une date récente. Un de premiers aspects fonctionnels qui a pu être mis en évidence est leur intervention au cours des processus d'encapsulation. Sous la direction de Madame Porchet-Henneré, il a été montré que l'injection expérimentale de billes de latex est suivie d'une encapsulation rapide des implants qui sont enveloppés par plusieurs couches de granulocytes (Porchet-Henneré et al., 1987a). Une réaction comparable est obtenue lors de la pénétration de parasites (Porchet, et M'Béri, 1987). Les capsules formées sont constituées de plusieurs couches concentriques réparties en trois zones : une zone interne constituée par les granulocytes II qui au bout de 48 heures déversent par extrusion leur contenu granulaire à la surface de l'implant, puis une zone intermédiaire représentée par les granulocytes I qui donnent une structure rigide à la capsule grâce à leur microfilaments et leurs microtubules, enfin une zone externe dans laquelle on trouve des granulocytes III qui limiteraient le recrutement des cellules.

Ces résultats ont constitué la matière de notre DEA, ils ne seront pas repris dans l'exposé de ce mémoire.

Dans le présent travail, nous nous sommes tout d'abord attachés à établir les caractéristiques de chaque type de granulocytes : aspects de la cellule vivante, capacité d'étalement, structure après fixation en microscopie photonique et électronique. Ces paramètres ont ensuite été intégrés dans l'analyseur d'images SAMBA 200, ce qui a permis de confirmer que les granulocytes se subdivisaient en 3 sous-populations.

Les bases de cette classification toutefois étaient purement morphologiques. Nous nous sommes alors intéressés aux caractéristiques de revêtements membranaires. L'utilisation d'une grande variété de lectines a permis de subdiviser la population de granulocytes en fonction de la diversité de leurs récepteurs. Des réactions d'agglutination faisant intervenir des lectines spécifiques d'un type donné de récepteur ont permis l'isolement de la catégorie correspondante de granulocytes.

Il est bien connu que certains agents tel l'ionophore-Ca^{++}, les polysaccharides bactériens, sont capables de provoquer des processus de dégranulation, que ce soit chez les granulocytes de Vertébrés ou de divers Invertébrés. Nous avons examiné si chez les Néréidiens chaque catégorie de granulocytes présentait le même type de réponse. D'autre part, sachant que certains récepteurs membranaires étaient reconnus par les lectines, nous avons recherché si les ligands modifiaient l'action des facteurs dégranulants.

Nous nous sommes enfin intéressés au rôle physiologique des substances libérées par dégranulation. Celles-ci apparaissent notamment après action de toxines bactériennes (LPS), nous avons orienté nos recherches vers la détection des substances capables de jouer un rôle de défense vis-à-vis des bactéries. Il est apparu très vite que le liquide coelomique d'animaux sains ne présente pratiquement pas d'activité antibactérienne. Par contre après immunisation, il nous a été possible de mettre en évidence diverses molécules actives : lysozyme, β-glucuronidase et protéines bactériostatiques. Par chromatographie et analyse électrophorétique, une caractérisation partielle a pu être effectuée pour certaines de molécules.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

a. Elevage des animaux

Nous avons étudié une seule espèce de Néréidien : Nereis diversicolor O.F. Müller (espèce gonochorique, sans épitoquie).

Les Néréis sont récoltées à Petit-Fort-Philippe dans le Nord de la France et à Luc-sur-Mer dans le Calvados. Au laboratoire les vers sont isolés dans des bacs contenant de l'eau de mer sans être alimentés. La température est maintenue constante à 4°C. Les animaux subissant l'expérimentation sont replacés entre 12 et 14°C.

b. Préparation des coelomocytes

La méthode de prélèvement du liquide coelomique consiste à ponctionner le contenu coelomique à l'aide d'une pipette Pasteur effilée. Le liquide prélevé est ensuite utilisé directement ou déposé dans un tube contenant du tampon phosphate salé (PBS 50 mM, NaCl 33°/..) pH 7,2.

II - METHODES BIOLOGIQUES

A. Techniques microscopiques

1. Microscopie photonique

1.1. Préparation des frottis

Le liquide coelomique est déposé en une seule couche de cellules. Après 15 minutes d'incubation les cellules ainsi étalées sont observées soit à l'état frais à l'aide d'un dispositif à contraste interférentiel soit colorées.

1.2. Coloration cytologique à l'hématoxyline de Harris-colorant de Shorr

Cette technique mise au point par Papanicolaou et Stouckard (1963) permet une bonne distinction entre les catégories de coelomocytes de Nereis diversicolor. Elle colore en vert les structures granulaires, en rouge les microfilaments et en noir la chromatine. Elle fait intervenir de l'hématoxyline de Harris et du colorant de Shorr (Merck). Avant coloration les frottis cellulaires sont préalablement fixés dans l'éthanol à 70°.

1.3. Distinction des catégories cellulaires par la méthode d'analyse d'images au S.A.M.B.A. 200

L'analyse d'images essentiellement des cellules isolées a été faite sur des étalements de granulocytes colorés par la technique de Papanicolaou. C'est une technique de conception récente qui a l'avantage de prendre en compte de nombreux paramètres (Brugal, 1984). Les mesures ont été réalisées sur les cytoplasmes des cellules ainsi préparées.

- Analyse d'images

a) Principe de l'appareil

L'analyseur d'images utilisé, le SAMBA 200 (TITN-Thomson), est un Système d'Analyse Microscopique à Balayage Automatique (Brugal, 1985).

b) Acquisition des images

A basse résolution, l'analyse de la préparation est réalisée par champs élémentaires disposés en lacets. Chaque champ élémentaire est balayé par pas successifs de la platine ; à chaque pas, une colonne de points d'images, perpendiculaire à la translation de la préparation, est acquise par une barette de 256 photodiodes. Le niveau de gris de chaque point d'image est la moyenne pondérée de 4 photodiodes successives.

A haute résolution, le balayage d'un champ élémentaire est réalisé par déplacement de l'image à l'aide de 2 miroirs vibrants orthogonaux (scanners). Le détecteur est constitué par un photomultiplicateur.

L'autofocalisation précède l'acquisition de l'image de chaque champ élémentaire à basse et à haute résolution.

c) Traitement et analyse de l'image

L'analyse des images à basse résolution permet de localiser les objets intéressants contenus dans la préparation. Ces objets sont détectés par segmentation de l'image à l'aide d'un seuil bas et d'un seuil

haut de densité optique. Les objets dont la surface et la forme correspondent aux critères fixés par l'opérateur sont sélectionnés et leur adresse mémorisée en vue de leur analyse à haute résolution densitométrique, morphométrique et spectrale.

d) Paramètres retenus

- . la surface cellulaire,
- . la forme de la cellule,
- . le périmètre de la cellule,
- . la forme du noyau,
- . la densité optique intégrée (DOI) mesure la quantité d'ADN nucléaire,
- . la densité optique moyenne (DOM) mesure le rapport entre DOI et la surface du noyau. (DOM) exprime la concentration en ADN,
- . la dissymétrie de la densité optique,
- . l'écart type de la densité optique,
- . l'aplatissement de la densité optique.

1.4. Technique de fluorescence

Lectines fluorescentes utilisées

La Concanavalin A (ConA), la Phytohémagglutinine (PHA), la Soy bean Agglutinin (SBA), Wheat Germ Agglutinin (WGA) et l'Ulex europaeus Agglutinin 1 (UEA 1) ont été obtenues auprès d'IBF. Ces lectines étaient marquées à la rhodamine. Les lectines couplées à l'isothyocyanate de fluorescéine selon Loor (1973) ont été fournies par Henry Debray du Laboratoire de Chimie Biologique de Lille I : Ricinus communis Agglutinin (RCA 1), Peanut Agglutinin (PNA), Datura stramonium Agglutinin (DSA), Lotus tetragonolobus Agglutinin (LTA), Aleuria aurantia Agglutinin (AAA) et Pokeweed Mitogen (PWM). La spécificité ou l'affinité sera rappelée dans le paragraphe B.1.

Les lectines sont préparées à la concentration de 10 µg/ml dans le tampon phosphate salé (PBS 50 mM, pH 7,2, NaCl 0,45 M). La réaction est réalisée aussi bien sur les cellules préfixées dans du glutaraldéhyde à 1% que sur des cellules non fixées.

Visualisation des sites récepteurs par la fluorescence directe

Les manipulations ont été réalisées dans des tubes à hémolyse dans lesquels on mélange 100 µl de la solution de lectine à 100 µl de la

suspension de cellules (4.10^6 cellules/ml) pendant un temps d'incubation de 30 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées par centrifugation et déposées sur une lame dans une goutte de solution saline tamponnée. Les dépôts sont recouverts d'une lamelle scellée au vernis à ongles et observés alternativement en éclairage UV (excitation à 490 nm et ré-émission à 520 nm) (microscope LEITZ ORTHOMAT équipé d'un illuminateur vertical PLOEMOPAK et d'une lampe à vapeur de mercure OSRAM HBO 200) ou en lumière naturelle transmise. Les photographies sont prises sur film KODAK de 400 ASA.

2. Microscopie électronique

2.1. Observations en microscopie électronique à transmission

Le liquide coelomique est déposé dans un tube Eppendorf contenant du fixateur (2,5 % glutaraldéhyde dans le PBS). Après une centrifugation légère (200 g pendant 5 mn), les cellules sont reprises dans du fixateur pendant 1 heure à 4°C. Une post-fixation est réalisée pendant 1 heure à température ambiante dans 1 % de tétroxyde d'osmium après un lavage dans le tampon PBS pendant 1 heure à 4°C. Après déshydratation par l'éthanol et passage à l'oxyde de propylène les cellules sont incluses dans l'araldite. Les coupes semi-fines d'épaisseur 1 µm ont été obtenues à partir des blocs de résine sur un microtome Reichert et colorées à chaud par une solution de bleu Azur II (1 °/••) et de KOH à 1 %.

Les coupes ultrafines ont été faites sur un ultramicrotome Reichert OMU 3 à l'aide de couteaux en diamant et sont déposées sur des grilles en cuivre de maille 200 puis ensuite contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb selon Reynolds (1963). Ces coupes ont été observées sur JEOL sous une tension de 80 KV.

2.2. Observations en microscopie électronique à balayage

Une suspension de coelomocytes très diluée est répartie à raison d'une goutte par lamelle de verre préalablement dégraissée à l'alcool à 70°. Après un étalement des cellules pendant 15 minutes, les cellules sont fixées pendant 1 heure à 4°C dans du glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon PBS 50 mM, pH 7,2, NaCl 0,45 % puis une post-fixation dans 1% de tétroxyde d'osmium suivie de déshydratations d'abord par l'acétone puis par la méthode du point critique (45 mn). Les lamelles sont ensuite collées sur les porte-objets et métallisées à l'or-palladium dans un évaporateur.

2.3. Visualisation des lectines en microscopie électronique

Les lectines utilisées ont été les suivantes : ConA, SBA,

RCA I et LTA (Sigma). Ces lectines étaient couplées soit à la péroxydase soit avec le mannosyl-ferritine.

La méthode de Bernhard et Avraméas (1971) a été appliquée pour les lectines couplées à la péroxydase. Les cellules fixées avec une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans le tampon cacodylate de sodium à 0,1 M pH 7,2 pendant 30 minutes à 4°C sont lavées dans le même tampon pendant 1 heure à 4°C puis incubées dans 250 µg/ml de lectine dans le tampon cacodylate pendant 30 minutes à la température ambiante. Après un lavage dans le tampon, la péroxydase couplée à la lectine est révélée par la 3,3' diaminobenzidine selon la méthode de Karnovsky et Graham (1966). La post-fixation est faite dans le tétroxyde d'osmium à 1 % tamponné à pH 7,2. Les traitements témoins ont été effectués soit dans les milieux dépourvus de lectine soit en présence du sucre inhibiteur à 0,2 M.

La technique mise un point par Monsigny et al. (1976) a été utilisée pour l'emploi du mannosyl-ferritine : après fixation, les cellules sont incubées dans 250 µg/ml de la solution de ConA dans le tampon cacodylate de sodium pendant 30 mn à la température ambiante puis dans 250 µg/ml de mannosyl-ferritine pendant 30 mn. Les cellules sont ensuite post-fixées dans 1 % de tétroxyde d'osmium dans le même tampon et incluses dans l'araldite après déshydratation. Les coupes sont observées sans coloration additionnelle.

B. Technique d'agglutination par des lectines

1. **Les lectines utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau ci-après**

Lectines	Abréviation	Sucres spécifiques
Aleuria aurantia Agglutinin	AAA	L-fucose
Concanavalin A	ConA	D-Mannose
Lens culinaris Agglutinin	LCA	D-GalNac
Peanut Agglutinin	PNA	D-Galactose
Pokeweed Mitogen	P.W.M.	--
Ricinus communis Agglutinin I	RCA I	D-Galactose
Soy bean Agglutinin	SBA	D-Galactose
Ulex europaeus Agglutinin I	UEAl	L-Fucose
Wheat Germ Agglutinin	WGA	D-GLcNac
Datura stramonium Agglutinin	DSA	D-GlcNac
Phytohemagglutinin from Phaseolus vulgaris	PHA	--

2. Préparation des cellules

Les produits de ponction sont récoltés dans le tampon phosphate salé (PBS, 50 mM, pH 7,2, NaCl 33°/••) dans lequel on ajoute de l'E.D.T.A à 4 mM de façon à éviter l'agrégation cellulaire. Les produits génitaux sont éliminés par passage de la suspension cellulaire sur la toile de nylon de maille de 30 µm. Après une centrifugation à 200 g pendant 5 minutes, les cellules sont resuspendues dans le tampon contenant l'E.D.T.A. On effectue ainsi deux lavages puis les cellules sont fixées dans un mélange de 1 % de glutaraldéhyde et 0,5 % de paraformaldéhyde dans le tampon PBS pendant 1 heure à 4°C. Après un lavage à 4°C, les cellules sont incubées dans 0,1 % de glycocolle qui complexe les groupements aldéhydes formés lors de la fixation. La concentration cellulaire est ensuite ajustée à 4.10^6 cellules/ml en utilisant la cellule de Malassez.

3. Test d'agglutination

Les tests ont été effectués sur des plaques (NUNC) contenant 96 puits à fond rond. Les incubations ont été faites en ajoutant à 50 µl de suspension de cellules, 50 µl de la solution de lectine diluée selon des titres décroissants jusqu'au 1/2096 à partir d'une solution mère de 0,5 mg/ml. Après 1 heure d'incubation à 22°C, les observations ont été réalisées à la loupe binoculaire. Les réactions positives se traduisent par la formation d'un tapis cellulaire au fond du puits tandis que les réactions négatives apparaissent sous forme d'un bouton, selon sa taille on définit le degré d'agglutinabilité de la lectine.

4. Séparation cellulaire par des agglutinations sélectives

L'agglutination est la plus simple manifestation de l'interaction d'une lectine avec des cellules ; c'est une propriété quasi commune à l'ensemble des lectines. D'après Ochoa (1979), ce mécanisme est dû à l'affinité de la lectine pour son sucre inhibiteur, affinité qui dépend de plusieurs paramètres tels que : concentration en lectine, en cellules, temps d'incubation, pH...

Nous avons exploité cette propriété d'agglutination dans le but de confirmer les résultats obtenus précédemment et d'isoler certaines sous populations de granulocytes. La technique que nous avons utilisée est celle mise au point par Reisner et Sharon (1980) puis modifiée pour notre matériel (M'Béri et al., 1988b). Le schéma de séparation est présenté dans la figure 1.

- Obtention de granulocytes

Une suspension de coelomocytes débarrassée des produits génitaux, est déposée sur 40 ml de sérum de veau foetal ou de nouveau né à 40 % dans du PBS de pH 7,2. Dans un tube conique en verre, les éléocytes grâce à leur forte densité, sédimentent. La suspension enrichie en granulocytes est alors prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur. Les cellules sont ensuite lavées plusieurs fois dans le tampon PBS afin d'éliminer la totalité du sérum. La concentration en granulocytes est alors ajustée entre 10^6 et 10^7 cellules/ml.

- Agglutination

Les lectines utilisées ont été : PNA, SBA, AAA et UEAl à la concentration de 1 mg/ml dans le tampon PBS salé. L'agglutination est effectuée dans des tubes en polypropylène dans lesquels on additionne 0,5 ml de la suspension de cellules avec 0,5 ml de lectine. Après 5 minutes d'incubation à 22°C, la suspension cellulaire est déposée soigneusement à l'aide d'une pipette Pasteur sur du sérum à 40 % dans un tube conique en verre. Après 30 à 60 mn on obtient une sédimentation des agrégats qui sont ensuite prélevés à l'aide d'une pipette Pasteur, puis lavés dans le tampon PBS par centrifugation. La dissociation des agrégats est obtenue par incubation des cellules pendant 15 mn à 22°C dans 0,2 à 0,3 M de sucre inhibiteur selon la lectine. La viabilité cellulaire est vérifiée par incubation des cellules dissociées dans 0,1 % de bleu trypan dans le même tampon.

C. Technique de dégranulation in vitro

Une des propriétés des granulocytes est la dégranulation dans le milieu de leur contenu cellulaire lors d'une excitation ou d'une intoxication par un métal lourd ; cette propriété a été exploitée chez Nereis diversicolor lors d'une incubation des coelomocytes avec divers agents dégranulants et divers métaux lourds.

1. Agents dégranulants

Trois substances ont été utilisées :

- L'ionophore A 23187+Ca^{++} (Sigma) a la propriété de modifier la perméabilité membranaire. Les ions calcium contenus dans le milieu d'incubation peuvent alors pénétrer dans la cellule. L'ionophore est dissous dans du D.M.S.O. La solution obtenue constitue la solution stock. Pour notre étude,

diverses doses en ionophore sont obtenues par des dilutions avec une solution de NaCl à 0,45 M dans laquelle on ajoute du $CaCl_2$ à des molarités de 1 mM à 10 mM.

- Le lipopolysaccharide (E. coli 011.B4) (LPS), toxine bactérienne (Sigma), est dissous dans de l'eau de mer artificielle stérile à la concentration de 100 µg/ml.

- Le cadmium (Cd) métal lourd provoquant l'intoxication des vers isolés au laboratoire a été également utilisé à la concentration de 55 ppm, dissous dans de l'eau de mer artificielle.

2. Dégranulation des cellules étalées

Les étalements des cellules ont été faits sur des lames microscopiques et sur de petites lamelles pour la microscopie électronique à balayage. On dépose sur les cellules étalées 100 µl de l'agent dégranulant puis l'ensemble est placé à 22°C pendant 30 à 60 mn. L'observation a été faite sur le vivant au microscope interférentiel. Quelques observations ont été effectuées au microscope électronique à balayage sur des cellules fixées.

3. Dégranulation des cellules en suspension

Les coelomocytes (2.10^6 cellules/ml) sont incubés avec 2 ml de la solution dégranulante dans un tube à hémolyse pendant 30 mn à 22°C. Après centrifugation les cellules sont fixées pour la microscopie électronique ; le surnageant est prélevé et centrifugé à 1400 g pendant 10 minutes puis placé à -20°C pour les études biochimiques.

D. Technique d'encapsulation in vitro

1. Préparation des cellules

Les contenus coelomiques des vers préalablement placés dans l'eau de mer stérile sont prélevés en chambre stérile et déposés dans du tampon PBS stérile contenant 4 mM d'E.D.T.A. Les granulocytes sont repris sur du ficoll à 2 % dans le même tampon après sédimentation des éléocytes et des produits génitaux. Après lavage des cellules par centrifugation à 200 g pendant 5 minutes, les cellules sont remises en suspension dans le milieu 199 modifié.

2. Encapsulation

Les incubations des cellules avec des billes "biosilon" ont été réalisées dans le milieu 199 modifié contenant du TC 190.000 auquel on additionne les sels suivants : NaCl 450 mM ; $CaCl_2$ 11 mM ; KCl 10 mM ; $MgCl_2$ 53 mM et Na_2SO_4 28 mM, complété par l'addition de L-glutamine (0,63 mM final), glucose (5 g/l), Hépes pH 8 (20 mM final) et pénicilline (2000 UI/ml) (pH 7,6).

Réaction : Les mélanges des cellules et des billes "biosilon" sont effectués dans des boîtes (NUNC) de culture. A 1 ml de la suspension de cellules sont ajoutés 500 µl de suspension de billes. L'ensemble est placé à 15°C. Après 24 heures d'incubation, les surnageants sont repris après centrifugation et placés à -20°C. Les cellules sont, par contre, observées sur le vivant au microscope interférentiel.

E. Immunisation des vers et prélèvement du liquide coelomique

1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées proviennent de la collection de l'Institut Pasteur de Lille (aimablement fournies par le Pr CATTEAU, Directeur du laboratoire de microbiologie) et sont cultivées en milieu gélosé.

- bactéries gram+ : Bacillus megaterium et Micrococcus kristinae
- bactéries gram- : Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens, Bacillus cercus, Acinetobacter et Pseudomonas aeruginosa.

2. Milieu de culture liquide

Les bactéries ont été cultivées en aérobie à 37°C dans un milieu liquide : bouillon peptoné constitué de bio-Gelytone (5 g), extraits de viande de boeuf (3 g), eau bidistillée (1 l), pH 6,9. Les bactéries sont mises en culture pendant 24 heures sous agitation. La culture est arrêtée lorsque les bactéries sont en phase de croissance exponentielle dans 10 ml de milieu stérile.

3. Milieu de culture gélosé

Composition du milieu

Les tests identiques aux antibiogrammes ont été effectués sur

des cultures de bactéries sur milieu gélosé enrichi en éléments nutritifs dont la composition est la suivante :

Bacto agar (Difco)	7,5 g
Tryptone (Difco)	10 g
Extrait de levure (Difco)	5 g
PBS 0,066 M pH 7,4	1 l

Préparation du milieu

La préparation du milieu s'effectue en deux étapes.

Dans un premier temps, le tryptone et l'extrait de lévure sont dissous dans le tampon PBS 0,066 M pH 7,4. La solution est ensuite filtrée sur papier.

Dans un second temps on ajoute l'agar à la concentration de 7,5°/‥. Après dissolution de l'agar à chaud, la solution est stérilisée à l'autoclave puis répartie dans des flacons de 100 ml.

4. Injection des bactéries

Les bactéries ont été préalablement tuées de façon chimique en ajoutant dans des tubes de culture du formaldéhyde à 10 % en concentration finale pendant 30 mn à 4°C. Les bactéries ont ensuite été lavées par centrifugation dans du tampon phosphate salé (PBS 50 mM, pH 7,2, NaCl 0,45 M). La concentration bactérienne a été estimée à 2.10^7 bactéries/ml par comptage sur un microscope interférentiel ou à contraste de phase.

Les injections des bactéries ont été faites à raison de 100 µl de la suspension bactérienne par ver à l'aide de seringues stériles. Une telle injection correspondait à environ 2.10^5 bactéries. Les vers ont été placés à 18°C.

. Injection des billes de latex de 0,1 à 0,2 µm de diamètre (Sigma). Des injections identiques à celles des bactéries ont été effectuées à des vers qui ont été ensuite placés dans les mêmes conditions que les vers ayant reçu des bactéries.

5. Prélèvement du liquide coelomique

Le liquide coelomique des vers ayant reçu des injections de bactéries ou de billes de latex a été prélevé à l'aide de pipettes Pasteur dans la partie antérieure du corps vers le 8ème métamère. Le liquide coelomique est séparé des coelomocytes par centrifugation à 1400 g pendant 10 mn puis placé à

-20°C. Les coelomocytes sont traités pour les observations en microscopie électronique.

F. Test d'inhibition de la croissance bactérienne

Le milieu gélosé stérile remis en solution au bain-marie est coulé dans des boîtes de Pétri à raison de 20 ml par boîte. Après solidification de la gélose, les boîtes sont placées dans l'étuve à 50°C pendant 30 minutes afin d'éliminer le surplus d'eau des milieux. Les boîtes sont ensuite inondées avec 5 ml de la suspension bactérienne à un titre bien défini (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) et ce, pendant 30 minutes à 37°C. Ceci permet aux bactéries de se déposer sur la gélose. La partie liquide est ensuite éliminée par égouttage puis les boîtes sont replacées dans l'étuve à 37°C pendant 30 minutes, ce qui permet la reprise de la croissance bactérienne et la formation d'un tapis cellulaire à la surface de la gélose. Sur le tapis cellulaire formé on dépose des disques pour antibiogramme imprégnés de 20 µl de l'échantillon à tester. Les boîtes sont replacées à 37°C pendant 18 heures. L'inhibition de la croissance des bactéries se traduit par la formation d'une zone claire autour du disque. Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la concentration et à l'activité de la substance antibactérienne qui diffuse dans la gélose.

1. Préparation des échantillons à tester

Les liquides coelomiques provenant des animaux ayant reçu des injections de souches E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, Bacillus megaterium, sont séparés des coelomocytes par centrifugation puis testés sur des cultures d'E. coli et de Micrococcus kristinae.

2. Test de digestion enzymatique

Les liquides coelomiques provenant des vers immunisés sont traités avec des enzymes protéolytiques telles que la pepsine, la trypsine ou la pronase à 5 µg/ml dans le tampon PBS 0,066 M à pH 2 pour la peptine et à pH 7,4 pour la trypsine et la pronase pendant 4 heures à 37°C. D'autres aliquots des mêmes échantillons sont traités à la chaleur à 56°C et à 100°C pendant 5 à 15 mn.

III - METHODES BIOCHIMIQUES

Dans le but de caractériser biochimiquement les substances relarguées par les cellules au cours de la dégranulation, nous avons utilisé plusieurs méthodes biochimiques.

A. Analyses électrophorétiques

La technique de PAGE permet de déterminer rapidement les caractéristiques moléculaires des protéines contenues dans un mélange (Cohens et Porter, 1964 ; Reisfeld et al., 1965). En utilisant des gels contenant un détergent anionique comme le SDS, il est possible de connaître le poids moléculaire des protéines en migration par comparaison avec la migration des protéines de poids moléculaires connus.

1. Analyse en milieu acide

Des volumes de 100 µl de solutions protéiques sont déposés sur un gel de polyacrylamide à 12 %, d'épaisseur 0,75 mm. Un tampon acide (β-alanineacide acétique, pH 4) assure le contact entre les deux électrodes. La migration est effectuée en inversant les électrodes sous un courant constant de 6 mA pendant 16 heures. Avant électrophorèse les échantillons sont repris dans un tampon constitué de 20 % de sucrose additionné de 5 % de fuchsine basique pour suivre le front de migration. A la fin de la migration le gel est coloré au bleu de Coomassie R 250 à 0,1 % dans l'isopropanol 25 %, acide acétique 10 %, puis décoloré par l'acide acétique 10 %.

2. Electrophorèse monodimensionnelle en milieu non dénaturant

L'électrophorèse en milieu non dénaturant est réalisée dans un gradient 5-30 % d'acrylamide selon la méthode de Slater (1969), en utilisant le système tampon de Davis (1964). Un mélange de protéines témoins de poids moléculaires connus est analysé conjointement à l'échantillon : thyroglobuline (559 kDa), ferritine (440 kDa), catalase (232 kDa), albumine dimère (134 kDa), albumine (67 kDa) et ovalbumine (45 kDa).

Après 48 heures de migration (130-150 V), le gel est soit coloré par le bleu de Coomassie soit transféré sur feuille de nitrocellulose qui est soumise ensuite au test d'activité de la β-glucuronidase.

3. Electrophorèse monodimensionnelle en milieu dénaturant (SDS)

L'électrophorèse en milieu dénaturant a été réalisée dans un gradient 5-25 % d'acrylamide contenant 0,1 % de dodécyl sulfate de sodium (SDS), selon la méthode de Laemmli (1970). Avant analyse, les protéines sont traitées pendant 3 minutes au bain-marie bouillant dans le tampon d'échantillons Tris/HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 0,2 %, saccharose 10 %, β-mercaptoéthanol 5 %. Un mélange de protéines témoins de poids moléculaires connus est analysé conjointement avec l'échantillon : phosphorylase B (94 kDa), trypsine inhibitrice (20 kDa) et α lactalbumine (14,4 kDa). Après 16 à 20 heures de migration (5 mA), le gel est coloré et décoloré comme dans le paragraphe A.1.

4. Electrophorèse bidimensionnelle

Dans une première dimension, les protéines ont été séparées dans un gel d'acrylamide à 12 % en milieu non dénaturant. Après 16 heures de migration, les bandes de gel ont été excisées et équilibrées dans le tampon Tris/HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2,3 %, β-mercaptoéthanol 2 %, glycérol 10 %, pendant 45 mn. La bande de gel est ensuite déposée sur un gel de polyacrylamide-SDS (gradient 5-25 %) et maintenu par l'agarose à 1 % dans le tampon d'équilibration. L'analyse électrophorétique est réalisée comme précédemment.

5. Transfert électrophorétique des protéines

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide 5-30 % sans SDS, les bandes de gel à répliquer ont été équilibrées pendant 30 mn dans le tampon de transfert constitué par une solution de 20 mM Tris, 150 mM glycine à pH 8,3. Le gel est ensuite placé sur une feuille de papier Whatman, préalablement trempée dans le tampon de transfert. Au-dessus du gel on dépose la feuille de nitrocellulose de porosité 0,45 µm, découpée aux dimensions du gel en évitant l'intrusion de bulles d'air, puis une deuxième feuille de papier Whatman également immergée au préalable dans le même tampon. Le tout est placé sur un support en plastique. L'ensemble est mis en place dans la cuve de transfert. Le transfert est opéré à 50 mA pendant 4 heures. Les protéines transférées sont soit colorées dans le noir Soudan à 0,1 %, dans le méthanol 45 %, acide acétique 10 %, soit utilisées pour la détection de la zone d'activité de la β-glucuronidase.

B. Tests d'activité lysozymique

Deux tests ont été utilisés pour mettre en évidence une activité de type lysozyme dans les milieux de dégranulation, d'encapsulation, du liquide coelomique et les homogénats cellulaires :

- Le test de turbidimétrie
- Le test lyso-plate

Le substrat utilisé pour les deux tests est constitué des parois de Micrococcus lyzodeikticus qui sont très riches en polymères de type N acétylglucosamine et N-acétyl acide muramique qui sont les cibles de choix du lysozyme qui intervient en coupant la liaison entre les deux molécules (figure 2).

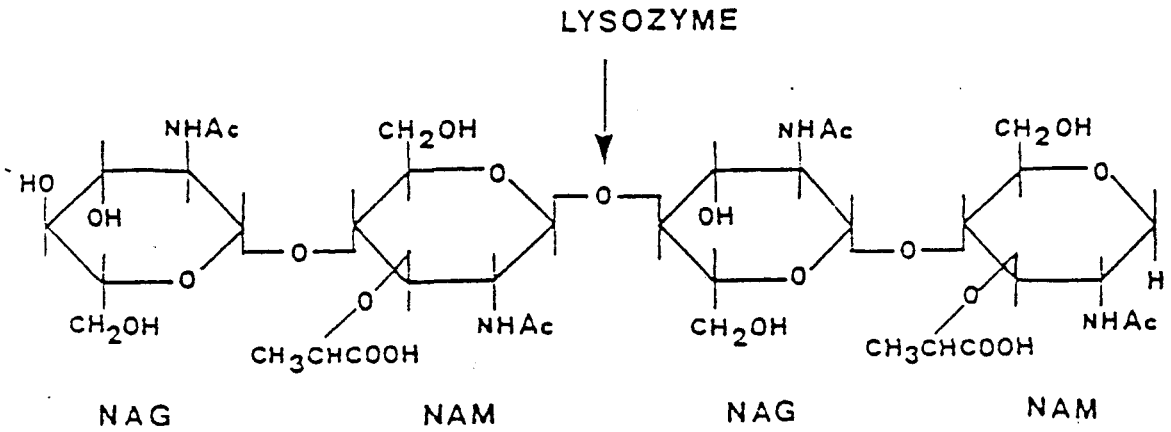


Figure 2 : Mode d'action du lysozyme sur la liaison (β 1-4).

1. Test de turbidimétrie

Ce test, réalisé selon la technique décrite par Hulmark et al. (1980), est basé sur la sensibilité de la paroi de M. lysodeikticus (Sigma) à l'action lytique du lysozyme. La poudre de bactéries est dissoute dans 0,066 M de tampon phosphate à pH 6,2, puis la densité de la suspension est ajustée à 0,2 à la longueur d'onde de 570 nm. A 950 µl de la suspension bactérienne on ajoute 50 µl d'échantillon à tester. Les incubations sont faites dans un bain-marie à 37°C pendant 1 heure. La réaction est arrêtée en plaçant les tubes dans de la glace. La concentration en lysozyme est estimée par la lecture de la densité optique à 570 nm dans un spectrophotomètre Beckman. La concentration de lysozyme de l'échantillon à doser a pu être quantifiée en comparant le résultat obtenu avec une courbe de référence établie à partir de solutions de concentrations connues en lysozyme de blanc d'oeuf de poule (Sigma).

2. Test lyso-plate

Ce test mis au point par Osserman et Lawlor (1966) modifié par Selsted (1980) a permis d'obtenir des résultats reproductibles grâce à sa très forte sensibilité (6 pg/ml). Une solution de parois bactériennes à la concentration de 0,5 mg/ml dans le tampon PBS 0,066 M, pH 6,2 est ajoutée à un gel d'agarose à 1 % (indubiose A 37, IBF). Dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, on coule 20 ml de gélose d'épaisseur finale égale à 4 mm. Après solidification du gel on dépose sur les gels des disques pour antibiogramme neutre de diamètre 6 mm (Bioservice), imbibés de 20 µl d'échantillon à tester. Les boîtes sont ensuite placées à 37°C. Après 18 heures d'incubation, les zones d'inhibition apparaissant sous forme de plages claires ont été mesurées. Une gamme étalon a été réalisée avec le lysozyme du blanc d'oeuf de poule. La concentration en lysozyme a été exprimée en fonction des diamètres des plages de lyse.

3. Test sur gel électrophorétique

Dans le but de déterminer approximativement le poids moléculaire du lysozyme, un test d'activité antibactérienne a été effectué sur un gel après électrophorèse en milieu acide. Dans ce cas le gel est lavé dans le tampon PBS 0,066 M, pH 6,2 pendant 30 minutes de façon à ramener sa surface à un pH compatible avec l'activité de l'enzyme. Le gel est ensuite recouvert d'une gélose à 1 % (indubiose A 37, IBF) contenant la poudre de Micrococcus lysodeikticus à la concentration finale de 0,5 mg/ml. Après 2 heures d'incubation à 37°C, l'apparition des zones d'inhibition sous forme de plages claires indique la localisation du lysozyme.

C. Autre activité enzymatique

1. Dosage de la β-glucuronidase

Cette enzyme a été dosée par la technique de Talalay et al. (1946). Le substrat utilisé a été le p-nitrophényl-β-D glucuronide (Serva) à la concentration de 5 mM dans le tampon acétate de sodium à 0,2 M, pH 4,5. Les échantillons de dégranulation, d'encapsulation, de liquide coelomique et des homogénats cellulaires ont été utilisés. Des préincubations sont réalisées par addition de 100 µl de l'échantillon à 200 µl de tampon acétate de sodium pendant 5 mn au bain-marie à 37°C, puis on ajoute 100 µl de substrat et l'ensemble est incubé pendant 2 à 4 heures. L'hydrolyse de ce substrat incolore libère de l'acide glucuronique et du paranitrophénol (PNP) qui vire au jaune

par addition de 600 µl de Na_2CO_3 à 0,5 M. La lecture de la densité optique a été faite à 400 nm et le moment de l'apparition de la coloration a été noté. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité (UA %) en calculant le rapport :

$$UA\ \% = \frac{DO\ (400\ nm)}{temps} \times 100$$

La concentration en β-glucuronidase a été déterminée grâce à une gamme étalon réalisée avec le paranitrophénol commercial (Prolabo).

2. Test sur feuille de nitrocellulose

Afin de déterminer la zone de migration de la β-glucuronidase sur gel de polyacrylamide 5-30 % sans SDS, un test d'activité de cette enzyme a été effectué sur les protéines transférées sur une feuille de nitrocellulose. La méthodologie de détection de l'activité de l'enzyme est la suivante : la feuille est transférée sur la gélatine (indubiose A 37) à 5 % dans le tampon acétate de sodium de pH 4,5 contenant le substrat de l'enzyme : p-nitrophényl β-D glucuronide (à 5 mM) préparé antérieurement sur une lame de verre de telle sorte que la feuille de nitrocellulose soit déposée sur la partie plane de la gélose. L'ensemble est placé pendant 1 heure à 37°C dans l'étuve. La révélation de la zone d'activité est détectée en quelques minutes après dépôt d'une solution de Na_2CO_3 à 0,5 mM sur le gel. La zone réactive est colorée en jaune ; la coloration est due à la présence de molécules de phénol résultant de l'hydrolyse du substrat par l'enzyme.

D. Dosage des protéines

La concentration en protéines des différents échantillons a été déterminée par la techique de Bradford (1976) (BIO-RAD), la lecture de la D.O. a été réalisée en spectrophotométrie à 595 nm. La gamme étalon a été établie à partir d'une solution de sérum albumine bovine (Sigma).

E. Chromatographie

1. Gel filtration

La filtration sur tamis moléculaire permet de séparer les constituants protéiques d'un mélange selon leur poids moléculaire. Dans notre tra-

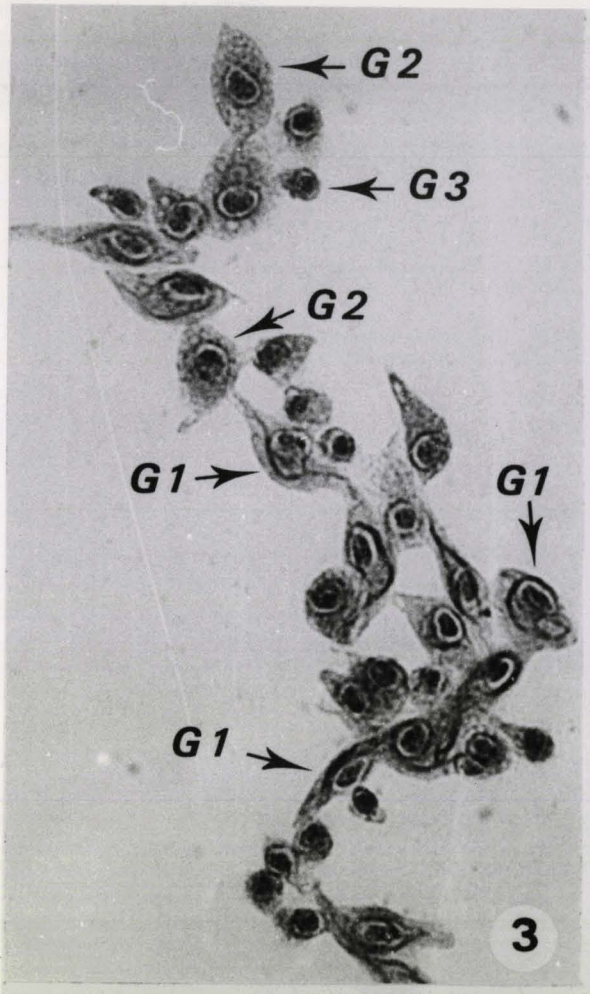
vail, le liquide coelomique a été analysé par gel filtration sur des gels de type Biogel P 100 et P 20 (Pharmcia) qui ont un pouvoir de séparation respectif de 100-6,5 kDa et de 30 à 3 kDa. Le gel, préalablement gonflé dans le tampon acétate d'ammonium (50 mM, pH 6,8), puis dégazé, est coulé dans une colonne de 110 x1,1 cm par sédimentation. La colonne est stabilisée après lavage par deux volumes du même tampon à un débit de 5 ml/heure. L'étalonnage de la colonne est réalisé en faisant migrer des protéines témoins de poids moléculaires connus (ferritine 470 kDa ; SAB 68 kDa ; ovalbumine 44 kDa ; α-chymotrypsinogène 24,5 kDa ; Cytochrome C 13 kDa ; trypsine ·inhibitrice 20 kDa). Les fractions de 2,5 ml sont recueillies par un collecteur qui est relié à une cellule qui enregistre (filtre à 280 nm) de façon continue au cours de la séparation. Un échantillon de 2 ml de liquide coelomique pur est appliqué sur la colonne. Les éluats correspondant à chaque pic sont ensuite mélangés et concentrés en vue de la détection de l'activité antibactérienne sur milieu gélosé.

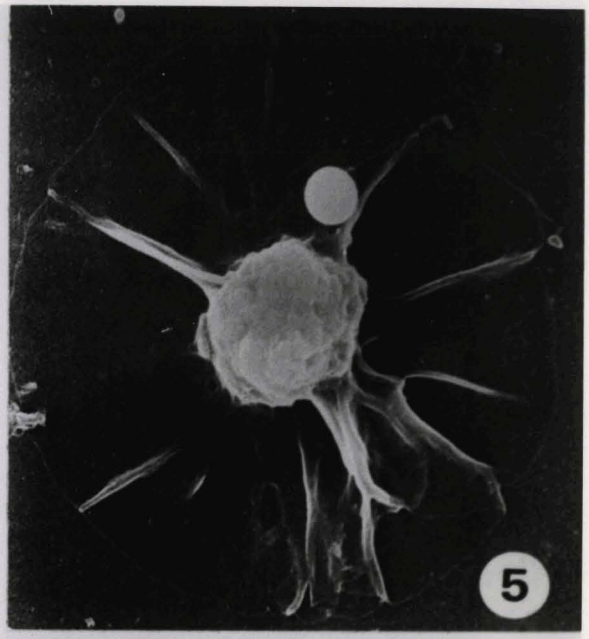
2. Echangeuse d'ions

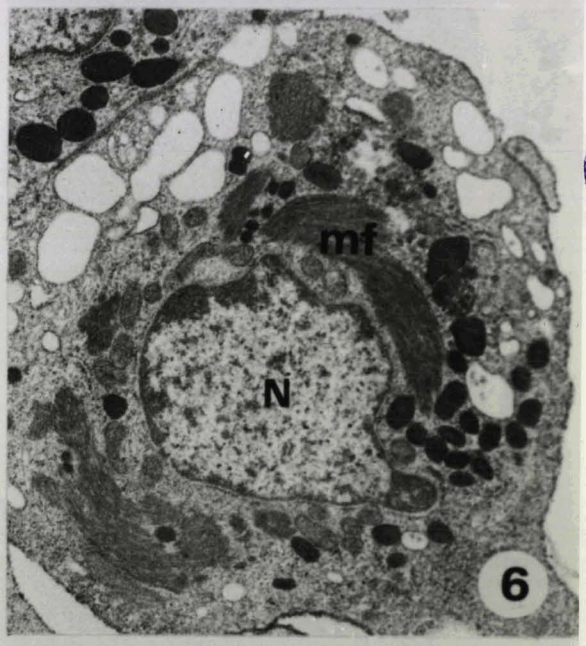
Le matériel protéique composant les fractions chromatographiées sur gel filtration Biogel P 100 contenant des substances ayant des activités antibactériennes a été soumis à une séparation sur une colonne d'échange de cations. la résine utilisée (CM-Cellulose Whatman CM 52) a été équilibrée dans un premier temps par rinçage dans une solution d'acétate d'ammonium 50 mM pH 6,8, elle est ensuite coulée dans une colonne de 1,5 x 25 cm par sédimentation à un débit de 90 ml/heure. Les fractions protéiques ont été éluées d'abord avec deux volumes de tampon acétate d'ammonium 50 mM pH 6,8 (débit 10 ml/heure) puis à l'aide d'un gradient linéaire en NaCl 0-0,5 M réalisé à l'aide d'un formeur de gradient. Un collecteur de fractions a recueilli les échantillons après passage dans une cellule enregistreuse (filtre à 280 nm). Après dessalage par dialyse, l'activité antibactérienne des fractions a été testée sur Micrococcus kristinae en milieu gélosé.

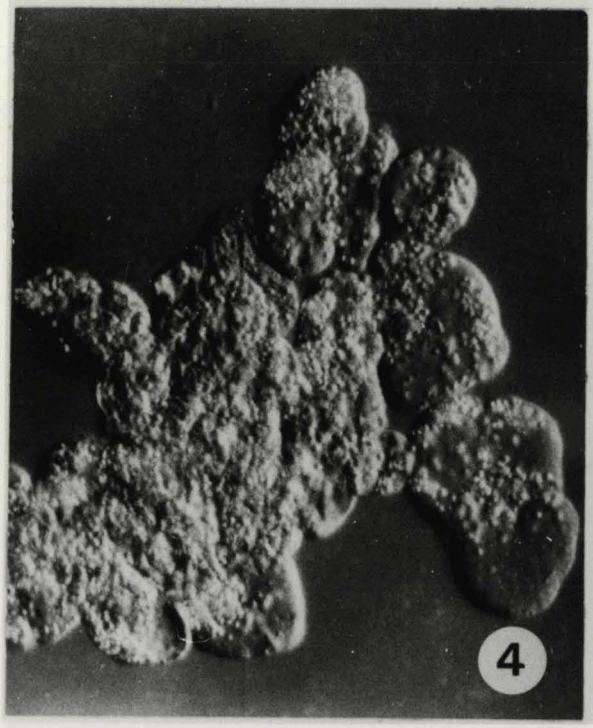
CHAPITRE II

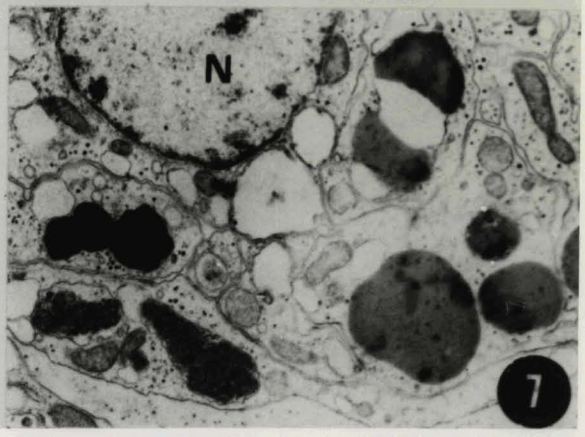
CYTOLOGIE DES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS DE COELOMOCYTES DE *NEREIS DIVERSICOLOR*











BU LILLE

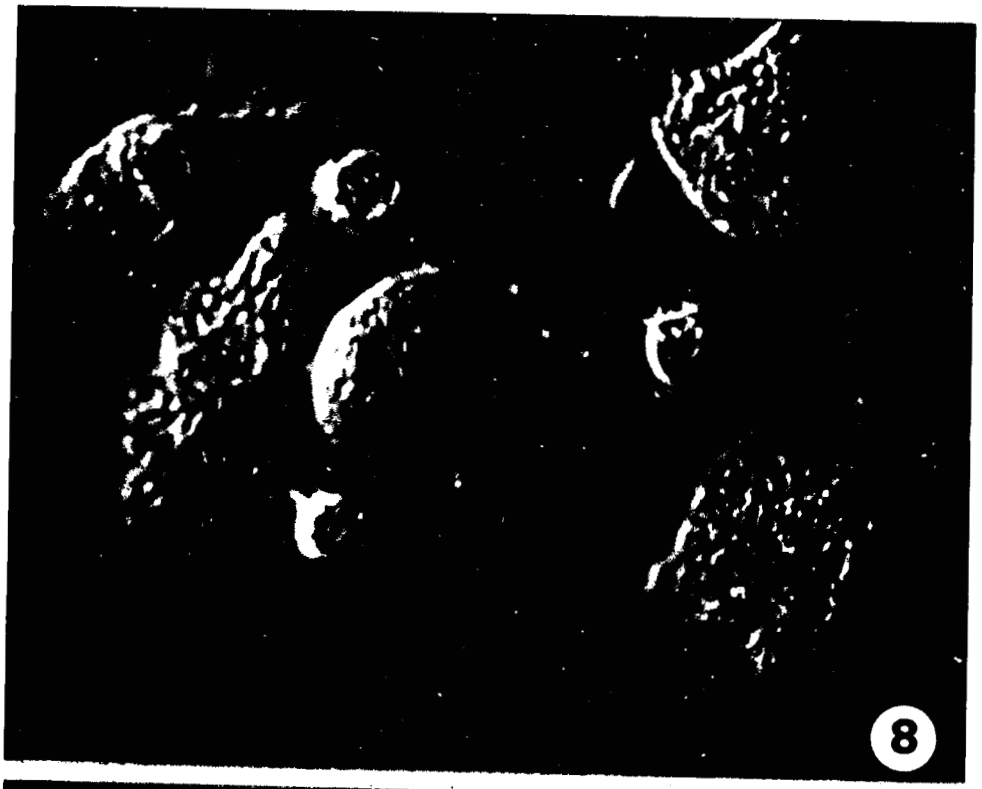
Fig. 3 - Vue au microscope photonique des granulocytes après coloration par la technique de Papanicolaou. Les granulocytes I (G1) sont caractérisés par la présence de microfilaments, les granulocytes II (G2) par leur cytoplasme bourré de granules et les granulocytes III (G3) par leur petite taille et leur volumineux noyau. (X 3300)

Fig. 4 - Observation sur le vivant d'un agrégat d'éléocytes dont les lobules lipidiques sont visibles à travers la membrane. (X 1200)

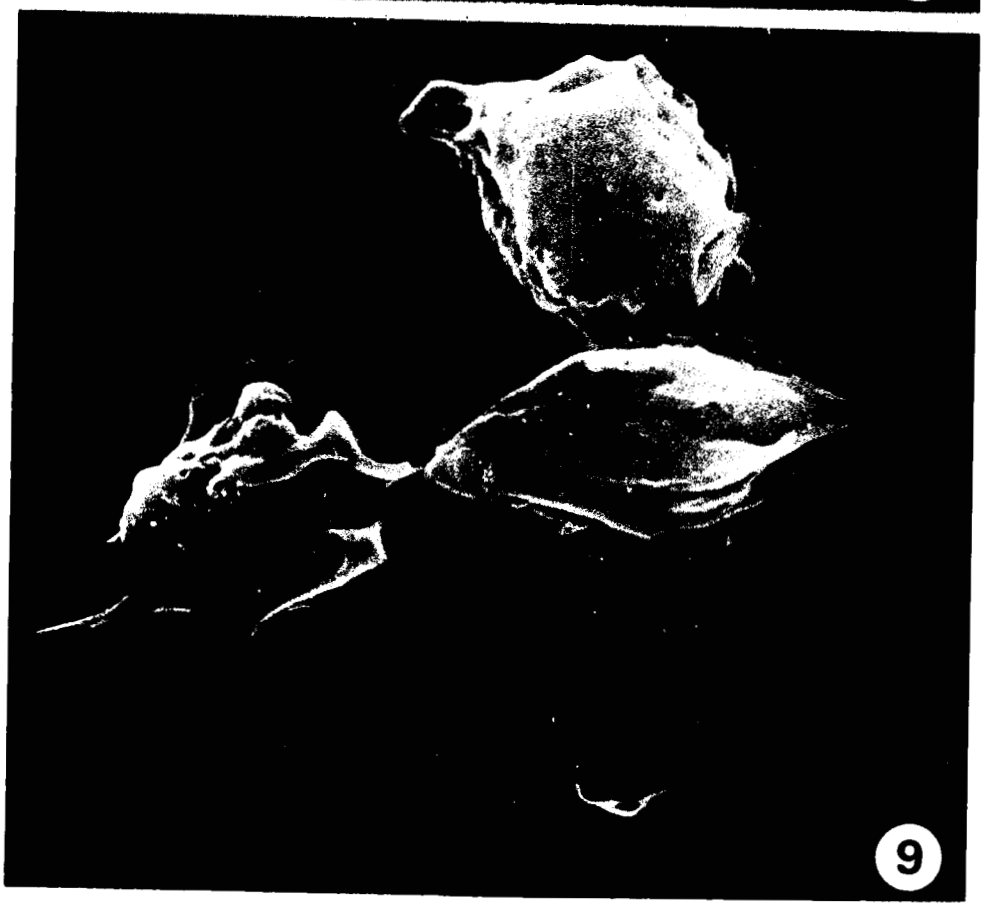
Fig. 5 - Granulocyte I étalé, caractérisé par la formation d'un voile circulaire. (X 7500)

Fig. 6 - Ultrastructure d'un granulocyte I. On observe d'abondantes vacuoles, des granules (g), des microfilaments (mf) et un noyau central. (X 15000)

Fig. 7 - Ultrastructure d'un éléocyte caractérisé par des lobules lipidiques. (X 9500)



8



9

- Les granulocytes I. Ce sont des cellules de 6 à 7 µm de diamètre qui se présentent sous deux formes : ovalaire et effilée (figs 8 et 14), formes qu'elles perdent après étalement sur lame. Elles prennent alors une forme circulaire caractéristique, différente de celle d'autres granulocytes. Ces cellules après coloration par la technique de Papanicolaou sont caractérisées par la présence de faisceaux de microfilaments intracytoplasmiques colorés en rouge. Elles possèdent un noyau de forme ovalaire, parfois rond et un cytoplasme légèrement granuleux coloré en vert (fig. 3).

- Les granulocytes II constituent la catégorie numériquement la plus importante. Ce sont de relativement grandes cellules, 5 à 6 µm de diamètre, au cytoplasme fortement coloré en vert par suite de l'abondance de granules de tailles diverses. Ces cellules possèdent un noyau légèrement excentré. Lors de l'étalement elles présentent des aspects assez polymorphes (figs 8 et 15).

- Les granulocytes III. Cellules de petite taille : 3 à 5 µm de diamètre (figs 3 et 8) caractérisées par la présence d'un volumineux noyau sphérique central. Leur cytoplasme est très réduit et granuleux. Sur le vivant ce sont de petites cellules qui émettent de nombreux et fins filopodes qui leur confèrent une grande mobilité sur un support (fig. 16).

2 - Observations en microscopie électronique

a) Les éléocytes présentent en section des contours irréguliers. Ces cellules renferment de volumineux globules lipidiques, des rosettes de glycogène et des granules protéiques denses. Leur cytoplasme renferme des vacuoles contenant des sarcolytes phagocytés. Le noyau est circulaire et excentré, sa chromatine apparaît moins dense aux électrons que celle des autres cellules du coelome (fig. 7).

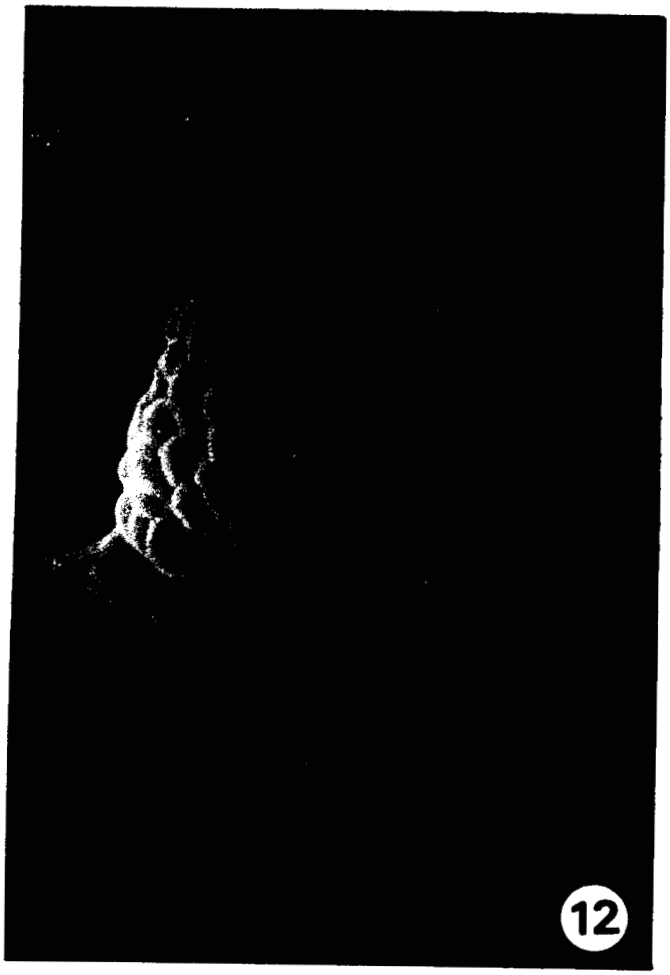
b) Les granulocytes

- Les granulocytes I. En microscopie à balayage, fixés extemporanément, ils se présentent sous une forme effilée ou ovalaire. Une fois étalés, leur membrane cytoplasmique prend la forme d'un voile circulaire caractéristique (figs 5 et 9). En coupe ces cellules sont caractérisées par la présence de microfilaments et de deux catégories de granules de morphologie différente. Leur noyau renferme une chromatine diffuse et dense aux électrons.

- Les granulocytes II. L'étalement est variable selon les cellules et ne peut être pris comme critère distinctif. Ils sont caractérisés par la formation de nombreux pseudopodes. Le cytoplasme est occupé par de nombreux granules qui sont visibles à travers la membrane plasmique (figs 9 et 10). En

10

11


12

13

coupe, ils sont caractérisés par la présence de nombreux granules denses de taille et de forme variable. Le noyau renferme une chromatine groupée en mottes denses accolées à l'enveloppe nucléaire (fig. 11).

- Les granulocytes III. Ils présentent un contour très régulier et émettent au contact du verre des filopodes caractéristiques de leur mobilité (fig. 12). En coupe ils apparaissent sous une forme circulaire avec un rapport nucléocytoplasmique élevé ; le cytoplasme renferme de rares granules denses aux électrons (fig. 13).

3 - Etude par analyse d'images au SAMBA 200

Une étude cytologique par analyse d'images a été faite sur des étalements de granulocytes colorés selon la technique de Papanicolaou. Au cours de cette analyse, nous avons utilisé l'analyse taxonomique qui est un mode d'analyse multifactorielle non supervisée par l'utilisateur. Elle permet de rechercher parmi une population de cellules caractérisées par divers paramètres (taille, surface, densité optique...) quels sont les groupes significativement différents par référence aux seules particularités de la distribution de ces paramètres (Emptoz et al., 1978 ; Terrenoire et Tounissoux, 1979).

Dans une première analyse, nous avons pris en compte deux paramètres : surface et densité optique intégrée (DOI). Dans ces conditions nous avons obtenu trois populations cellulaires. Lorsque celles-ci sont projetées sur un graphique (fig. 17), les groupes se superposent régulièrement depuis les surfaces les plus faibles vers les plus grandes et ceci indépendamment de la valeur de la densité optique intégrée. Cette représentation est cependant assez pauvre d'enseignement puisque seuls 2 paramètres sur les 15 possibles sont pris en compte.

Dans une seconde étude nous avons pris en compte 15 paramètres. La projection sur un repère à deux dimensions des 15 paramètres montre que les 3 groupes précédemment définis se répartissent sur une ligne en cloche (fig. 18). Les groupes extrêmes étant nettement éloignés l'un de l'autre d'après la matrice de confusion présentée dans le tableau I.

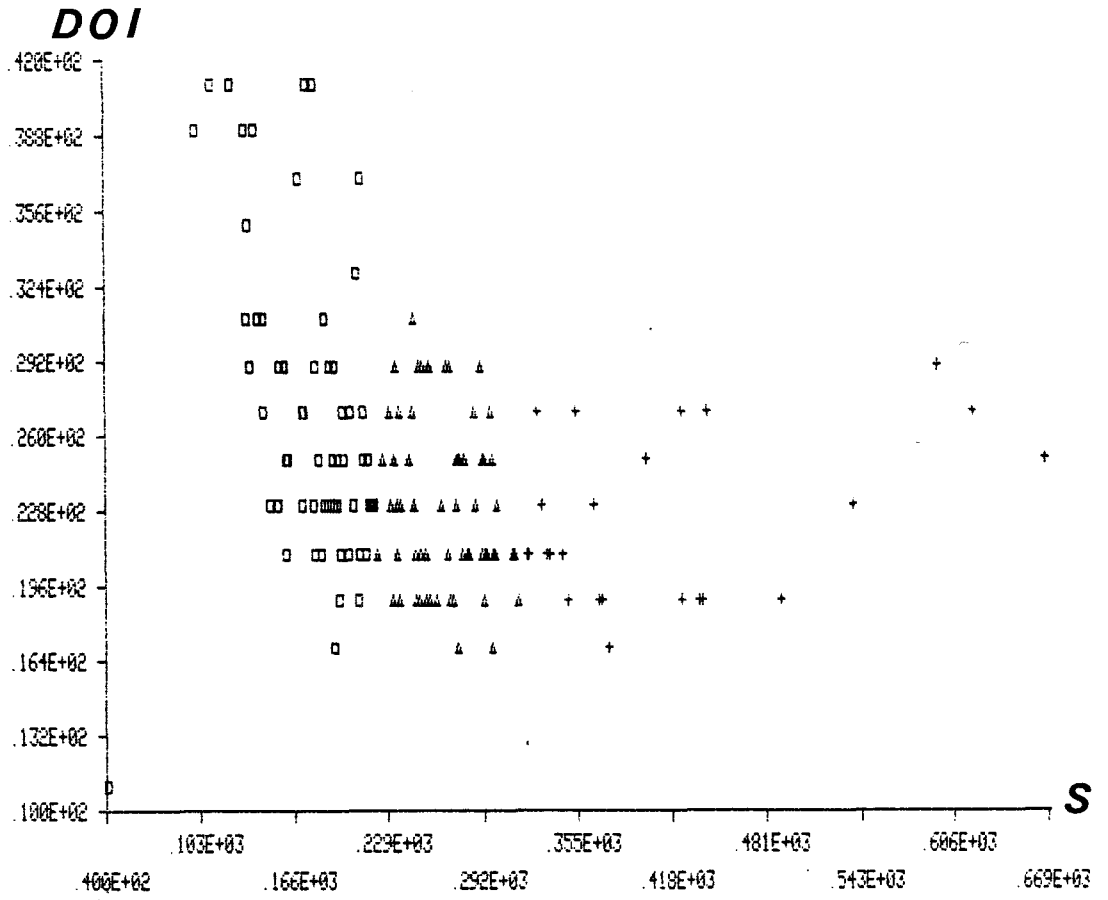


Fig. 17 - Nuage de points représentant la surface cellulaire (S) en fonction de la densité optique intégrée (DOI) des cellules réparties dans les 3 classes définies par l'analyse taxonomique non supervisée.
(□ Granulocyte III ; △ Granulocyte II ; + Granulocytes I).

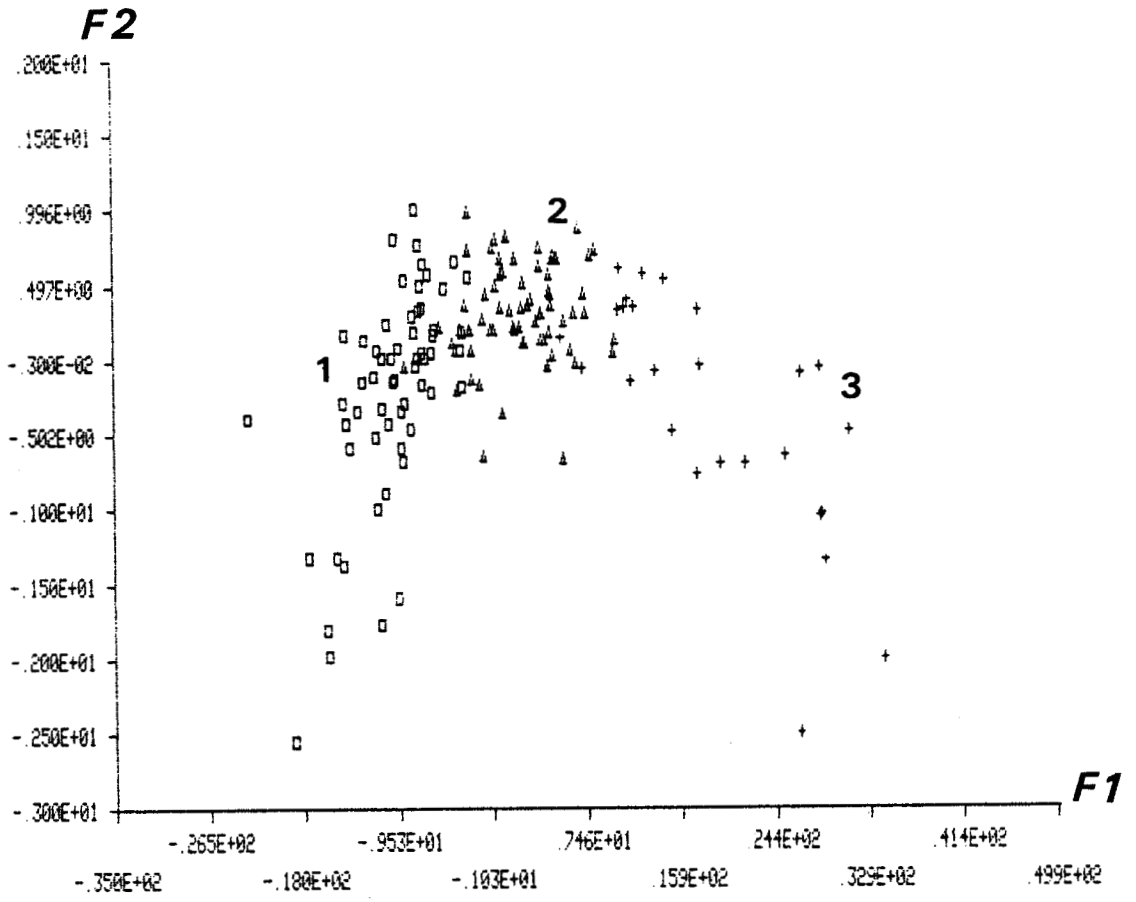


Fig. 18 - Représentation sur le plan factoriel des 3 classes de cellules définies par l'analyse taxonomique non supervisée. F1 et F2 représent respectivement le premier et le deuxième axe factoriel (1ère classe = granulocytes III ; 2ème classe = granulocytes II ; 3ème classe = granulocytes I).

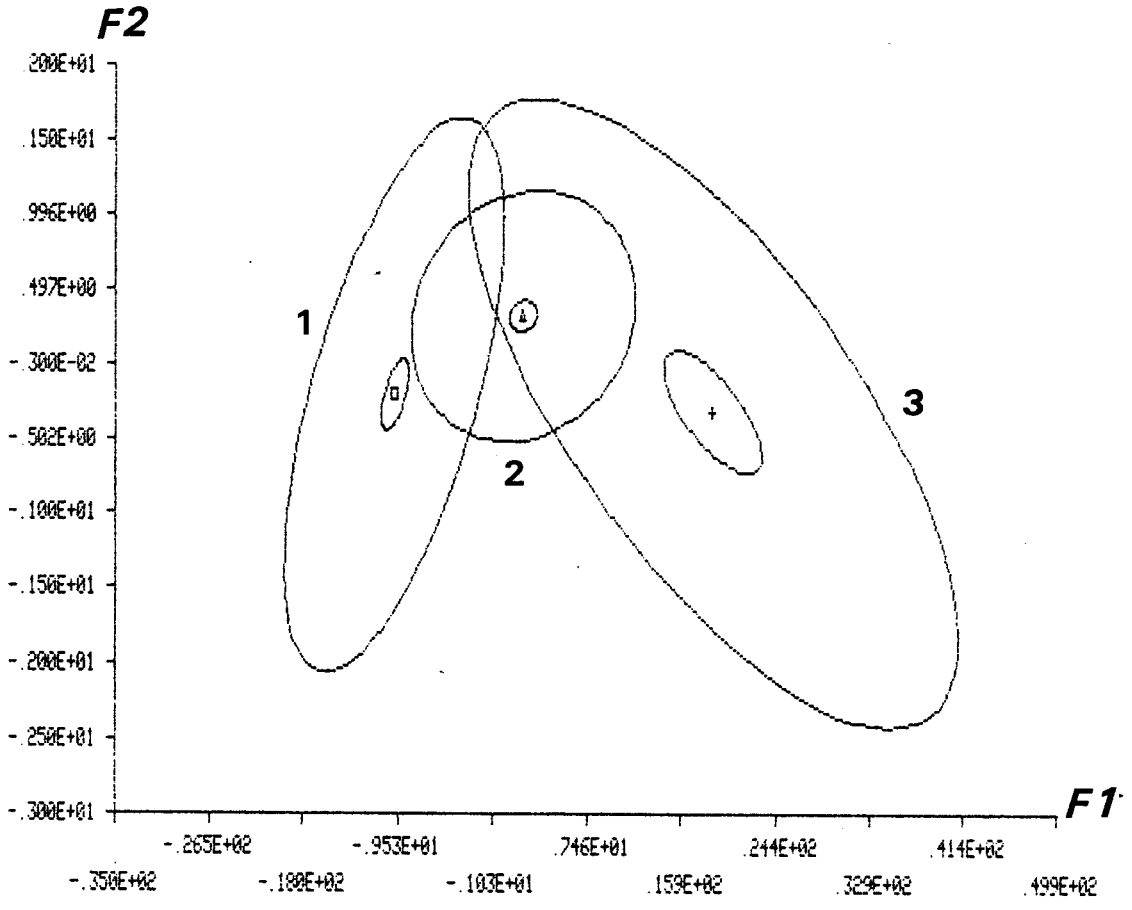


Fig. 19 - Représentation sur le plan factoriel de la moyenne au risque 5 % et de l'intervalle de tolérance à 95 % des 3 groupes définis par l'analyse non supervisée. F1 et F2 : 1er et 2ème axe factoriel.

Tableau I - Matrice de confusion d 'après l'analyse discriminante.

	III	II	I
III	57	4	0
II	5	61	0
I	0	4	22

La représentation de ces trois groupes par leur moyenne (au risque de 5 %) et leur dispersion (ellipse de tolérance à 95 % de la population) permet de mieux appréhender la répartition des cellules sur la ligne en cloche (fig. 19).

La classification ainsi obtenue s'avère bonne puisque le pourcentage de bonne classification est de 91,5 %. Les paramètre les plus discriminants étant : la surface 218,6, la dissymétrie 8,39, la densité optique intégrée 6,37, la densité optique moyenne 5,09 ...

Nous pouvons donc conclure à la présence de 3 populations homogènes de granulocytes à savoir les granulocytes I, II et III en fonction de leur position sur le graphique.

- Les granulocytes III représentent 25 % de l'ensemble des cellules adhérentes.
- Les granulocytes II 42 %. Ce sont des cellules de taille intermédiaire caractérisées par un cytoplasme bourré de granules denses.
- Les granulocytes I caractérisés par la présence de nombreux microfilaments représentent 32 % des granulocytes.

DISCUSSION

Les coelomocytes de Nereis diversicolor peuvent être subdivisés en deux groupes : éléocytes et granulocytes.

Les éléocytes sont des cellules non adhérentes de très grande taille (environ 40 µm de diamètre) ayant déjà fait l'objet de nombreuses études (Dhainaut, 1966 a, b ; Baskin, 1974 ; Dhainaut, 1984). Ce sont des cellules à contour très régulier, leur cytoplasme renferme d'abondants lobules lipidiques, du glycogène, des granules denses et une volumineuse vacuole qui d'après les travaux de Dhainaut (1984) joue un rôle important dans l'épuration du milieu intérieur et du catabolisme protéique. Ces cellules interviennent

également dans la synthèse de la vitellogénine, molécule stockée secondairement dans les ovocytes sous forme de vitelline (Baert et Slomianny, 1986). Les éléocytes présentent les analogies structurales des cellules chloragogènes de Lumbricus terrestris (Linthicum et al., 1977).

Les granulocytes I sont caractérisés par une forme ovalaire ou effilée qu'ils perdent au contact d'un support. Ces cellules possèdent une grande propriété d'adhérence et une légère mobilité. L'étalement se manifeste par la formation d'un voile circulaire. Le cytoplasme est abondant et renferme des faisceaux de microfilaments et des granules denses. Cette structure les rapproche beaucoup des granulocytes de type I de Lumbricus terrestris (Linthicum et al., 1977) et des leucocytes fibrilaires d'Eisenia fetida (Valembois, 1971 c ; Stang Voss, 1971). A côté de ces cellules existent les granulocytes II qui présentent des formes diverses, de ce fait leur morphologie après étalement ne peut être retenue comme critère distinctif. Ces cellules renferment d'abondants granules denses et du glycogène. D'après les travaux de Dhainaut (1984), les granules de ces cellules seraient morphologiquement comparables à ceux des neutrophiles des Vertébrés.

Sur le plan fonctionnel, les granulocytes I et II présentent des adaptations fonctionnelles particulières, ils s'associent dans la formation des capsules réactionnelles formées autour des corps étrangers implantés dans le coelome (Porchet-Henneré et al., 1987 a ; Porchet-Henneré et M'Béri, 1987). D'après les travaux de Boilly-Marer (inédit), les granulocytes I interviendraient également dans les réactions de cicatrisation, remplissant par là une fonction identique à celle de certains granulocytes d'Insectes (Bréhélin et al., 1976).

Les granulocytes III possèdent une mobilité très élevée caractérisée par l'émission de nombreux pseudopodes et filopodes. L'hypothèse avait été émise par Dhainaut (1984) que ces cellules pourraient être comparées à des progranulocytes, donc représenter des stades immatures d'autres catégories cellulaires. Des observations plus détaillées, notamment la connaissance des caractéristiques membranaires (voir chapitre suivant), permettent de les considérer comme une lignée cellulaire indépendante douée d'un pouvoir phagocytaire élevé. Ces cellules ressemblent aux amibocytes granulaires d'Arenicola marina (Dales and Dixon, 1982). Elles sont caractérisées par un volumineux noyau central et quelques granules qui les rapprochent des coagulocytes de certaines familles d'Insectes (Ashok Raina, 1976) et des leucocytes du Gastéropode Biomphalaria glabrata (Jeong et Heyneman, 1976).

CHAPITRE III

CARACTERISATION DES COELOMOCYTES PAR LES LECTINES

APPLICATION A UNE METHODE DE SEPARATION DES GRANULOCYTES

CARACTERISATION DES COELOMOCYTES PAR LES LECTINES

APPLICATION A UNE METHODE DE SEPARATION DES GRANULOCYTES

Introduction

Les résultats du chapitre précédent sont basés essentiellement sur des données d'ordre morphologique. Nous avons recherché des critères plus spécifiques, notamment au niveau des constituants de surface membranaire. Ceux-ci en effet jouent un rôle important dans les processus de reconnaissance membranaire, processus qui conditionnent des aspects variés de l'activité physiologique des coelomocytes : phagocytose, encapsulation, etc.

Les lectines par suite de leur spécificité pour les sucres, permettent d'aborder certains aspects de la composition du revêtement cellulaire. Cet outil a été largement utilisé chez plusieurs groupes d'Invertébrés dans la mise en évidence des récepteurs membranaires : Schoenberg et Cheng (1980), Yoshino (1981), sur les hémocytes de Biomphalaria glabrata ; Yoshino et al. (1979) sur les hémocytes de Lamellibranches ; Roch et Valembois (1978) sur les leucocytes de l'Annélide Oligochète Eisenia foetida ; Cheng et al. (1980) sur les hémocytes de Lamellibranches ; Gebbinck (1980) sur les hémocytes d'Invertébrés marins ; Renwrantz et Cheng (1977) sur les hémocyte d'Helix pomatia ; Renwrantz et al., (1985) sur les hémocytes de Mytilus edulis. Sminia et al. (1981) ont étudié le rôle des récepteurs membranaires sur la reconnaissance de corps étrangers chez Lymnaea stagnalis.

Dans ce chapitre, nous exposerons successivement les résultats obtenus avec des lectines dans la caractérisation des revêtements membranaires des différents coelomocytes, puis la mise en application des spécificités des lectines pour l'isolement des populations cellulaires.

1 - Test d'agglutination

Cette manipulation a été effectuée sur des coelomocytes prélevés et incubés comme le décrit le chapitre I. Après la répartition des lectines à des dilutions bien définies dans des boîtes Microtiter (NUNC) à fond rond, on ajoute à chaque puits 50 µl de la suspension de cellules. Les boîtes sont incubées à 22°C. Les observations sont faites in situ après 1 heure au binoculaire et sur lame en microscopie interférentielle.

Les lectines utilisées sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Lectines	Abréviation	Sucres spécifiques
Aleusia aurantia Agglutinin	AAA	L-Fucose
Concanavalin A	ConA	D-Mannose
Lens culinaris Agglutinin	LCA	D-GalNac
Peanut Agglutinin	PNA	D-Galactose
Pokeweed Mitogen	P.W.M.	--
Ricinus communis Agglutinin 1	RCA1	D-Galactose
Soy bean Agglutinin	SBA	D-Galactose
Ulex europaeus Agglutinin 1	UEA1	L-Fucose
Wheat Germ Agglutinin	WGA	D-GLcNac
Datura stramonium Agglutinin	DSA	D-GlcNac
Phytohemagglutinin from Phaseolus vulgaris	PHA	--

Nous avons pu montrer que sur 8 lectines utilisées, 6 provoquent l'agglutination des coelomocytes de Nereis diversicolor (Tableau III). Le degré d'agglutination varie en fonction de la lectine et de sa concentration. On constate que les lectines ConA et RCA1 apparaissent beaucoup plus réactives. Dans le cas de la ConA un début d'agglutination est obtenu à la concentration de 30 µg/ml. Le nombre maximum (50) de cellules agglutinées survient pour une concentration de 125 µg/ml. La SBA et la RCA1 ne sont réactives qu'à des concentrations de l'ordre de 250 µg/ml.

La PNA, AAA ou la PWM n'agglutinent qu'un nombre limité de cellules même avec une concentration de 0,5 mg/ml. Dans le cas de LCA et WGA aucune action agglutinante ne se manifeste sur les coelomocytes.

Une inhibition de l'agglutination est obtenue lorsque les cellules sont incubées simultanément en présence de la lectine et du sucre inhibiteur correspondant à la concentration de 0,2 M. D'après Novogrodsky et Katchalsky (1973), cette inhibition est due à la non fixation de la lectine correspondant sur les cellules par une réaction de compétition durant laquelle le sucre et le récepteur entrent en compétition pour le site de fixation de la lectine.

Tableau III - Interaction des coelomocytes de Nereis diversicolor avec différentes lectines par les tests d'agglutination ; influence de la concentration en lectine (les dilutions des lectines ont été faites à partir d'une concentration initiale de 0,5 mg/ml).

Lectines	Concentration en lectines (mg/ml)				
	0,500	0,250	0,125	0,06	0,03
AAA	++	+	±	-	-
ConA	+++	+++	+++	++	+
PNA	+++	++	-	-	-
PWM	++	+	-	-	-
RCA1	++	++	++	+	-
SBA	++	++	+	-	-
LCA	-	-	-	-	-
WGA	-	-	-	-	-

Tableau IV - Capacité de marquage de coelomocytes par des lectines à 10 µg/ml.

Lectines	G I	G II	G III	Eléocytes
AAA	-	+	+++	-
ConA	+	++	+++	+
DSA	±	+	+	-
PHA	-	-	-	-
PNA	-	+++	-	-
SBA	-	++	+	-
UEA1	-	++	+	-
WGA	-	-	-	-

2 - Visualisation des sucres membranaires par l'utilisation de lectines fluorescentes

A l'aide des lectines marquées soit à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) soit à la rhodamine (TRITC), nous avons mis en évidence divers récepteurs lectiniques à la surface des coelomocytes de Nereis diversicolor.

a) Marquage des coelomocytes

Après prélèvement et séparation des produits génitaux, les coelomocytes sont répartis en aliquots dans des tubes à hémolyse auxquels on ajoute 100 µl de lectine à la concentration de 10 µg/ml. Le mélange est incubé à 4°C pendant 30 minutes. L'excès de lectine est éliminé par des lavages successifs dans le tampon PBS, puis quelques gouttes de la suspension de cellules sont déposées sur lame et observées en fluorescence en lumière réfléchie. Pour cette étude nous avons utilisé 8 lectines.

Des observations réalisées (tableau IV), il découle que la ConA est capable de se fixer sur tous les coelomocytes. L'incubation des cellules en présence de PNA provoque un marquage des granulocytes II (figs 20, 23), par contre les autres ne présentent aucune fluorescence, c'est le cas notamment des granulocytes III (fig. 21). Lorsque les incubations sont faites en présence de UEA ou AAA on observe par contre un fort marquage des granulocytes III (fig. 22). Après incubation en présence de WGA ou de PHA, aucun coelomocyte n'est marqué. Ceci semble indiquer que les différentes sous-populations de coelomocytes possèdent des structures membranaires quantitativement et qualitativement différentes en ce qui concerne la composition et la répartition de leurs sucres.

b) Intensité de la fluorescence en fonction de la concentration en lectine

Deux lectines TRITC-ConA et TRITC-SBA ont été utilisées dans cette manipulation à des concentrations variant de 0,1 à 100 µg/ml. Nous constatons qu'à une concentration de 1 µg/ml la ConA se fixe sur les trois types de granulocytes, avec un maximum de fluorescence au niveau des granulocytes III. A des concentrations inférieures à 0,5 µg/ml seuls les granulocytes III continuent d'être marqués (fig. 24).

A 50 µg/ml la TRITC-SBA provoque une fluorescence de l'ensemble des granulocytes. Pour une concentration inférieure à 50 µg/ml seuls les granulocytes II et III apparaissent fluorescents (fig. 25). En conclusion, il

Figs 14, 15, 16 - Etude en microscopie interférentielle des granulocytes activés après leur adhérence. Après 15 minutes d'incubation les granulocytes commencent à s'étaler et à émettre des filopodes et des pseudopodes.

14. Granulocyte de type I. (X 4000)
15. Granulocyte de type II. (X 4000)
16. Granulocyte de type III. (X 4000)

Figs 20-23 - Marquage des granulocytes de Nereis diversicolor avec des lectines fluorescentes.

20. Marquage des granulocytes II avec PNA-FITC. On observe une très forte fluorescence à la surface de la cellule. (X 3600)
21. Granulocyte III incubé avec PNA-FITC. Aucune fluorescence n'est observée à la surface de la cellule (flèche blanche). (X3600)
22. Granulocytes III marqués avec UEA 1-TRITC. Noter la forte fluorescence des cellules. (X 3600)
23. Vue d'ensemble des granulocytes incubés avec PNA-FITC. Seuls les granulocytes II apparaissent marqués (flèche noire), tandis que les granulocytes III ne présentent aucune fluorescence (flèche blanche). (X 960)

Fig. 26-33 - Vues en microscopie électronique à transmission (TEM) des récepteurs de la Con A à la surface des coelomocytes de Nereis diversicolor.

prélevés et lavés dans le PBS contenant l'EDTA sont incubés en présence de la lectine (1 mg/ml dans le PBS) pendant 5 minutes puis déposés sur du sérum de veau foetal à 40 %. Par sédimentation, les agrégats des cellules formés sous l'action de la lectine s'accumulent au fond du tube. Les cellules non agglutinées restent en suspension. Les agrégats sont ensuite récupérés puis lavés dans du tampon PBS 50 mM pH 7,2. Ils sont soit observés directement, soit traités pour l'observation en microscopie électronique. La spécificité de la lectine est vérifiée par des dissociations des agrégats en présence du sucre spécifique pendant 15 minutes à la température du laboratoire. La viabilité cellulaire est vérifiée par le test du bleu trypan à 0,1 % dans le tampon PBS.

a) Agglutination par des lectines spécifiques du galactose

α) SBA. Les essais d'utilisation de la SBA ont permis l'obtention des agrégats d'environ 25 cellules. La dissociation de ceux-ci est obtenue avec 0,2 M D-galactose. La coloration des cellules mortes par le bleu trypan à 0,1 % révèle une viabilité de 85 %. L'observation en microscopie électronique montre une homogénéité relative car les agrégats ne renferment que 80 % de cellules de même type (granulocytes II).

β) PNA. La PNA (1 mg/ml) provoque au bout de 5 minutes d'incubation des agrégats de plusieurs centaines de cellules (fig. 38), d'autres agrégats de petites tailles renferment environ 50 cellules. Après dissociation des agrégats en présence de 0,3 M de D-galactose, 90 % des cellules restent viables. Les observations des coupes semi-fines (fig. 39) et en microscopie électronique (fig. 42) révèlent que les agrégats sont constitués par 96 % de granulocytes II. Les 4 % restant sont représentés par des granulocytes III. Il faut toutefois noter que tous les granulocytes II ne sont pas agglutinés, certains restent libres dans le milieu d'incubation. Vu la petite taille des agrégats obtenus, nous avons utilisé la PNA pour les manipulations ultérieures.

b) Agglutination par des lectines spécifiques du fucose

Les lectines UEA et AAA se lient comme nous l'avons vu sur les résidus fucose.

α) UEA. L'emploi de l'UEA à 1 mg/ml dans le tampon PBS provoque la formation des agrégats d'environ 22 cellules parmi lesquelles les granulocytes III représentent 90 % et les granulocytes II 9,09 %. La dissociation des

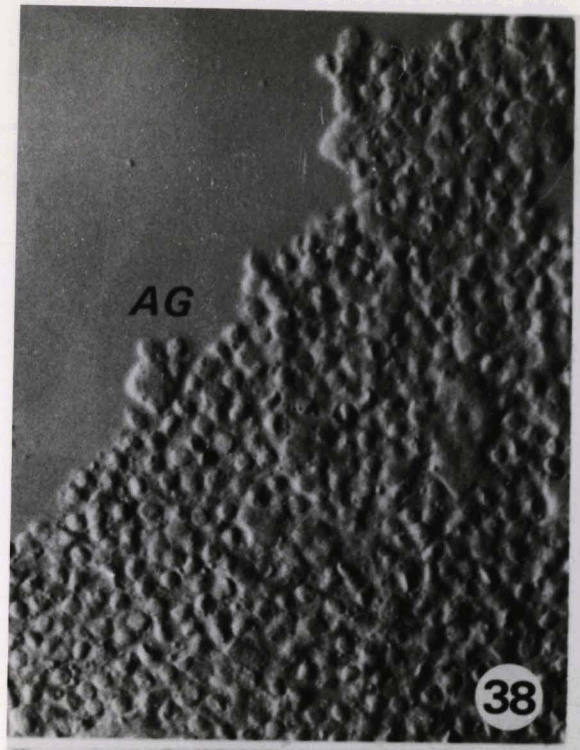
Fig. 38 - Agrégats de granulocytes II (AG), obtenus par agglutination avec la PNA à 1 mg/ml pendant 5 mn à 22°C dans le tampon PBS. (Vue au microscope interférentiel). (X1200)

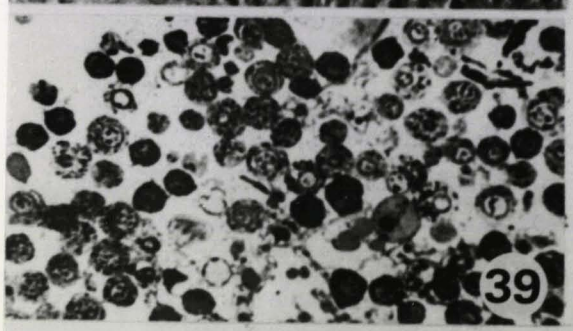
Fig. 39 - Coupe semi-fine d'un agrégat de granulocytes II observée au microscope photonique après coloration au bleu Azur B. (X 600)

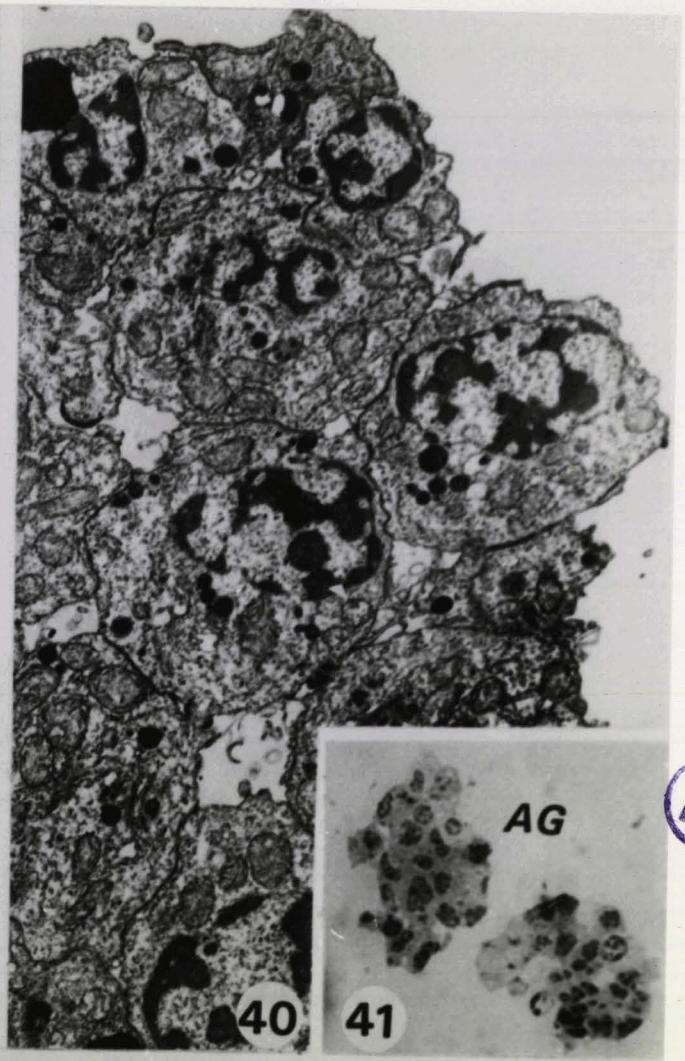
Fig. 40 - Agrégats de granulocytes III obtenus par agglutination avec l'UEA 1 pendant 5 mn à 22°C, et observée au TEM. Noter l'homogénéité de l'agrégat. (X 9600)

Fig. 41 - Coupe semi-fine d'agrégats (AG) de granulocytes III obtenus par agglutination avec l'UEA 1. (Observation en microscopie photonique). (X 600)

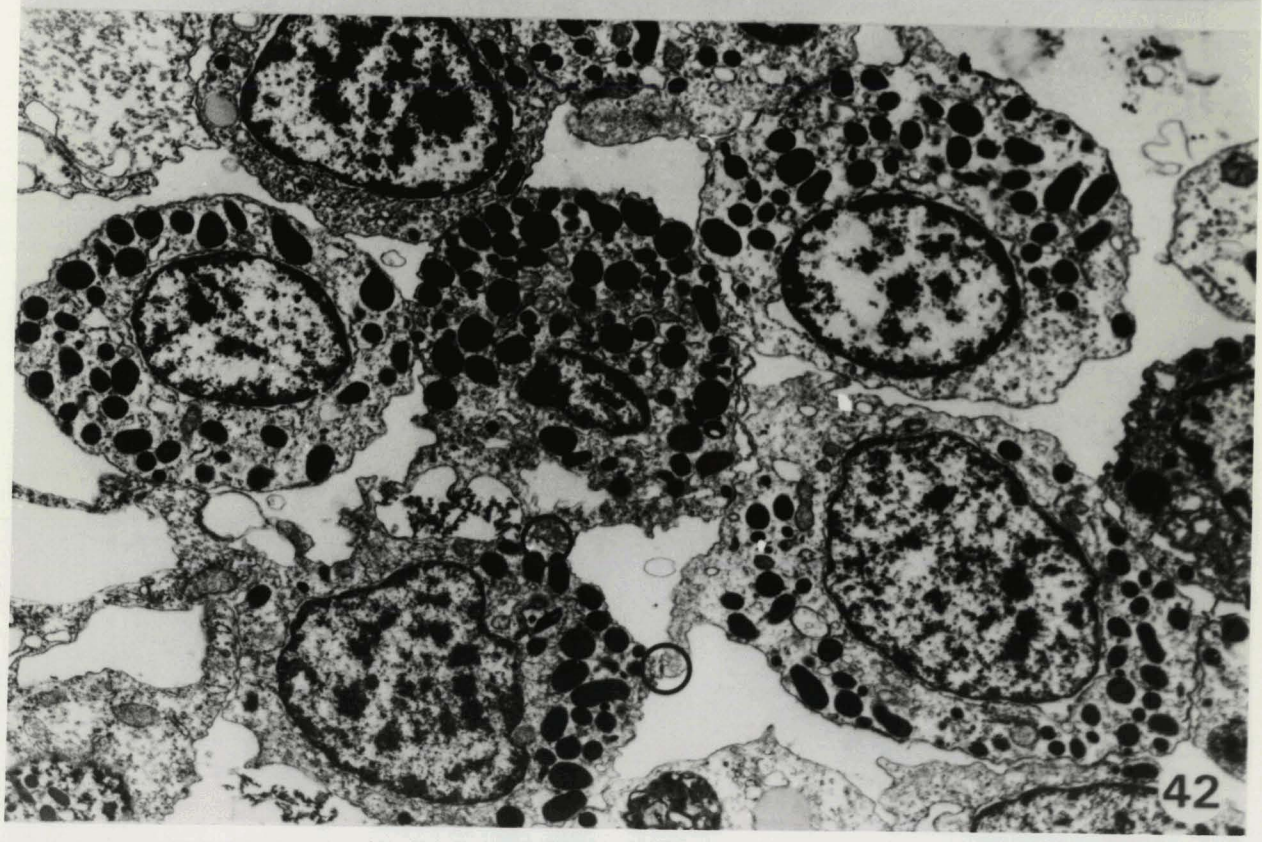
Fig. 42 - Vue au TEM d'un agrégat de granulocytes II formé par l'action de la PNA. On note la présence de nombreux points de contact (cercles) entre les cellules. (X 9600)







BU
LILLE



agrégats avec 0,2 M L-fucose a permis de constater que 95 % des cellules restent viables après séparation.

β) AAA. L'utilisation de la lectine AAA provoque la formation des agrégats de taille supérieure à celle des agrégats formés avec l'UEA. Ces agrégats renferment environ 64 cellules représentées essentiellement par les granulocytes III et les granulocytes II. Les granulocytes III constituent 85,9 % de l'ensemble des cellules. Les observations des cellules sur semi-fines et en microscopie montrent que les agrégats formés par utilisation de ces deux lectines UEA et AAA apparaissent homogènes : 86 à 90 % de cellules identiques (figs 40, 41).

En conclusion, deux catégories de cellules peuvent être séparées par cette méthode :

- Les granulocytes II grâce à l'abondance des résidus galactose,
- Les granulocytes III par l'abondance des résidus fucose.

Il est à signaler que les agrégats de cellules obtenus par utilisation du PNA sont constitués d'un nombre de cellules plus élevé que ceux obtenus après action de l'UEAl et AAA.

DISCUSSION

Cette étude fait ressortir l'existence d'une variété de récepteurs lectiniques à la surface des membranes des coelomocytes de Nereis diversicolor. Ces récepteurs ont été mis en évidence à la fois par des tests d'agglutination et par utilisation de lectines marquées en microscopie.

Les récepteurs à la ConA ont été décelés aussi bien sur les cellules adhérentes : les granulocytes que sur les cellules non adhérentes : les éléocytes. Chez les Oligochètes, seuls les leucocytes non adhérents possèdent des récepteurs pour la ConA (Roch et Valembois, 1978). Les récepteurs à la ConA ont été observés en grand nombre sur les hémocytes de plusieurs Invertébrés (Gebbinck, 1980 ; Yoshino, 1983 ; Yoshino et al., 1979 ; Schrevel et al., 1979 ; Yoshino, 1981), toutefois l'absence de ces récepteurs a été signalée chez Mytilus et Aplysia (Gebbinck, 1980).

Les lectines RCAl et SBA, spécifiques des résidus galactose provoquent des agglutinations des coelomocytes. L'emploi des lectines fluorescentes montre que très peu de récepteurs sont présents à la surface de la membrane des éléocytes alors que les granulocytes présentent d'abondants récepteurs qui seraient responsables du processus d'agglutination. Ces récepteurs ont été signalés sur les hémocytes adhérents des Gastéropodes (Renwrantz et Cheng, 1977 ; Schoenberg et Cheng, 1981).

Les lectines UEAl et AAA, spécifiques des résidus fucose, induisent également des agglutinations mais la réaction est moins importante car il ne se forme que de petits agrégats comparables à ceux formés avec les hémocytes d'Helix pomatia (Renwrantz et Cheng, 1977).

Les coelomocytes de Nereis diversicolor ne possèdent pas de récepteurs contenant des résidus N-acétyl-glucosamine (GLc-Nac) car l'incubation avec la WGA n'a provoqué aucune agglutination, ni réactivité par utilisation de lectines fluorescentes. Par contre ces récepteurs sont signalés sur les hémocytes de Mytilus edulis (Renwrantz et al., 1985) et de Drosophila melanogaster (Nappi et Silvers, 1984).

Les résultats obtenus en microscopie photonique à fluorescence ont montré que les populations de coelomocytes peuvent être caractérisées par la nature de leurs récepteurs : les granulocytes II, cellules les plus abondantes (54 %), possèdent de nombreux récepteurs contenant du galactose, résidus mis en évidence avec la SBA et PNA. Les granulocytes III, cellules de petite taille (24 %), montrent une affinité pour les lectines UEA 1 et AAA qui sont des lectines à fucose.

L'intensité du marquage varie selon la concentration des lectines utilisées. Dans le présent travail nous avons utilisé des faibles concentrations dans le but d'obtenir une bonne sélectivité dans la distinction des divers types de coelomocytes. Par suite des conditions expérimentales, une réaction apparemment négative ne signifie donc pas l'absence complète des récepteurs à la surface d'un type de cellule, mais indique que ce type de récepteur est plus rare que dans les cellules voisines.

En microscopie électronique, l'examen des cellules marquées avec des lectines couplées à la péroxydase ou à la ferritine confirme la présence des récepteurs à la surface des coelomocytes. Des descriptions similaires ont été effectuées au niveau des cellules de plusieurs Invertébrés (Joky et al., 1983; Sminia et al., 1981; Cheng et al., 1980; Miegeville et al., 1987). Les investigations ont confirmé les différences de marquage entre les types cellulaires, différences mises en évidence en microscopie photonique à fluorescence.

Chez les Néréidiens nous ne possèdons actuellement que peu de données sur un rôle physiologique des récepteurs membranaires des coelomocytes mais il a été signalé dans d'autres groupes d'Invertébrés que ces récepteurs jouent un rôle important dans la reconnaissance cellulaire (Huber et Douglas, 1973; Dwyer, 1974; Bar-Shavit et al., 1977; Freimer et al., 1978; Teodorescu, 1984; Sminia et al., 1981; Miegeville et al., 1987). Notons que les granulocytes II et III qui montrent une diversité de récepteurs sont des cellules qui présentent un pouvoir phagocytaire élevé vis-à-vis des bactéries (Dhainaut, 1988). Les éléocytes qui ne possèdent que des récepteurs à la ConA ne présen-

tent aucune activité vis-à-vis des bactéries mais sont des phagocytes des sarcolytes libres dans la cavité coelomique.

La présence d'abondants récepteurs lectiniques a été mise à profit pour séparer par des agglutinations différentielles deux populations de coelomocytes. Cette technique a été utilisée dans le fractionnement des thymocytes (Reisner et al., 1976; Reisner et Sharon, 1980; Poretz et al., 1986) et dans la séparation des mononucléaires chez l'homme (Gothelf et al., 1986) par des agglutinations différentielles et chromatographie d'affinité. Chez les Invertébrés, l'utilisation de plusieurs lectines a permis de séparer, chez Asterias rubens, deux populations cellulaires dans l'organe axial (Redziniak et al., 1978) ; de même une séparation des hémocytes a été obtenue par Cheng et al. (1980) chez les Lamellibranches.

Dans le cas de notre matériel, grâce à cette méthode les granulocytes II ont été agglutinés par la SBA et PNA. Toutefois la sélectivité est meilleure en utilisant la PNA. Cette situation résulte vraisemblablement du fait que la PNA ne présente pas d'intéraction avec N-acétyl-galactosamine (Gal-Nac). Durant nos tentatives de séparation cellulaire nous ne sommes pas arrivés à agglutiner la totalité des granulocytes II, ceci résulte vraisemblablement du temps d'incubation très court avec la lectine (5 min), cette brièveté étant nécessaire pour des agrégats homogènes.

Les lectines UEAl et AAA provoquent essentiellement l'agglutination des granulocytes III qui présentent d'abondants résidus fucose.

Les granulocytes I n'ont pas été séparés car aucune des lectines testées ne s'est avérée spécifique des récepteurs de cette catégorie cellulaire.

Les cellules obtenues après dissociation des agrégats avec des sucres spécifiques sont apparues viables (85 à 95 %). Ces pourcentages sont comparables à ceux obtenus chez les Insectes (Mead et al., 1986) et chez les Crustacés (Söderhäll et Smith, 1983) après séparation des hémocytes sur un gradient de Percoll. Ceci permet d'envisager le comportement physiologique de lots homogènes des cellules par production en masse des agrégats cellulaires.

CHAPITRE IV

CYTOPHYSIOLOGIE DES GRANULOCYTES

ETUDE DE LA DEGRANULATION

CYTOPHYSIOLOGIE DES GRANULOCYTES

ETUDE DE LA DEGRANULATION

Introduction

La dégranulation est une réaction caractéristique. Elle consiste en un rejet de matériel cytoplasmique lors d'une excitation, soit par des molécules d'origine bactérienne ou parasitaire, soit lors d'intoxication par diverses substances tels les métaux lourds.

Cette fonction a été montrée dans plusieurs groupes de Vertébrés (Wright, 1972 ; Wright et al. 1978 ; Wright et Gallin 1979 ; Elferink, 1979, 1986 ; Slutsky et al., 1987 ; Rofolovitch et al., 1987) et d'Invertébrés (Cheng et al., 1977 . Foley et Cheng, 1977 ; Cheng, 1977 ; Armstrong et Rickles, 1982 ; Mohandas et al., 1985 ; Johansson et Söderhäll, 1985 ; Söderhäll et al., 1986).

Chez les Annélides Polychètes aucune étude sur ce processus n'avait été effectuée jusqu'à ce jour. Nous avons recherché quels étaient les types cellulaires de Nereis diversicolor impliqués dans cette réaction.

Pour réaliser cette étude nous avons choisi des agents stimulants déjà testés chez plusieurs espèces d'Invertébrés.

L'ionophore A23187, grâce à sa fonction de transporteur de cations divalents (Ca^{++}, Mg^{++}) sert de navette échangeuse d'ions et transporte deux H^{+} hors de la cellule pour chaque ion divalent qu'il introduit, ainsi la membrane n'est pas dépolarisée. Quand des cellules vivantes sont exposées à A23187, Ca^{++} pénètre rapidement dans le cytosol et provoque la dégranulation.

Le lipopolysaccharide (LPS) est une toxine extraite d'E. coli. Lorsque les cellules sont incubées en présence du LPS, il se produit une réaction cellulaire qui aboutit à la dégranulation. Le mécanisme par lequel le LPS provoque cette réaction est mal connu ; on sait toutefois que la réaction s'effectue par l'intermédiaire des récepteurs membranaires. Une préincubation du LPS avec de la polymyxine B (antibiotique) inhibe son action par blocage des sites de fixation (Söderhäll et al., 1986).

Des tentatives de dégranulations ont été également effectuées en utilisant la laminarine, ou β 1-3 glucan, extraite des laminaires. Chez les Crustacés et les Insectes il a été montré que cette molécule provoque in vitro la dégranulation (Söderhall, 1981 ; Söderhäll et Smith, 1983 ; Johansson et Söderhäll, 1985 ; Ashida et al., 1983 ; Leonard et al., 1985a).

Chez Nereis diversicolor des travaux effectués dans le laboratoire (Dhainaut-Courtois et al., 1987) ont montré la participation des coelomocytes à la détoxication des vers vis-à-vis du cadmium. Ces résultats nous ont conduit à rechercher si ce métal était capable de provoquer une réaction des coelomocytes.

Les tests de dégranulation ont été effectués soit sur des étalements cellulaires sur lame, soit sur des cellules en suspension dans des tubes à hémolyse.

Deux objectifs ont été poursuivis au cours de cette étude :

- préciser en fonction des différents agents utilisés les types cellulaires effecteurs. Cette étude a été effectuée à la fois en microscopie photonique et électronique ;
- identifier dans la mesure de nos moyens la nature des substances relarguées par les cellules au cours des réactions de dégranulation. Nous avons fait appel pour cela aux techniques d'analyse électrophorétique.

A - Etude cytologique

1. Action de l'ionophore A23187 et du Calcium

Dans le but de mettre en évidence une activité dégranulante au niveau des coelomocytes sous l'action de A23187 et du Calcium; des essais ont été faits sur des cellules étalées ou en suspension (voir matériel et méthodes) en testant différentes concentrations en ionophore et en Ca^{++}. Les temps d'incubation ont varié entre 10 et 60 minutes à 22°C ; les observations sont faites au microscope interférentiel.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau V.

Tableau V - Action de l'ionophore A23187 et du calcium sur les cellules étalées (30 minutes d'incubation à 22°C). Moyennes et ES basés sur 3 séries expérimentales.

Traitement	% de dégranulation
10 µM A23187 + 10 mM CaCl2	96 ± 0,77
5 µM A23187 + 5 mM CaCl2	50,85 ± 4,53
10 µM A23187 + 1 mM CaCl2	13,87 ± 3,4
5 µM A23187 + 0 mM CaCl2	4,87 ± 3,3
CaCl2 5 mM	4,40 ± 2,45
CaCl2 0,45 mM	2,69 ± 0,39

Les résultats indiquent que le mélange A23187 + Ca^{++} provoque in vitro la dégranulation des coelomocytes jusqu'à des concentrations de 5 µM en ionophore et de 1 mM en Ca^{++}. Il faut noter que l'ionophore utilisé à des concentrations supérieures à 10 µM provoque des lyses cellulaires.

Après traitement avec 10 µM de A23187 et 10 mM de $CaCl_2$, l'étude de la viabilité cellulaire s'avère être de l'ordre de 50 %. L'examen cytologique alors montre de légères distorsions des structures cellulaires notamment des mitochondries.

Après traitement des cellules avec 5 µM de A23187 et 5 mM de $CaCl_2$, 95 % de cellules restent viables (test du bleu trypan). On constate toutefois dans ce cas une baisse du nombre des cellules dégranulées (50 %).

L'ionophore ou Ca^{++} seul ne provoque pas de dégranulation. Les 4 % des cellules dégranulées après utilisation du Ca^{++} ou les 2 % avec le NaCl semblent résulter d'un simple effet de contact avec le substrat.

Ces données préliminaires étant acquises, nous avons utilisé en routine dans la suite de notre travail les concentrations de 5 µM de A23187 et 5 mM de $CaCl_2$.

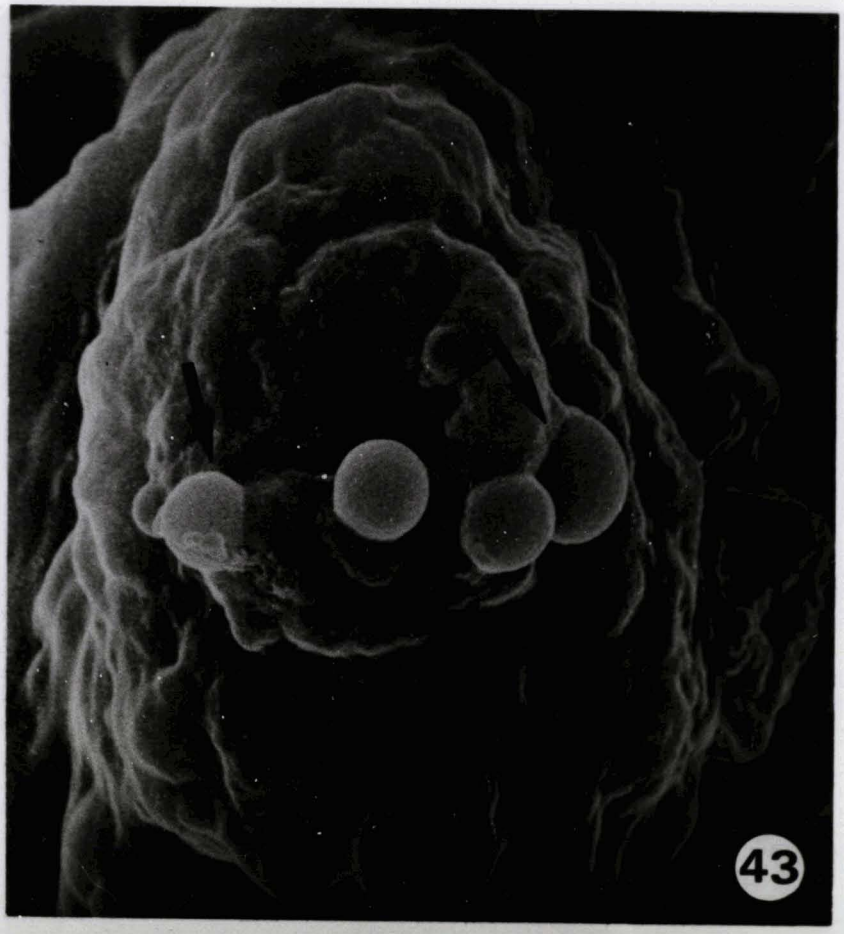
L'examen cytologique des coelomocytes traités par ces concentrations en ionophore a été effectué en microscopie électronique. Au niveau des granulocytes III, un relargage de l'ensemble des granules a été observé au bout de 30 mn d'incubation à 22°C (fig. 50) sans qu'il y ait lyse de la membrane cellulaire. Ce relargage des granules a également été suivi en microscopie à balayage (fig. 46), on constate que les granules rejetés à l'extérieur de la cellule gardent leur intégrité (fig. 47). Ce n'est que dans un second temps que le contenu des granules est relaché dans le milieu.

Les granulocytes I sous l'action de l'ionophore ne dégranulent que partiellement d'après les renseignements fournis par l'examen cytologique au microscope électronique à transmission (fig. 48). Cette dégranulation concerne essentiellement les plus gros granulocytes (fig. 45) qui représentent la plus forte densité électronique. Le suivi de la réaction en balayage a révélé

Fig. 43 - Vue au SEM d'un granulocyte I préalablement incubé en présence de l'ionophore-calcium. On observe une expulsion des granules à travers la membrane au bout de 5 à 10 mn d'incubation à 22°C (flèches). (X 10400)

Fig. 44 - Vue des cellules en pleine dégranulation au bout de 45 minutes d'incubation avec du PLS. On note la présence d'abondants granules expulsés dans le milieu extérieur (flèches). (X 1000)

Fig. 45 - Microscopie électronique à balayage des produits de dégranulation. Les granules (G) rejetés dans le milieu gardent pendant un moment leur forme initiale. (X 8800)



BU LILLE

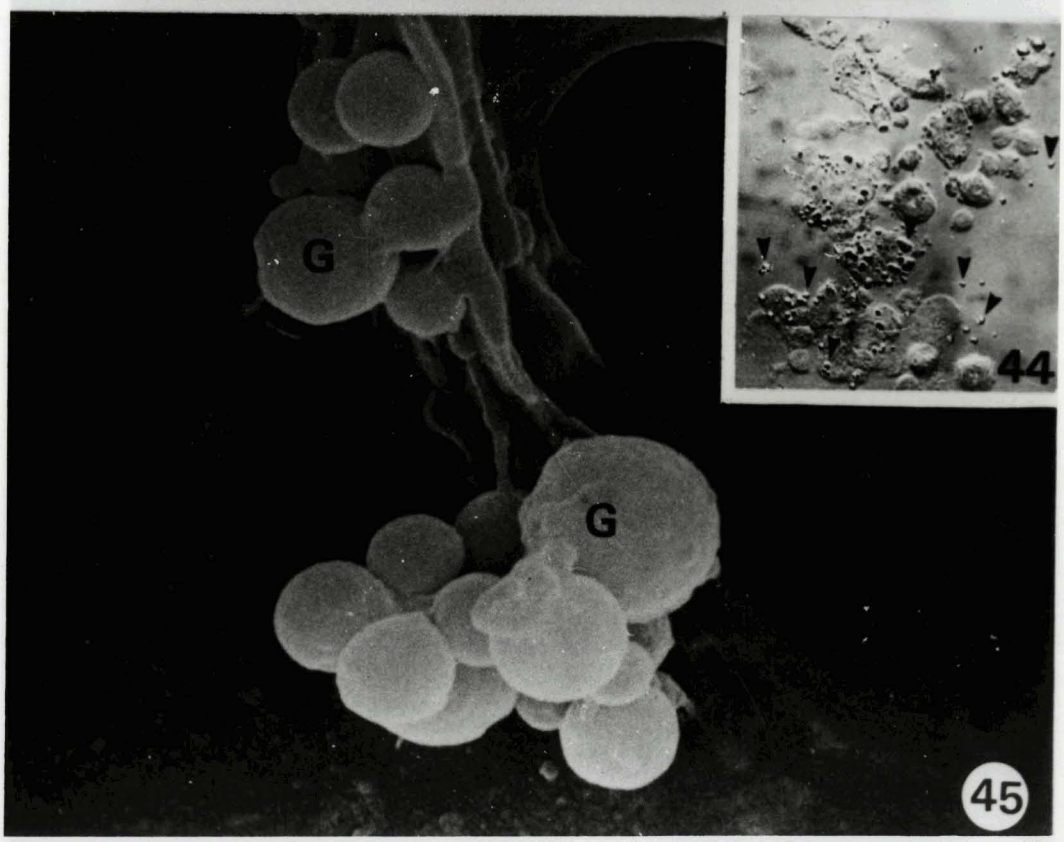
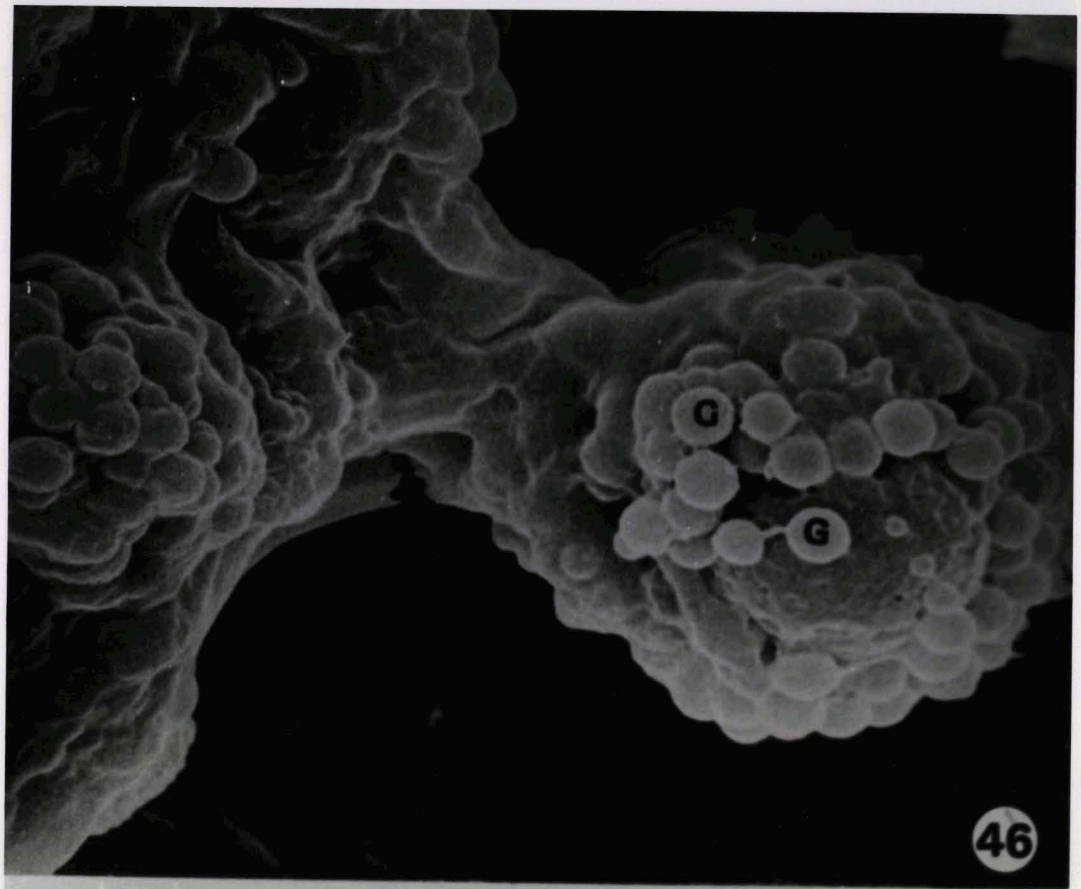


Fig. 46 - Observation au SEM des granulocytes III en cours de dégranulation sous l'action de l'ionophore-calcium in vitro. On note la présence de nombreux granules (G) en plein rejet au bout de 5 à 10 mn d'incubation. (X8000)

Fig. 47 - Produits de dégranulation des granulocytes III qui gardent leur intégrité pendant un certain temps. (X 18000)



BU
LILLE

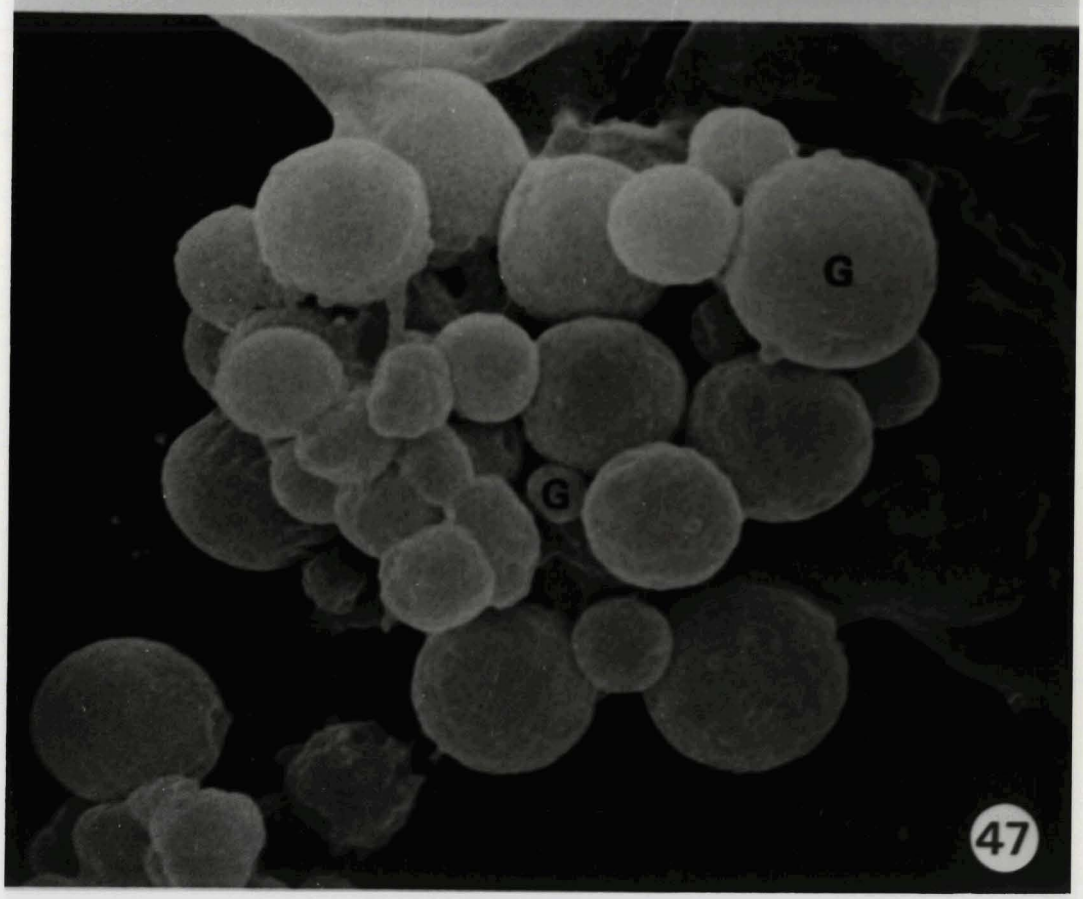
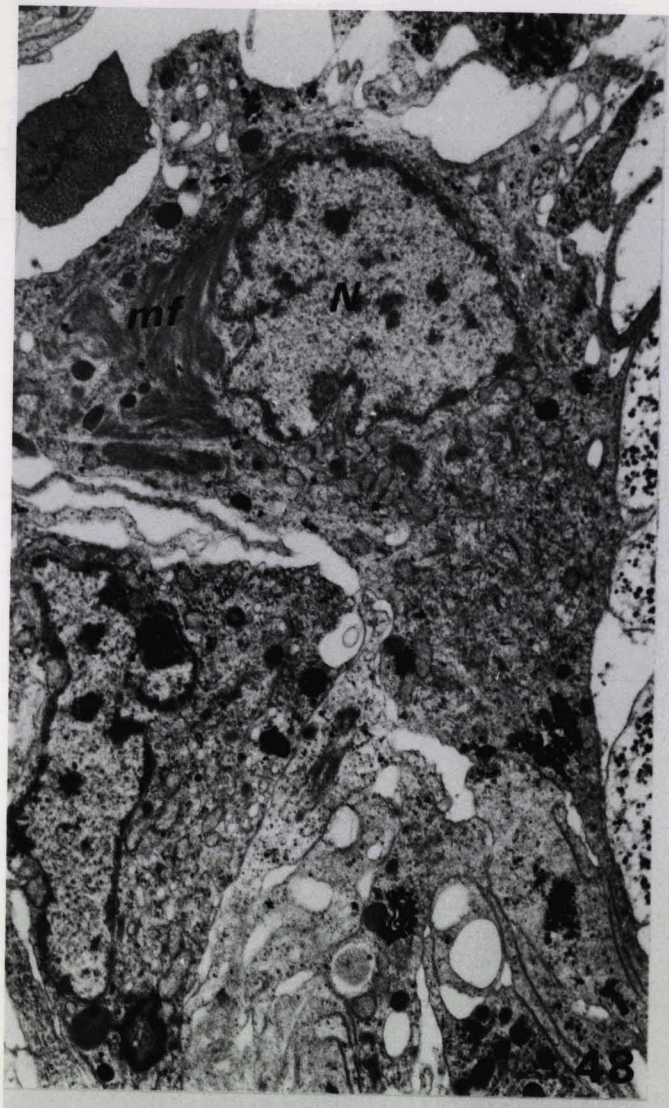


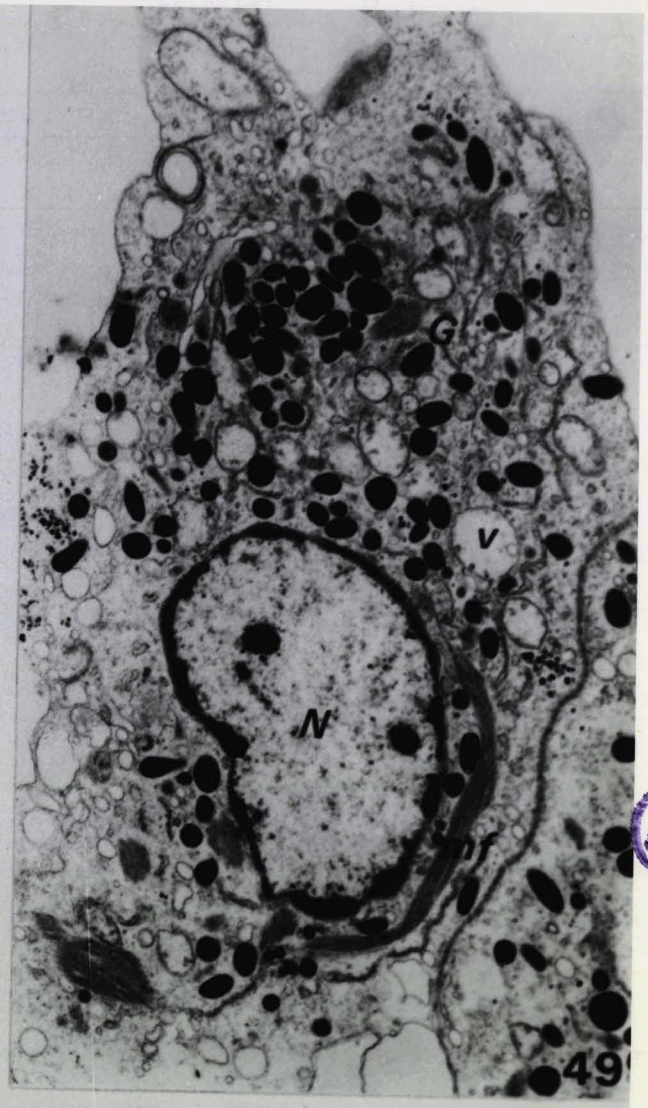
Fig. 48 - Granulocyte I ayant expulsé la plus grande partie de ses granules sous l'action de l'ionophore-calcium pendant 45 minutes à 22°C. en comparaison avec la cellule témoin (fig. 49), dans le cytoplasme il ne reste que quelques petits granules moins denses et des microfilaments (mf). N : noyau. (X 11800)

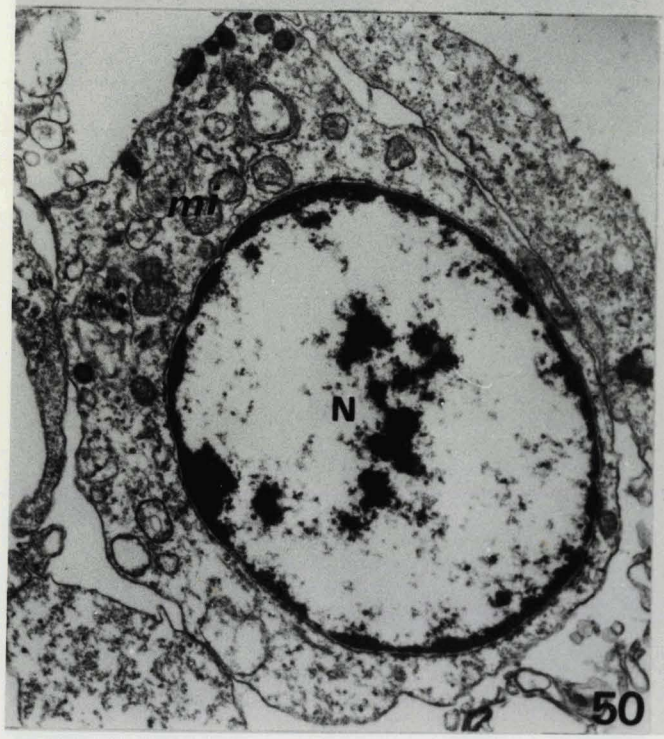
Fig. 49 - Ultrastructure d'un granulocyte I témoin non incubé avec l'ionophore-calcium. Notons l'abondance des granules denses. G : mf : microfilaments ; N : noyau ; v : vacuole. (X

Fig. 50 - Granulocyte III dégranulé sous l'effet de l'ionophore-calcium. On observe un cytoplasme dépourvu de granules en comparaison avec la fig. 51. mi : mitochondrie ; N : noyau. (X 15000)

Fig. 51 - Granulocyte III témoin. le cytoplasme renferme de nombreux granules (G). N : noyau. (X 15000)







BU
MLE

que le rejet des granules est identique à celui observé chez les granulocytes III (fig. 43). Toutefois dans le cas des granulocytes I le relargage ne concerne que très peu de granules. Ceux-ci une fois rejetés dans le milieu extérieur gardent leur forme et leur taille initiales (fig 45).

Les granulocytes II et les éléocytes semblent insensibles à l'action couplée de l'ionophore A23187 et du calcium. La comparaison de cellules traitées par rapport à des cellules témoins (figs 49, 51) montre bien l'action de l'ionophore et du calcium sur les coelomocytes de Nereis diversicolor. Il faut noter enfin que le DMSO, solvant utilisé pour l'ionophore n'influence pas la dégranulation, ceci a été également signalé chez Limulus polyphemus par Armstrong et Rickles (1982).

2. **Action du LPS (E. coli)**

Cette étude a été faite aussi bien sur des cellules étalées que sur des cellules en suspension. L'examen cytologique des coelomocytes traités avec 100 µg/ml de LPS a révélé, au bout de 45 minutes, que les granulocytes I et III sont sensibles à l'action du LPS surtout quand ils sont étalés. Les granulocytes II semblent peu sensibles.

L'examen des coupes a montré une dégranulation totale des granulocytes III et une dégranulation partielle des granulocytes I, les granules relargués sont essentiellement les gros granules. Au niveau des granulocytes III, seul l'examen au microscope interférentiel permet d'observer des dégranulations (fig. 44). En microscopie électronique par contre les observations n'ont pas permis de distinguer les cellules traitées des non traitées. L'abondance des granules dans ce type de cellules, joint au fait que la dégranulation n'est que partielle, explique sans doute cette situation.

Sur un ensemble de 200 cellules, le comptage a révélé qu'au bout de 45 minutes 83 % de cellules dégranulent en présence de 100 µg/ml de LPS. Par contre si le lipopolysaccharide (LPS) est traité préalablement par la polymyxine B (250 µg/ml pendant 30 mn à 22°C) et mis dans un deuxième temps en contact avec les cellules on constate que seuls 5,6 % des cellules dégranulent au bout de 45 minutes. Ceci suggère une saturation des sites de fixation du LPS par la polymyxine B.

3. **Action de la laminarine ou β 1-3 glucan**

Le traitement des cellules in vitro avec la laminarine à 0,1 mg/ml dans l'eau de mer artificielle n'a révélé après examen cytologique au microscope interférentiel qu'une faible réaction visible au niveau des granulocytes I et III.

4. Action du Cadmium (Cd) sur les coelomocytes de Nereis diversicolor

La technique utilisée a été la même que celle employée pour le LPS ou l'ionophore. Le métal est dissous dans de l'eau de mer stérile à 50 ppm soit 136 mg/l. Sur des étalements cellulaires réalisés au préalable, on dépose 100 µl de la solution du métal. Après 30 minutes d'incubation à 22°C, l'examen cytologique est effectué au microscope interférentiel. Les observations montrent que la dégranulation atteint essentiellement les granulocytes I. Les granulocytes II et III et les éléocytes ne semblent pas dégranuler sous l'action du cadmium.

L'examen des coupes en microscopie électronique a confirmé que la dégranulation se produit au niveau des seuls granulocytes I. La dégranulation dans ce cas est comparable à celle obtenue avec l'ionophore à savoir le rejet des granules dans leur intégrité.

De cette étude il découle que chez les Néréidiens toutes les catégories de coelomocytes ne sont pas intéressées de façon identique par les processus de dégranulation. D'autre part, comme le résume le tableau VI, pour une catégorie déterminée de granulocytes, la réaction est fonction de l'inducteur utilisé.

Tableau VI - Réactions des différentes catégories de coelomocytes en fonction de divers agents de dégranulation.

Traitement	Temps (mn)	G I	G II	G III	Eléocytes
A23187 + CaCl2 (5 µM) (5 mM)	30	±	-	+	-
LPS (100µg/ml)	45-60	±	±	+	-
LPS + Polymyxine B (100 µg/ml) (250µg/ml)	45-60	-	-	-	-
Laminarine (0,1 mg/ml)	60	±	-	±	-
Cadmium (Cd) (50 ppm ou 136 mg/ml)	60	±	-	-	-
Eau de mer artificielle	60	-	-	-	-

Signification des signes : + dégranulation totale ; ± dégranulation partielle; - absence de dégranulation.

5. Dégranulation in vivo après injection de bactéries

Cette étude a été effectuée sur des coelomocytes provenant de vers immunisés par des injections de bactéries dans le coelome 24 heures avant.

Afin d'éviter une dégranulation spontanée des cellules, les produits de ponctions ont été déposés aussitôt dans le fixateur puis traités pour l'observation en microscopie électronique.

L'examen cytologique a révélé que 24 heures après l'injection des bactéries, il se produit une activation des granulocytes qui se traduit à la fois par une dégranulation des granulocytes I (fig. 52) et par celle de certains granulocytes III (fig. 54). Ces derniers rejettent dans le milieu la totalité de leurs granules. Des cellules provenant des vers non traités servent de témoins (fig. 53). Ces résultats rejoignent ceux obtenus in vitro sur les granulocytes I et III traités avec des agents tels l'ionophore-calcium ou le LPS. D'autre part il est à signaler que les granulocytes II et certains granulocytes III non dégranulés présentent dans leurs phagosomes des bactéries. Ces dernières présentent des aspects caractéristiques de dégradation et de digestion.

6. Effets des lectines sur le processus de dégranulation

Il a été montré dans le chapitre III que les lectines se fixent sur des récepteurs spécifiques de chaque catégorie de granulocytes. L'action de certains facteurs de dégranulation tel que le LPS s'exerçant par l'intermédiaire des récepteurs membranaires (Johansson et Söderhall, 1985), il était intéressant de rechercher si une modification éventuelle des récepteurs par couplage avec la lectine modifierait le processus de dégranulation.

Cette étude a été réalisée in vitro sur des granulocytes étalés qui ont été traités avec trois des lectines utilisées dans le chapitre III (ConA, PNA et UEA1), lesquelles se lient sur les récepteurs des granulocytes comme le décrit le chapitre III.

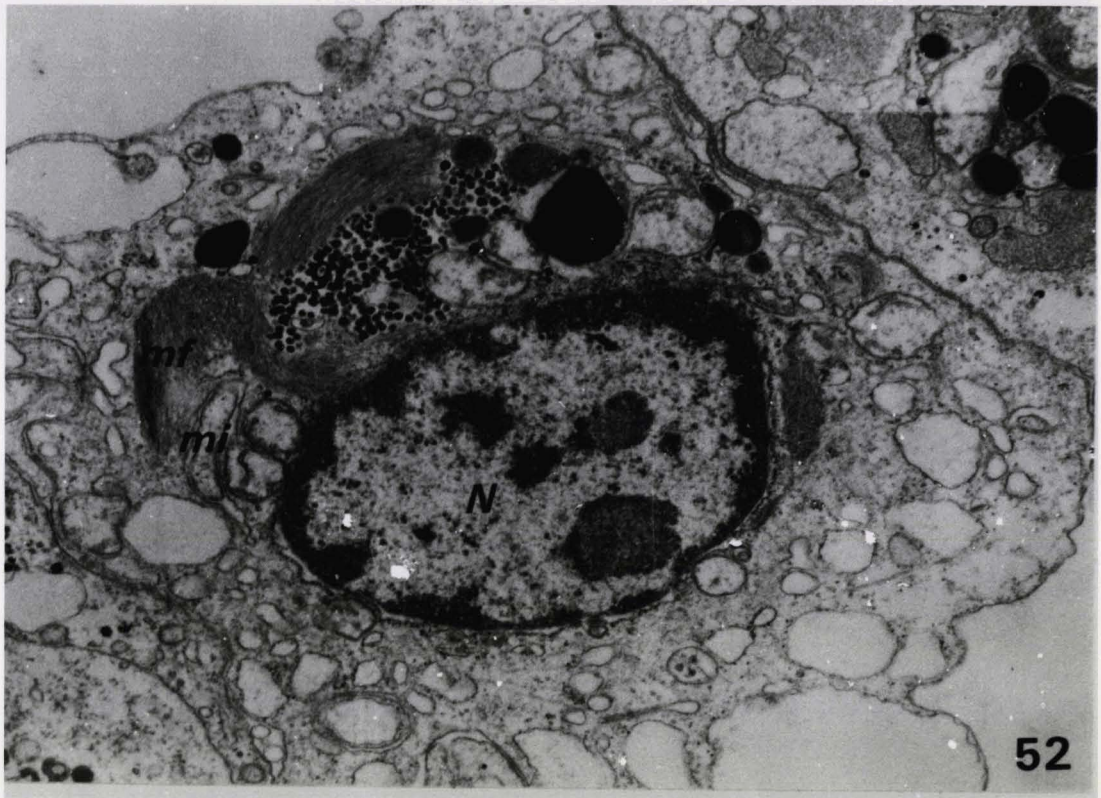
Dans cette étude les lectines ont été dissoutes à la concentration de 250 µg/ml dans de l'eau de mer. Les substances dégranulantes employées ont été le LPS à 100 µg/ml et le cadmium à 25 ppm.

Une préincubation des cellules avec la lectine est faite pendant 20 minutes à 22°C, le temps que la lectine se lie au résidu spécifique. Les cellules sont ensuite traitées avec l'agent dégranulant. Après 30 minutes d'incubation à 22°C, les cellules sont obervées sur un microscope interférentiel. Les traitements témoins sont constitués d'une part par des cellules

Fig. 52 - Granulocyte I ayant perdu la majorité de ses granules après une injection d'Escherichia coli dans le coelome. La durée de l'incubation est de 24 heures. Le cytoplasme ne renferme plus que quelques rares petits granules, de nombreuses petites vacuoles, du glycogène (gl) et des microfilaments (mf). mi : mitochondrie ; N : noyau. (X 17000) (Comparer avec la figure 49).

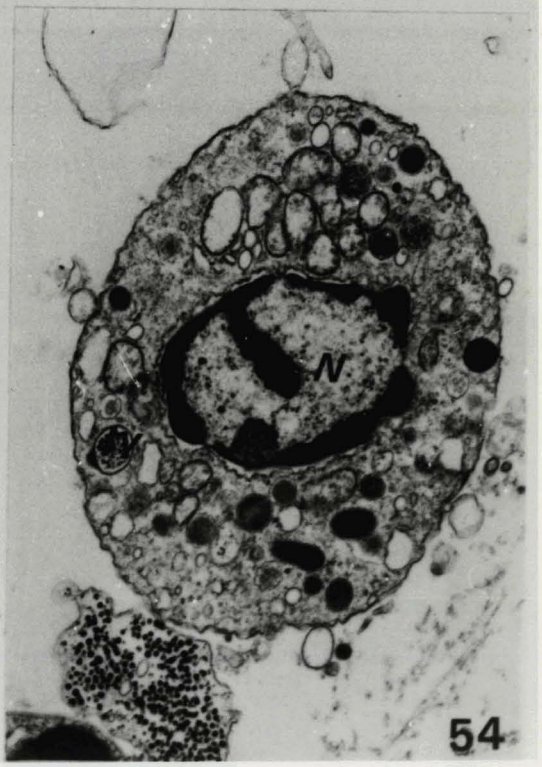
Fig. 53 - Granulocyte III témoin présentant un cytoplasme riche en granules et un volumineux noyau central (N). (X 12500)

Fig. 54 - Granulocyte III ayant rejeté un nombre important de granules sous l'effet d'une injection d'E. coli dans le coelome. On note la présence de nombreux lysosomes (ly) (en comparaison avec la figure 53). N : noyau. (X 12500)



52

53



54

BU
LILLE

traitées avec la lectine seule et d'autre part avec les substances dégranulantes dont nous connaissons l'effet sur les granulocytes.

a. Action des lectines seules

Les cellules traitées uniquement avec la ConA à 250 µg/ml ont présenté après 20 minutes d'incubation une réaction qui se traduit par la dégranulation des granulocytes I et de certains granulocytes III dans les proportions de 40 % de granulocytes I et 10 % de granulocytes III ; les granulocytes II par contre ne sont pas du tout dégranulés (tableau VII). Les incubations des cellules avec la PNA ou l'UEAl n'ont provoqué aucune réaction, que ce soit au niveau des granulocytes I, II ou III.

b. Action combinée des lectines puis des agents dégranulants

Lorsque les cellules sont prétraitées avec les lectines UEAl ou PNA puis mises en présence du cadmium ou du LPS, on observe une forte baisse du nombre de cellules qui dégranulent. L'inhibition est de l'ordre de 80-90 % dans le cas du cadmium, totale dans le cas du LPS, tous les sites de fixation semblent occupés par la lectine (tableau VII).

Par contre, les cellules traitées uniquement avec du LPS ou du cadmium déchargent dans le milieu extracellulaire leurs granules dans les proportions respectives de 58% et 90 %.

De ces résultats nous pouvons dire que la dégranulation sous l'action du LPS s'effectue par le biais des récepteurs membranaires tandis qu'en ce qui concerne le cadmium, la chute du taux de dégranulation est plus difficile à expliquer (voir discussion).

Tableau VII - Effets des lectines et des agents stimulants sur le processus de dégranulation des sous-populations de granulocytes.

Traitement	G I	G II	G III
ConA	++	-	+
UEAl	-	-	-
PNA	-	-	-
LPS	++	+	++
Cd	+++	-	-
ConA + LPS	++	-	++
ConA + Cd	+++	-	+
UEAl + LPS	±	-	-
UEAl + Cd	+	-	-
PNA + LPS	-	-	-
PNA + Cd	+	-	-

Signification des signes : +++ > 80 % de dégranulation ; ++ ≈ 40 % ; ± ≤ 10 %; - = 0 %.

B - Etudes biochimiques des milieux de dégranulation

Dans cette partie du travail, nous avons effectué l'analyse des protéines des milieux de dégranulation après action des différents agents inducteurs.

Nous avons ensuite comparé les données obtenues avec la composition en protéines solubles des coelomocytes (sans dégranulation et après dégranulation) et du liquide coelomique de vers témoins.

1. Analyses électrophorétiques des milieux de dégranulation

Les protéines issues des dégranulations provoquées par l'action de l'ionophore A23187 et du Ca^{++} du LPS et du cadmium, ont été analysées en électrophorèse en gel de polyacrylamide 5-25 % contenant du SDS pendant 16 heures. Avant le dépôt des échantillons, les protéines ont été précipitées dans du TCA à 100 % à 4°C puis lavées à l'eau distillée et reprises dans du tampon Tris/HCl pH 6,8.

Après coloration du gel au bleu de Coomassie et décoloration dans l'acide acétique, nous avons constaté que l'analyse révèle des résultats différents selon l'agent dégranulant.

a. Analyse des protéines relarguées par action de l'ionophore A23187 et du calcium

L'action couplée de l'ionophore A23187 et des ions calcium provoque une activation des coelomocytes dont l'intensité varie selon que les cellules sont en suspension ou étalées. Cette activation se traduit par un relargage des granules renfermant des protéines de 10 kDa, 14 kDa, 18 kDa, 43 kDa, 45-50 kDa, 67 kDa et quelques protéines de très hauts poids moléculaires dans le cas des cellules en suspension alors que les cellules étalées ne libèrent que très peu de protéines, 10 kDa, 43 kDa, 45 kDa et 94 kDa. Aucune protéine en dessous de 10 kDa n'a été observée (fig. 55b).

b. Analyse protéique des contenus libérés sous l'action du LPS

Le profil d'analyse des protéines issues après action du LPS sur des coelomocytes étalés est légèrement semblable à celui dû à l'action de l'ionophore-calcium sur des cellules en suspension (fig. 57b). La seule différence réside au niveau de la protéine de 94 kDa présente dans ce milieu et qu'on ne retrouve que dans le milieu dû à l'ionophore sur des cellules étalées (fig. 55c).

c. Analyse du milieu dû à l'action du cadmium

Lorsque l'incubation des cellules est faite en présence du cadmium, les coelomocytes réagissent en libérant dans le milieu extracellulaire des protéines de 10 kDa, 14,4 kDa, 18 kDa, 30 kDa, 43 kDa, 45 kDa, 67 kDa et des protéines de hauts poids moléculaires (fig. 57a) qui sont très abondantes dans ce milieu.

Des différences avec les autres milieux existent au niveau des protéines de 30 kDa et 43 kDa.

d. Analyse des milieux d'encapsulation

Lorsque les cellules sont mises en incubation dans du milieu de culture simplifié en présence des billes de latex à 15°C, celles-ci réagissent en isolant les billes dans une pseudoenveloppe celulaire. Cette réaction des cellules est accompagnée d'une libération des substances qui ont été analysées par électrophorèse (fig. 64). De cette analyse nous constatons le relargage de certaines protéines par les granulocytes au cours du processus de dégranulation, c'est le cas des protéines de 14 à 20 kDa, de 43 kDa et de 94 kDa.

En conclusion nous pouvons dire que toutes les substances que nous avons utilisées ont pour point commun une activation des granulocytes qui se traduit par un rejet des protéines dont la nature reste à définir.

Fig. 55 - Analyse électrophorétique obtenu en gel de polyacrylamide-SDS.
(a) Fraction de granulocytes préalablement dégranulés sous l'action de l'ionophore-calcium.
(b) Composition protéique des produits extrudés à partir de cellules en suspension sous l'action de l'ionophore-calcium.
(c) Composition protéique des produits extrudés sous l'action de l'ionophore-calcium par des cellules étalées;
Noter la libération de la protéine de 94 kDa par les cellules étalées et celle de 14,4 kDa par les cellules en suspension.

Fig. 56 - Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence du SDS.
(a) Protéines de poids moléculaires connus.
(b) Fractions solubles des éléocytes.
(c) Fractions solubles de granulocytes non dégranulés.
Une comparaison entre les deux types cellulaires est difficile par suite de l'abondance de bandes protéiques. On constate toutefois au niveau des éléocytes (b) deux bandes de poids moléculaires correspondant vraisemblablement à la vitellogénine.
Deux différences peuvent être signalées :
- présence de deux bandes de hauts poids moléculaires (*) dans (b),
- présence de la bande 45 kFa dans les granulocytes (*).

*fig.*55

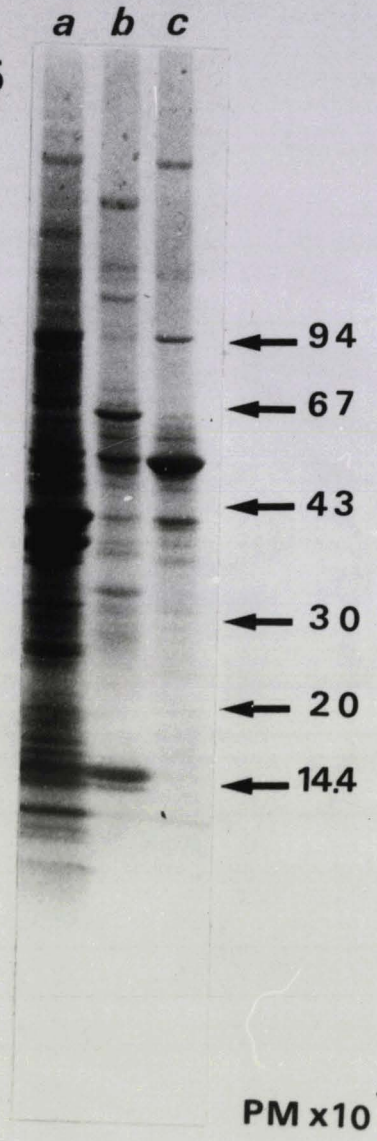
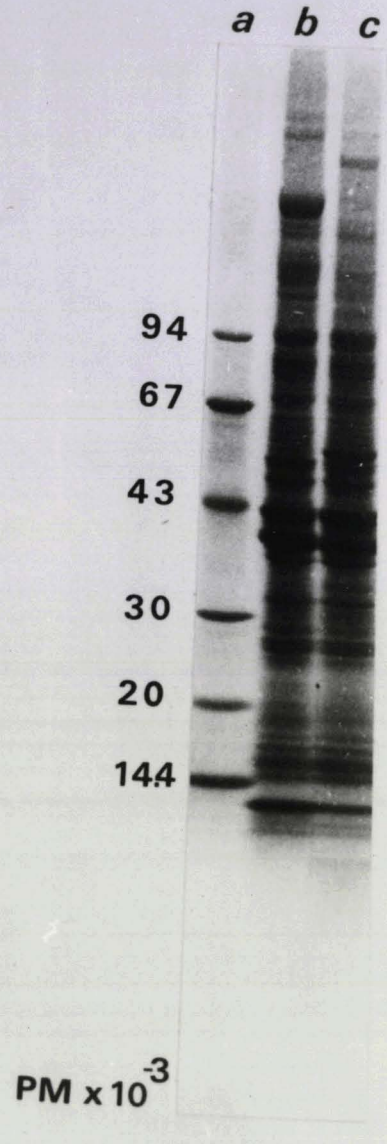


*fig.*56



BU LILLE

2. Analyse électrophorétique des protéines solubles des coelomocytes

a. Analyse des protéines des éléocytes

L'analyse des protéines solubles des éléocytes a donné un profil électrophorétique caractérisé par un nombre très élevé de bandes protéiques parmi lesquelles on distingue celles de 10 kDa, 14,4 kDa, 36 kDa, 43 kDa, 67 kDa, 94 kDa et des protéines de plus de 100 kDa (fig. 56b).

b. Analyse des protéines solubles des granulocytes non dégranulés

Un profil identique à celui des éléocytes a été obtenu à partir des protéines solubles des granulocytes à savoir une abondance des protéines de 10 kDa, 14,4 kDa, 18 kDa, 36 kDa, 43 kDa, 45 kDa, 67 kDa, 94 kDa et des protéines de hauts poids moléculaires, la seule différence réside au niveau de la protéine de 45 kDa présente essentiellement dans les granulocytes. Dans la plupart des cas toutes ces protéines s'observent dans les milieux de dégranulation sauf pour les protéines de 10 kDa et 1des protéines dont le poids moléculaire se situe entre 20 kDa et 36 kDa (fig. 56c).

c. Analyse des protéines solubles des cellules après dégranulation

La composition en protéines solubles des cellules dégranulées reste semblable à celle des cellules non dégranulées (fig. 55a). Ceci pourrait indiquer que seulement une partie assez faible du matériel des coelomocytes est libérée au cours de la dégranulation.

Le dosage des protéines effectué en BIO-RAD a montré qu'au cours de la dégranulation, 30 % des protéines solubles sont relarguées dans le milieu extracellulaire.

3. Analyse du liquide coelomique

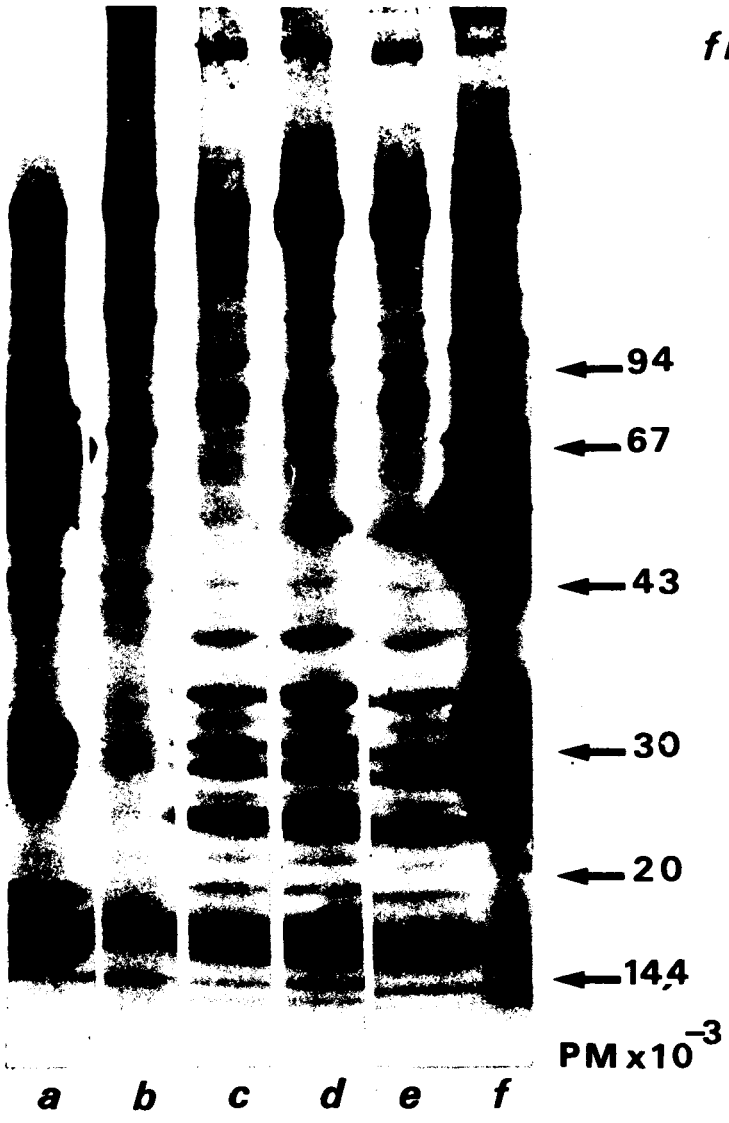
a. Vers normaux

L'analyse électrophorétique du liquide coelomique des vers non immunisés ne révèle que très peu de bandes protéiques par rapport aux protéines solubles des coelomocytes. Parmi les protéines présentes se distinguent celles de 18 kDa, 30 kDa, 63 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 67 kDa, 94 kDa et des protéines de poids moléculaires supérieurs à 100 kDa (fig. 57c).

Fig. 57 - Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.
(a) Milieu de dégranulation provoqué par l'action du cadmium à 55 ppm.
(b) Milieu de dégranulation provoqué par le LPS.
Dans les deux cas on observe nettement la présence d'une bande de 10 kDa ; cette protéine MP II est connue comme pouvant se complexer au cadmium.
(c) liquide coelomique des vers normaux.
(d) liquide coelomique après immunisation des animaux.
(e) liquide coelomique après intoxication par le cadmium.
(f) protéines du même liquide coelomique immunoprécipitées par l'anticorps anti-MP II du lapin.
Notons la présence de la protéine MP II immunoprécipitée.
Les astérisques signalent par rapport au liquide coelomique normal l'importance accrue de certaines bandes protéiques.

Fig. 58 - Electrophorèse bidimentionnelle des protéines solubles des granulocytes. La fraction est analysée dans une première dimension par une électrophorèse en milieu acide pH 4 dans un gel à 12 % d'acrylamide. A partir de la bande biologiquement active (test d'overlay avec parois de Micrococcus lysodeikticus) une deuxième dimension est réalisée en gel de polyacrylamide-SDS. Le lysozyme de Nereis (flèche noire) migre entre 14,4 kDa et 18 kDa par comparaison avec le lysozyme de blanc d'oeuf de poule situé à droite de la figure.

fig. 57



(gel homogène d'acrylamide à 12 % non dénaturant)

fig. 58

b. Vers immunisés par injection de Cd et de LPS

L'intoxication des vers avec le cadmium à la concentration de 55 ppm provoque une activation des systèmes de défense de type humoral qui se traduit par une modification de profil électrophorétique du liquide coelomique (fig. 57e). On observe une abondance des protéines de 18 kDa, 30 kDa et 94 kDa par comparaison avec le liquide coelomique provenant des vers normaux.

Nous avons observé que l'immunisation des vers avec des injections de LPS dans le coelome provoque également une modification de la composition du liquide coelomique. Celle-ci se traduit à la fois par une augmentation du taux de certaines protéines initialement présentes dans le liquide coelomique et l'apparition de nouvelles protéines dans le liquide coelomique (fig. 57d). Ces résultats confirment ceux obtenus in vivo lorsque les cellules sont traitées avec du LPS.

En comparaison avec les milieux de dégranulation on note des ressemblances au niveau des protéines de 10 kDa, 18 kDa et 100 kDa du contenu protéique dû à l'action du LPS et de l'ionophore-calcium et en plus de ces protéines on note la présence de 30 kDa et 67 kDa avec les milieux dus à l'action du cadmium (fig. 55d).

DISCUSSION

Dans ce chapitre notre but a été d'étudier les fonctions de dégranulation in vitro des coelomocytes grâce à des stimulations provoquées par des agents activateurs tels l'ionophore-calcium, le lipopolysaccharide (LPS), la laminarine ou un métal lourd toxique, le cadmium.

Le mode d'action de ces divers agents est très inégalement connu.

L'ionophore-calcium agit comme agent de translocation du calcium. Il intervient grâce à sa propriété d'accroître la perméabilité ionique des membranes sans pour autant provoquer leur dépolarisation. Il procède en transportant deux ions hydrogène hors de la cellule pour chaque cation divalent qu'il introduit. Cette introduction de cations déclenche toute une série de réactions dites de phosphorylation qui consistent à ajouter un groupement phosphate à une protéine qui s'en trouve activée. Cette protéine induit ainsi une décharge des granules dans le milieu extracellulaire (Otto, 1988). Le schéma a été bien illustré par Smolen (1986) dans le modèle d'exocytose chez les neutrophiles de Vertébrés.

L'action du LPS ou de la laminarine s'effectue par l'intermédiaire des protéines situées à la surface de la cellule (récepteurs). L'entrée en contact de la molécule du LPS avec le récepteur stimule une augmentation de la synthè-

se d'AMPc qui induit à son tour la dégranulation. Cette induction peut être inhibée en utilisant des substances qui bloquent la synthèse d'AMPc, c'est le cas de la théophylline qui inhibe la phosphodiestérase et de la prostacycline (PGI_2) qui stimule l'adénylate cyclase (Best et al., 1977).

L'action du cadmium reste plus imprécise. Elle s'effectue probablement par l'intermédiaire des pompes ioniques comme c'est le cas du calcium. Il est connu que le Cd bloque les flux de Ca^{++} intramembranaire (Feltz, 1986) et il a été proposé qu'il pourrait rentrer en compétition avec cet ion.

Chez Nereis la stimulation des coelomocytes par ces différents agents se manifeste par une libération des granules dans le milieu extracellulaire. La réponse à ces divers agents varie selon la nature du stimulus et des types cellulaires impliqués.

L'action de l'ionophore-calcium sur les coelomocytes de Nereis se traduit in vitro par une expulsion de la totalité des granules des granulocytes III, les granulocytes I libèrent seulement une partie de leurs granules, essentiellement ceux de plus grande taille.

L'action du LPS provoque un relargage partiel des granules des granulocytes I et II et une dégranulation totale des granulocytes III. Cette action du LPS sur les granulocytes peut être inhibée par une préincubation du LPS avec la polymyxine B.

L'action de la laminarine déclenche une réaction partielle au niveau des granulocytes I et III, par contre les granulocytes II ne présentent aucune réaction.

Le mode d'action de l'ionophore-calcium a été bien étudié chez les Vertébrés (Wright et Gallin, 1979 ; Smolen, 1986 ; Elferink, 1979, 1986) spécialement chez les neutrophiles chez lesquels l'ionophore provoque la libération des granules secondaires renfermant diverses hydrolases (lysozyme, ß-glucuronidase...).

Chez Limulus polyphemus (Armstrong et Rickles, 1982), une réaction de dégranulation a été observée au niveau des amibocytes in vitro lorsque l'incubation est faite en présence de l'ionophore-calcium ou du LPS. D'après les études réalisées par Mürer et al. (1975), les granules de ces amibocytes renferment du lysozyme et sont vraisemblablement dépourvus de ß-glucuronidase. Chez le Crustacé Pacifastacus lenuisculus (Johansson et Söderhäll, 1985) l'effet du LPS ou de la laminarine sur des hémocytes in vitro induit uniquement la dégranulation par lyse des hémocytes semi-granulaires tandis que les hémocytes granulaires ne sont pas affectés. Par contre sur les mêmes hémocytes, l'effet de l'ionophore-calcium provoque in vitro la dégranulation des semi-granulaires et des granulaires. Nous retrouvons ici comme dans notre travail une réaction différente des types cellulaires selon l'agent stimulant utilisé.

En ce qui concerne le mode d'action du cadmium chez Nereis diversicolor il a été démontré par voie biochimique que le Cd chez des animaux intoxiqués se lie sur une protéine dénommée MP II (Nejmeddine et al., 1987). Cette protéine existe chez les animaux normaux non traités par le cadmium. Sa localisation a pu être effectuée en immunocytochimie en utilisant un anticorps anti-MP II. Cette protéine est localisée dans les granules des granulocytes I (Dhainaut-Courtois et al., 1987b). Par ailleurs, lors des processus d'encapsulation le matériel rejeté par ce type de cellules contient de la protéine MP II comme cela a été clairement démontré par utilisation d'un anticorps monoclonal (Porchet-Henneré et al., 1987). Nous apportons ici la démonstration que la libération de cette protéine peut être provoquée d'une façon directe par l'action du cadmium sur les granulocytes I. Il est d'ailleurs intéressant de constater que des 4 types de cellules coelomiques, les granulocytes I sont les seuls à réagir sous l'action du cadmium.

L'action des lectines sur les processus de dégranulation est particulièrement intéressante à considérer. L'effet varie selon la nature de la lectine utilisée. La ConA tend à provoquer le processus de dégranulation. Cet effet rappelle celui observé chez les mastocytes des Vertébrés (Lawson et al., 1978). Dans ces cellules la ConA se lierait aux récepteurs Fc des immunoglobulines ; dans notre matériel, aucune hypothèse ne peut être envisagée pour l'instant.

Les lectines UEAl et PNA provoquent un blocage complet de l'effet du LPS sur le processus de dégranulation, vraisemblablement en occupant tous les sites de fixation du LPS, ce dernier agissant par l'intermédiaire de récepteurs membranaires (Johansson et Söderhall, 1985).

Les résultats obtenus avec le cadmium sont plus difficiles à interpréter car la présence des récepteurs spécifiques de ce métal est très hypothétique. Aussi il était envisageable que les lectines puissent n'avoir aucun effet sur le processus de dégranulation en présence du cadmium. Les résultats obtenus ont montré une inhibition partielle des granulocytes I lorsque ces cellules sont incubées avec l'UEAl ou la PNA. Ces résultats restent cependant difficiles à interpréter.

En ce qui concerne les modalités de la dégranulation, l'examen cytologique a révélé que les granules libérés in vitro dans le milieu extracellulaire conservent pendant un certain temps leur intégrité morphologique. Des modalités similaires ont été observées chez Mercenaria mercenaria (Mohandas et al., 1985 ; Mohandas et Cheng, 1985) et chez Limulus polyphemus (Armstrong et Rickles, 1982). Lors de l'expulsion, les processus de fusion avec la membrane plasmique restent cependant mal connus. Les techniques de cryofracture pour-

ront certainement contribuer à préciser les processus de fusion membranaire survenant lors du rejet des granules.

On peut se demander également si la persistance des granules cytoplasmiques hors de la cellule n'est pas, dans une certaine mesure, un artefact lié à l'expérimentation in vitro.

In vivo, nous avons suivi la dégranulation provoquée par injection du LPS dans le coelome des vers. Après 24 heures, l'examen cytologique a montré que, par comparaison avec les cellules provenant des animaux non immunisés, les cellules traitées sont dépourvues de granules. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Porchet-Henneré et al. (1987b) par injection de billes de latex. De plus, chez Nereis diversicolor, l'utilisation de l'anticorps anti-MP II a permis de retrouver dans le milieu coelomique, après dégranulation in vivo, les protéines des granulocytes I. Ceci permet de confirmer que le processus de dégranulation in vitro est comparable à celui qui se passe in vivo quoique l'on ignore encore le mécanisme du relargage des granules.

La seconde partie de notre étude a été axée sur le contenu protéique libéré par les cellules au cours de la dégranulation.

In vitro, l'analyse électrophorétique du milieu de culture montre, après dégranulation, l'apparition d'un nombre de bandes protéiques dont l'abondance varie selon la nature du stimulus ; la réaction paraît plus modérée avec l'ionophore-calcium et beaucoup plus forte avec le LPS ou le cadmium, ce qui suggère qu'un taux plus important de protéines serait alors libéré.

L'analyse du liquide coelomique provenant des animaux immunisés avec du LPS ou intoxiqués avec le cadmium a également révélé une augmentation des protéines dans le liquide coelomique. C'est aussi le cas lorsque les cellules sont incubées avec des billes de latex (fig. 64). Dans les homogénats cellulaires, l'analyse de protéines solubles des granulocytes et des éléocytes montre une multiplicité des bandes protéiques dont certaines coïncident avec celles des milieux de dégranulation. Cette abondance des protéines rend difficile l'interprétation, néanmoins la concordance : protéines cellulaires et protéines de dégranulation a pu être établie par l'utilisation d'anticorps au niveau de la protéine 10 kDa fixant le cadmium.

CHAPITRE V

MISE EN EVIDENCE DE PROTEINES A ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE

MISE EN EVIDENCE DE PROTEINES A ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE

Introduction

Chez les Annélides Polychètes les cellules coelomiques responsables des mécanismes de défenses cellulaires semblent être représentées essentiellement par les granulocytes. Ces cellules assurent la fonction phagocytaire (Fitzgerald et Ratcliffe, 1982) de rejet de greffe (Boilly-Marer, 1979) et des réactions d'encapsulation (Porchet-Henneré et al., 1987a ; Porchet-Henneré et M'Béri, 1987).

Il a été également montré que le liquide coelomique contient des substances humorales intervenant dans la défense de l'organisme (Anderson, 1980 ; Parrinelle et Rindone, 1981 ; Dales, 1982 ; Russel et al., 1983).

Chez divers Invertébrés, d'après les données bibliographiques (McKay et Jenkin, 1970 ; Cheng et Rodrick, 1974 ; Cheng et al., 1975, 1977 ; Cheng, 1977 ; Renwrantz et Stahmer, 1983 ; Stein et al., 1986), une synthèse accrue de certaines enzymes lysosomales aurait lieu dans les granulocytes mis en contact in vitro ou in vivo avec des agents stimulants, ces substances sont ensuite évacuées dans le milieu extracellulaire par des dégranulations.

Chez Nereis diversicolor, les granulocytes expulsent in vitro dans le milieu d'incubation des granules sous l'action de certaines substances activatrices. Selon l'analyse électrophorétique des substances relarguées, un grand nombre de protéines sont ainsi libérées.

Ces observations nous ont incités à étudier les propriétés biologiques du liquide coelomique et des homogénats cellulaires des vers normaux et des vers immunisés avec des souches de bactéries ou intoxiqués avec du cadmium. Nous avons également examiné les propriétés des milieux de dégranulation.

A - Activité bactériolytique de type lysozyme.

Les lysozymes sont des protéines basiques de faibles poids moléculaires. Ce sont les bactériolysines les plus répandues dans le règne animal. Elles interviennent en détruisant la liaison β1-4 entre la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique. Cette liaison est très abondante dans les parois des bactéries Gram+.

Chez les Annélides des substances lysozyme-like ont été signalées pour la première fois chez Nephthys hombergii par Jolles et Zuili (1960) puis par Schuber et Messner (1971) chez plusieurs Annélides Oligochètes, Polychètes et Hirudinées.

Chez les Néréidiens, en dehors des substances hémagglutinantes signalées par Russel et al. (1983), aucune étude concernant les substances bactériostatiques ou bactériolytiques n'a été effectuée jusqu'à ce jour.

Chez Nereis diversicolor nous avons recherché des activités assimilables au lysozyme dans le liquide coelomique des vers normaux et immunisés par des injections de bactéries dans le coelome. Nous avons également recherché la présence de lysozyme dans les milieux de dégranulation provoquée par l'ionophore-calcium ou le LPS.

1. Tests utilisés

Pour réaliser cette étude nous avons utilisé deux tests :

- Le test lyso-plate mis au point par Ossermann (1966) qui consiste à couler dans une boîte de Pétri 20 ml d'agarose indubiose A 37 à 1 % contenant les parois sèches de Micrococcus lysodeikticus à 0,5 mg/ml. Sur la gélose solidifiée on dépose des disques pour antibiogramme imbibés de 15 µl de l'échantillon à tester. Après 18 heures d'incubation à 37°C les diamètres des plages de lyses qui apparaissent sur un fond opaque dû aux bactéries sont mesurés. Afin de déterminer la concentration en lysozyme des échantillons, une gamme étalon est effectuée avec du lysozyme de blanc d'oeuf de poule.

- Le test de turbidimétrie (voir matériel et méthodes) a été utilisé pour suivre l'activité de l'enzyme en fonction du temps.

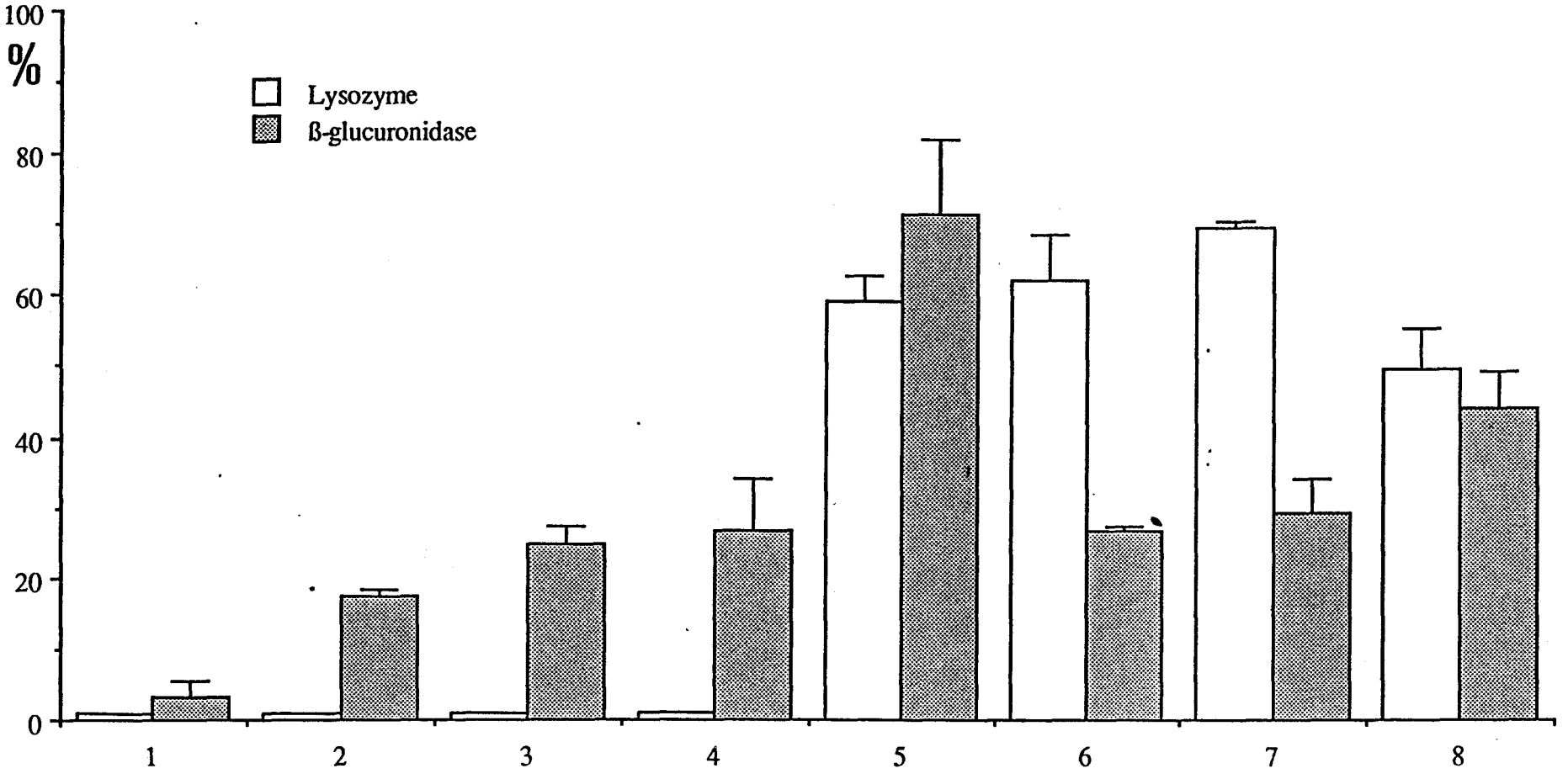
2. Recherche du lysozyme sans immunisation préalable

- Activité du lysozyme dans le liquide coelomique

Les résultats obtenus avec le test lyso-plate montrent que le liquide coelomique d'animaux normaux ne présente aucune activité de type lysozyme décelable par le test (fig. 59).

Fig. 59 - Activité du lysozyme et de la β-glucuronidase dans le liquide coelomique des vers immunisés 24 heures auparavant avec des bactéries tuées. Le test de lysozyme a été effectué sur les parois sèches de Micrococcus lysodeikticus dissous dans l'agarose A37 à 1 %, et le test de la β-glucuronidase en utilisant le p-nitrophényl β-D glucuronide dissous dans le tampon acétate de sodium à pH 4. On note une forte activité du lysozyme lorsque les vers sont immunisés avec les souches E. coli, Micrococcus lysodeikticus, Pseudomonas fluorescens, Acinetobacter et la β-glucuronidase chez les vers immunisés avec E. coli ou Acinetobacter. L'activité du lysozyme est exprimée en % par rapport à 100 µg/ml de lysozyme de blanc d'oeuf de poule et la β-glucuronidase par rapport à la densité optique du paranitrophénol.

Induction d'une Activité de lysozyme et de la ß-glucuronidasedans le liquide coelomique des vers ayant reçu 24 heures avant une injection de bactéries dans le coelome.



1. Témoin
2. Bacillus cereus
3. Microcoque kristinae
4. Pseudomonas aeruginosa
5. E. Coli
6. Microscoccus lysodeikticus
7. Pseudomonas fluorescence
8. Acinetobacter

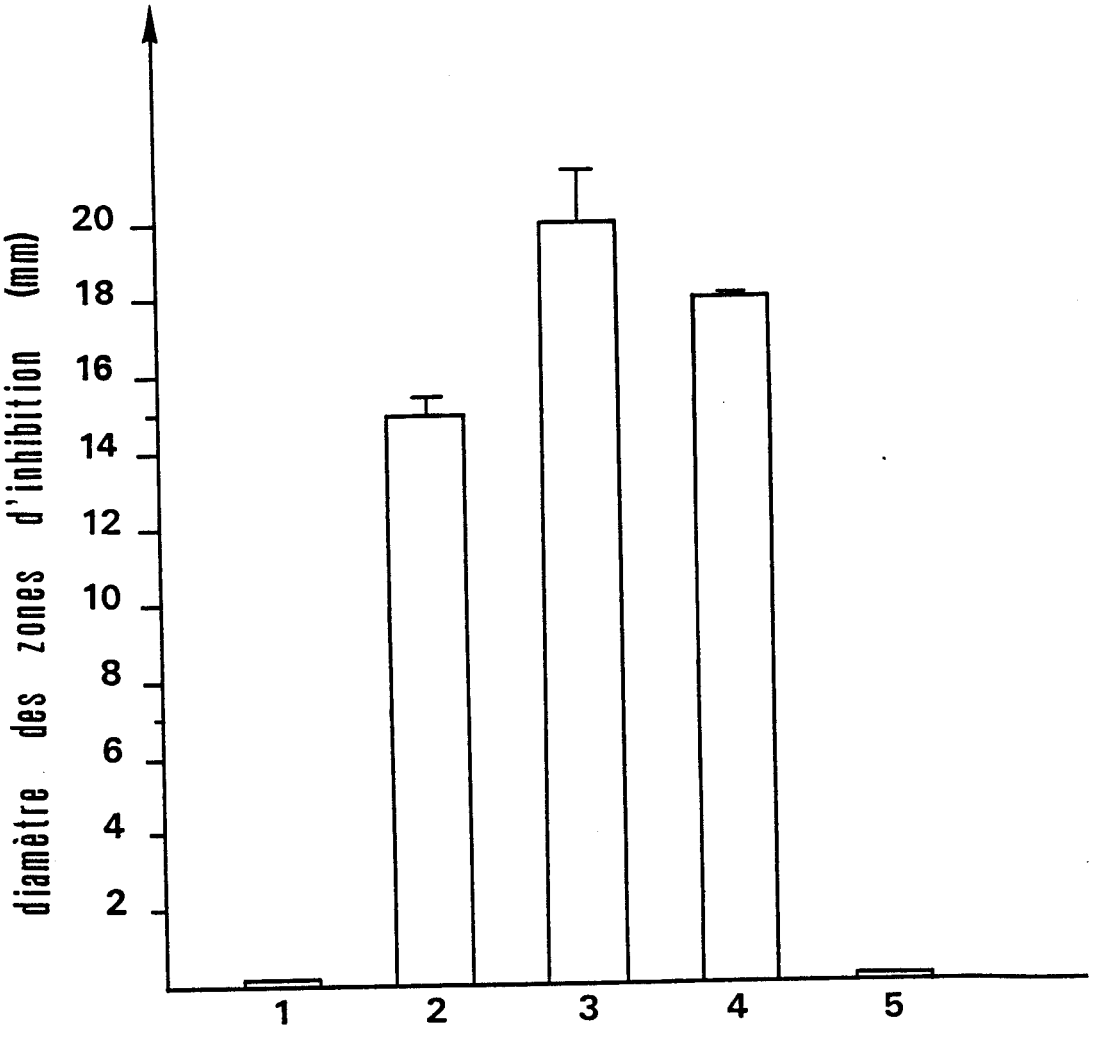


Fig. 60 - Diamètres de lyse des parois de Micrococcus lysodeikticus par le lysozyme de Nereis diversicolor après 16 heures d'incubation à 37°C dans des boîtes de Pétri contenant de l'agarose A37 à 1 %.

1. Activité dans du liquide coelomique des vers témoins.
2. Activité dans du milieu de dégranulation en présence de l'ionophore-calcium pendant 45 mn à 22°C.
3. Activité dans les homogénats cellulaires.
4. Activité du lysozyme de blanc d'oeuf de poule à 100µg/ml.
5. Activité du tampon PBS 0,066 M pH 6,2.

- Activité du lysozyme dans les homogénats cellulaires

Le test réalisé sur les fractions solubles des granulocytes a montré une forte activité de type lysozyme présentée dans la figure 60.

3. Recherche du lysozyme après immunisation

Une détection de l'activité du lysozyme a été également effectuée sur des animaux ayant été immunisés 24 heures avant avec les bactéries suivantes tuées par la chaleur : E. coli, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter, Bacillus megaterium, Bacillus cereus et Micrococcus kristinae. Après 24 heures, le liquide coelomique est prélevé puis séparé des coelomocytes. Il est alors testé sur les parois de Micrococcus lysodeikticus.

Les résultats obtenus après 18 heures d'incubation à 37°C ont montré que l'injection des bactéries E. coli, Pseudomonas fluorescens et Acinetobacter provoque une forte activité du lysozyme dans le liquide coelomique. Le taux du lysozyme le plus élevé est obtenu après immunisation par la souche de Pseudomonas fluorescens, le liquide coelomique provenant des vers immunisés avec des bactéries Gram+ ne présente aucune activité lysozymique décelable. Toutefois l'injection de poudre de Micrococcus lysodeikticus déclenche une libération du lysozyme dans le liquide coelomique (fig. 59). Il est à remarquer qu'il semble exister une relation entre l'activité pathogène des bactéries vis-à-vis de Nereis diversicolor et l'activité lysozymique.

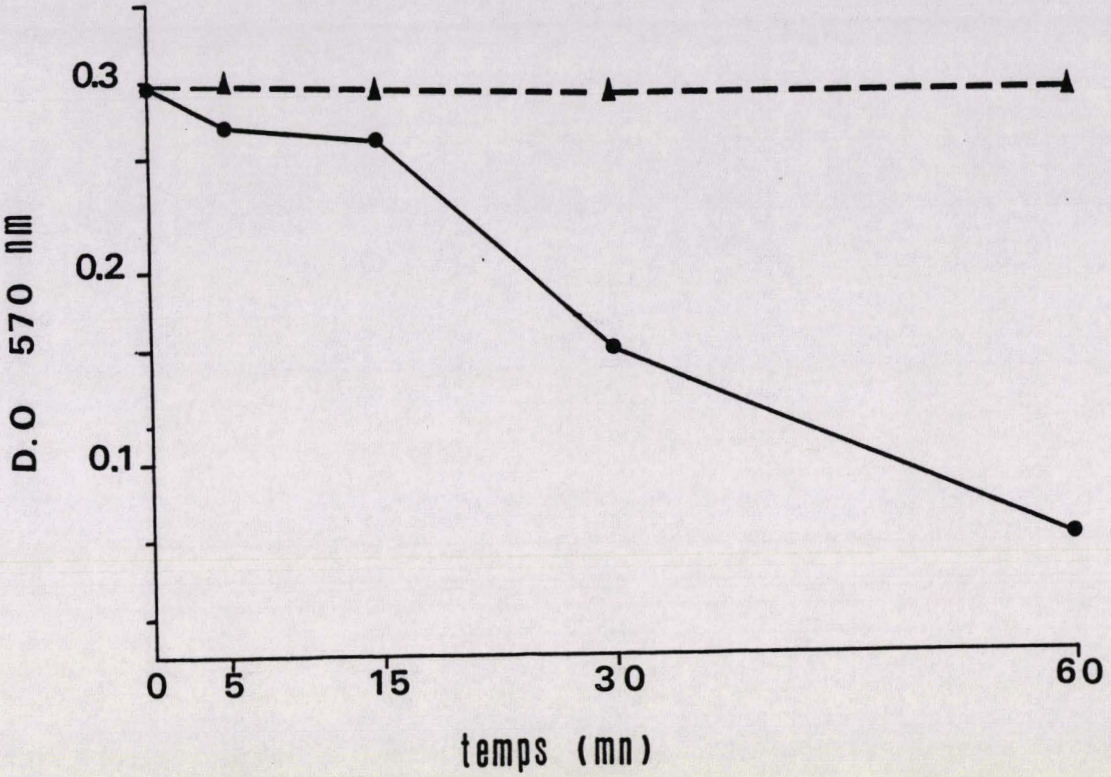
4. Recherche du lysozyme dans les milieux de dégranulation

a) Test lyso-plate

Le test réalisé sur les milieux de dégranulation obtenus après action de l'ionophore-calcium a révélé que 15 µl de milieu de dégranulation provoque une activité représentée par un diamètre d'inhibition d'environ 14,5 mm (fig. 60). Alors que l'activité dans la fraction soluble des granulocytes est de 20 mm de diamètre de zone d'inhibition.

b) Test de turbidimétrie

. Le test utilisé était celui décrit par Hulmark et al. (1980). Les résultats obtenus ont montré qu'après 15 minutes d'incubation du mélange parois de Micrococcus (D.O. égale à 0,3) avec le milieu de dégranulation, on observe une baisse de la densité optique, baisse qui se poursuit tout au long de l'incubation. Elle atteint finalement une densité optique égale à celle du tampon au bout d'une heure d'incubation à 37°C. Cette baisse de la D.O. est due à une destruction des liaisons ß1-4 existant entre l'acide N-acétylglucosamine et N-acétylmuramique (fig. 61).



BU LILLE

Fig. 61 - Lyse des parois de Micrococcus lysodeikticus par le lysozyme de Nereis en fonction du temps. les parois de Micrococcus sont mises en suspension dans du tampon PBS 0,066 M pH 6,2, puis exposées à l'aliquot à tester à 37°C. (▲ = tampon PBS 0,066 M pH 6,2 ; ● = fraction soluble de coelomocytes).

Les résultats obtenus à partir des deux tests indiquent que le lysozyme existe normalement dans les granulocytes mais qu'il n'est libéré dans le milieu extérieur qu'à la suite d'une stimulation ionique ou bactérienne.

5. Caractérisation du lysozyme sur gel d'électrophorèse

Cette partie de notre étude a eu pour but de localiser par électrophorèse le lysozyme parmi les protéines coelomiques et d'en déterminer le poids moléculaire.

Pour réaliser cette étude nous avons utilisé le test d'overlay. Le but est de déceler sur gel la zone de migration du lysozyme après électrophorèse en milieu acide (pH 4). Pour celà on recouvre ensuite le gel avec de l'agarose à 1 % contenant 0,5 mg/ml de parois de Micrococcus. Un témoin identique est effectué avec le lysozyme du blanc d'oeuf de poule. Après 2 à 3 heures d'incubation à 37°C les zones de lyse sont observées sous forme de bandes claires.

Les résultats obtenus (non présentés) après le test d'overlay ont montré une activité du lysozyme de Nereis diversicolor dans la même zone de migration que celle du lysozyme de poule.

Afin de déterminer le poids moléculaire approximatif du lysozyme de Nereis, une électrophorèse bidimensionnelle a été effectuée. Une première électrophorèse est réalisée sur un gel homogène en milieu acide (pH 4). La seconde dimension est obtenue après électrophorèse en gel de polyacrylamide 5-25 % en présence de SDS. Parallèlement à cette analyse des témoins constitués par des protéines de poids moléculaires connus ont été analysés.

Les résultats obtenus (fig. 58) ont montré qu'à partir de la protéine biologiquement active (overlay) localisée après la première électrophorèse dimensionnelle, nous avons obtenu lors de la deuxième dimensionnelle deux bandes protéiques, chacune d'un poids moléculaire d'environ 14,4 kDa. Nous ne pouvons préciser quelle protéine correspond à la forme active ou si les deux protéines ont un caractère d'activité de type lysozymique.

Nous pouvons signaler toutefois que le lysozyme de poule traité en témoin donne naissance à une seule bande qui comigre avec l'une des deux bandes protéiques de Nereis.

Une purification de la protéine serait nécessaire pour déterminer de façon précise son poids moléculaire.

B - Recherche de la β-glucuronidase

La β-glucuronidase est une hydrolase présente dans les lysosomes. Elle est abondante dans les granules de neutrophiles de Vertébrés et dans les granules de certains Invertébrés. Elle peut être également libre dans le milieu intérieur. Grâce à l'emploi d'un substrat synthétique tel que le p-nitrophényl-β-D-glucuronide dont l'hydrolyse provoque la libération de p-nitrophénol qui donne une coloration jaune après additon de Na_2CO_3, nous avons recherché cette enzyme dans les animaux normaux et immunisés et dans les milieux de dégranulation.

Pour cette étude le test utilisé est celui qui consiste à ajouter à 100 µl d'aliquot à tester, 100 µl de tampon acétate de sodium à pH 4,5 puis 100 µl de substrat dans le même tampon après une préincubation de 5 mn à 37°C. L'incubation est arrêtée par l'addition de 600 µl de Na_2CO_3. La densité optique est mesurée à 400 nm. Une gamme étalon est faite avec une solution de phénol dont la D.O. est également mesurée à 400 nm sur un spectrophotomètre BECKMAN. L'activité de l'enzyme exprimée en % est obtenue à partir de la formule suivante :

$$UA = \frac{\text{D.O. (400 nm)}}{\text{temps}} \times 100$$

1. Activité de la β-glucuronidase dans le liquide coelomique des vers normaux

Le test effectué sur le liquide coelomique provenant des vers normaux non immunisés a montré une activité de la β-glucuronidase qui est en très faible quantité. Ce qui se traduit par une faible activité de l'ordre de 5 % après 4 heures d'incubation à 37°C (fig. 59).

2. Activité de la β-glucuronidase dans les fractions solubles des cellules

La recherche réalisée sur les fractions solubles des coelomocytes a révélé une forte activité de β-glucuronidase. Ces résultats indiquent que les coelomocytes de Nereis contiennent de la β-glucuronidase. Dans les conditions normales, une partie en serait libérée en permanence dans le liquide coelomique.

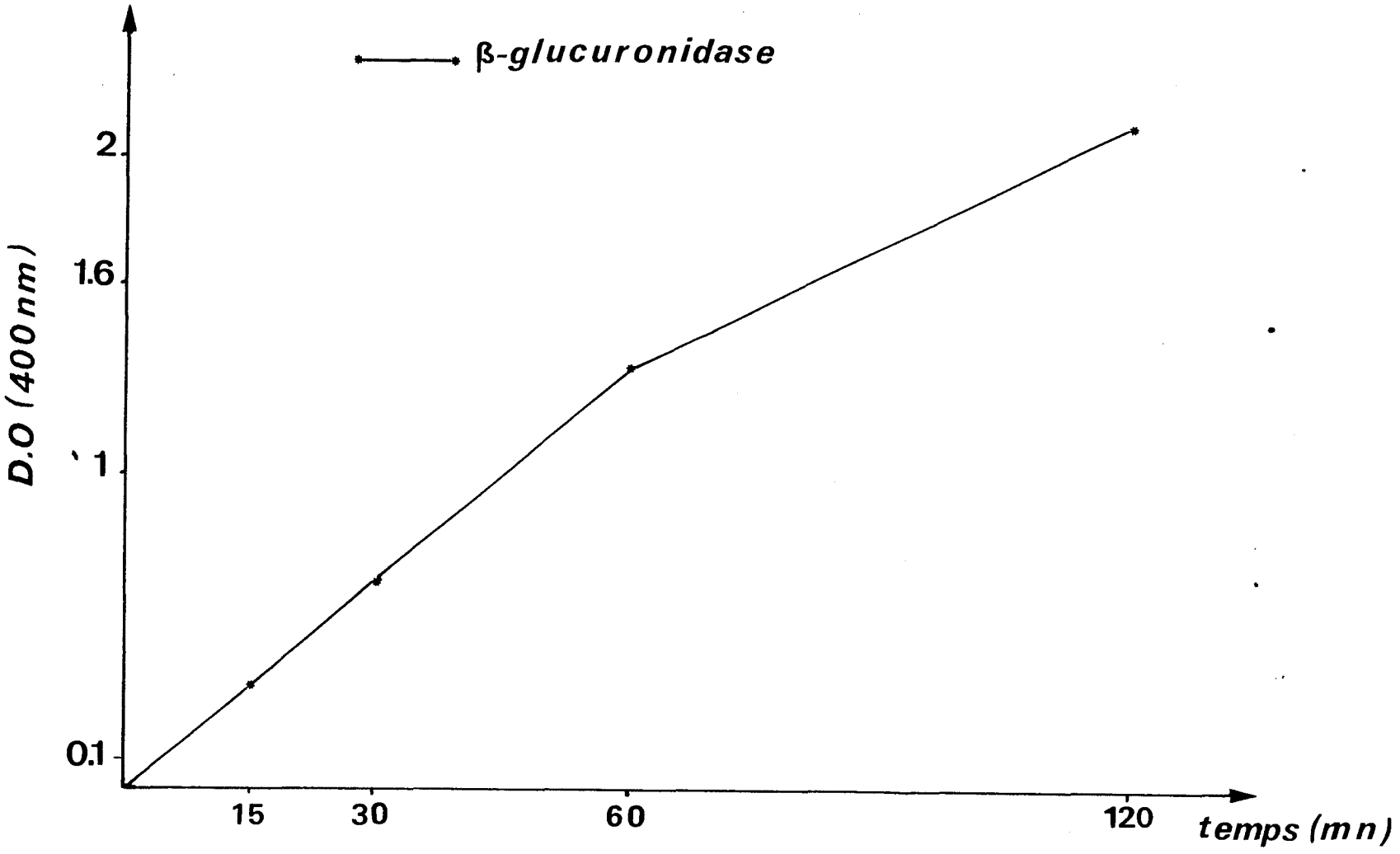


Fig. 62 - Suivi de l'activité de la ß-glucuronidase des homogénats cellulaires en fonction du temps (0 à 120 mn). L'incubation est faite dans du tampon acétate de sodium à pH 4 et à la température de 37°C. La lecture de la densité optique est faite à une longueur d'onde de 400 nm. L'augmentation de la D.O. est proportionnelle à l'activité de l'enzyme.

3. Activité β-glucuronidasique des animaux immunisés

Le test a été effectué sur du liquide coelomique provenant des animaux ayant reçu 24 heures avant des injections des souches bactériennes suivantes : E. coli, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus megaterium, Acinetobacter, Micrococcus kristinae et Micrococcus lysodeikticus.

- Activité dans le liquide coelomique

Dans tous les cas, on a détecté une activité de la β-glucuronidase, mais cette activité varie selon l'espèce de la souche bactérienne injectée. En effet l'injection d'E. coli provoque une décharge très supérieure de l'enzyme dans le liquide coelomique par rapport aux autres souches bactériennes (fig. 59).

4. Activité de la β-glucuronidase dans les milieux de dégranulation

Les milieux utilisés pour le test ont été obtenus après action de l'ionophore-calcium. On constate la présence de la β-glucuronidase dans le milieu. Ceci implique qu'au cours d'une réponse à une agression les coelomocytes réagissent en libérant dans le milieu diverses hydrolases capables de neutraliser les éléments étrangers introduits (fig. 62).

5. Identification de l'enzyme après électrophorèse

La localisation de la β-glucuronidase a été effectuée après une électrophorèse en gel de polyacrylamide 5-30 % (sans SDS) suivi d'un transfert sur feuille de nitrocellulose. Le substrat utilisé est le même que celui utilisé dans le paragraphe précédent. Dans ce cas la feuille de nitrocellulose est soit placée directement dans le substrat, soit recouverte de l'agarose à 5 % contenant le substrat. Le tout est placé à 37°C pendant 2 heures. Après l'incubation, on dépose sur chacune des feuilles la solution de Na_2CO_3 qui précipite les molécules de phénol libérées donnant ainsi au bout de 2 à 5 minutes une coloration jaune. Celle-ci indique dans l'électrophorèse la zone de migration de la β-glucuronidase. Par comparaison avec les témoins le poids moléculaire de la β-glucuronidase apparaît être voisin de 470 kDa (fig. 63).

Fig. 63 - Analyse électrophorétique en milieu non dénaturant du liquide coelomique. La flèche à gauche indique la zone de migration de la ß-glucuronidase (ß-glu). Les poids moléculaires des standards sont indiqués sur la droite de la figure.

Fig. 64 - Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS des protéines libérées par les coelomocytes au cours de la réaction d'encapsulation in vitro de billes "Biosilon" après 48 heures d'incubation dans le milieu de culture simplifié dépourvu de protéines. Les poids moléculaires sont indiqués à droite de la figure. On note la présence des bandes protéiques que l'on retrouve dans les milieux de dégranulation. C'est le cas des protéines de 14,4 kDa, 20 kDa et 30 kDa existant dans le milieu de dégranulation avec le cadmium, la protéine de 94 kDa du milieu de dégranulation avec l'ionophore-calcium.

fig.63

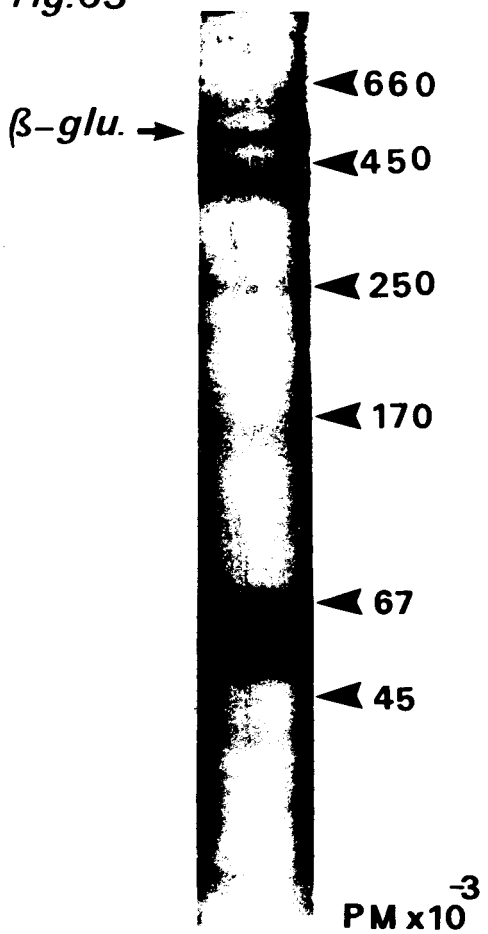
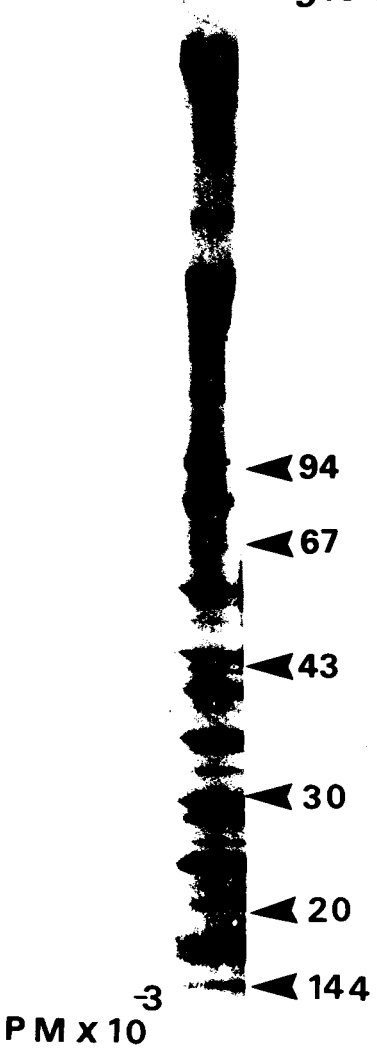


fig.64



C - Recherche d'activités de type bactériostatique

Un facteur antibactérien différent du lysozyme a été mis en évidence à la fois chez les Arthropodes (Engström et al., 1984 ; Keppi et al., 1986a, b) et chez les Annélides Oligochètes (Valembois et al., 1982). Chez les Polychètes des molécules semblables n'ont été décelées jusqu'à présent que chez une seule espèce (Glycera dibranchiata) par Anderson et Chain (1982). Ce facteur présente une activité inhibitrice sur la croissance des bactéries Gram- et Gram+. Cette activité disparaît lorsque le liquide coelomique est traité par la chaleur. Il s'agirait d'une protéine dont le poids moléculaire serait d'environ 10 kDa.

Chez Nereis diversicolor nous avons recherché la présence de molécules aux propriétés analogues à celles mises en évidence dans d'autres groupes d'Invertébrés.

1. Test d'inhibition de la croissance bactérienne

Pour réaliser cette étude nous avons utilisé le test des antibiogrammes effectué dans des boîtes de Pétri contenant de l'agarose à 7,5 °/.. dans laquelle les bactéries (E. coli ou M. kristinae) sont en croissance depuis 1 heure à 37°C. Sur ces cultures bactériennes on dépose des disques pour antibiogramme de 6 mm de diamètre imbibés de 20 µl de la solution à tester et l'ensemble est replacé à 37°C pendant 18 heures. Les zones d'inhibition de croissance apparaissent sur un fond opaque des bactéries en croissance.

2. Activité bactériostatique du liquide coelomique de vers immunisés 24 heures auparavant

Une recherche de l'activité bactériostatique a été effectuée à partir du liquide coelomique de vers immunisés avec les souches bactériennes suivantes : E. coli, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, Bacillus megaterium, et M. kristinae. Le liquide coelomique prélevé et séparé des coelomocytes a été testé sur les cultures d'E. coli et de M. kristinae. Après 18 heures d'incubation avec des disques imprégnés de 20 µl de liquide coelomique provenant des vers immunisés avec des souches d'E. coli et de Pseudomonas aeruginosa, nous avons observé une forte inhibition de la croissance aussi bien d'E. coli que de M. kristinae (figs 65, 66).

Par contre, avec le liquide coelomique provenant des vers immunisés avec des bactéries Gram+, on n'observe qu'une faible inhibition de la croissance d'E. coli et de M. kristinae (figs 65, 66).

3. Activité bactériostatique du liquide coelomique provenant des animaux intoxiqués avec du cadmium

L'action du facteur bactériostatique a été également mise en évidence dans le liquide coelomique provenant des vers intoxiqués avec du cadmium. Cette activité s'avère aussi importante que celle obtenue lors d'une immunisation bactérienne (fig. 68). Ceci nous a amené à faire la même expérience avec une solution de cadmium. Les résultats obtenus n'ont montré aucune inhibition de la croissance des bactéries (fig. 68). Nous pouvons donc en déduire que l'inhibition est due essentiellement aux facteurs libérés par les cellules sous l'effet du cadmium, et non pas directement au métal.

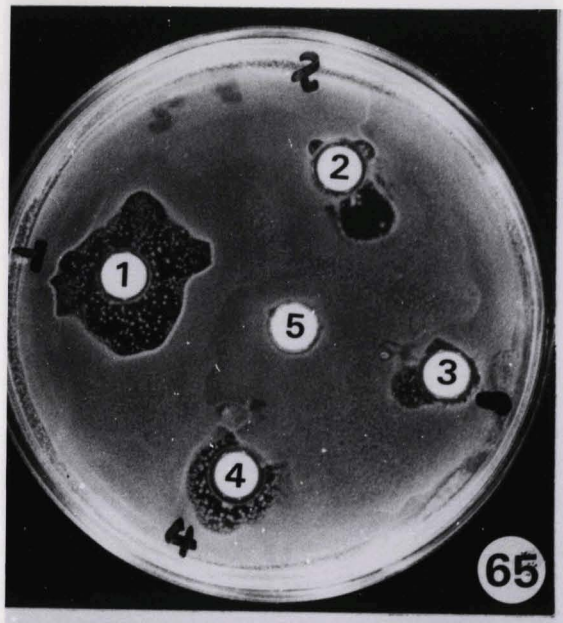
Pour déterminer la nature des substances responsables de cette activité, le liquide coelomique provenant de vers immunisés ou intoxiqués avec du cadmium a été traité avec les enzymes protéolytiques ou avec la chaleur puis testé sur la croissance des souches d'E. coli et de Micrococcus kristinae. Nous avons observé que le traitement du liquide coelomique contenant le facteur bactériostatique avec des enzymes protéolytiques pendant 4 heures à 37°C provoque une baisse de l'activité bactériostatique. Un résultat similaire est obtenu par la chaleur (15 minutes à 56°C). Ceci implique que les substances responsables de l'activité sont thermolabiles et vraisemblablement de nature protéique.

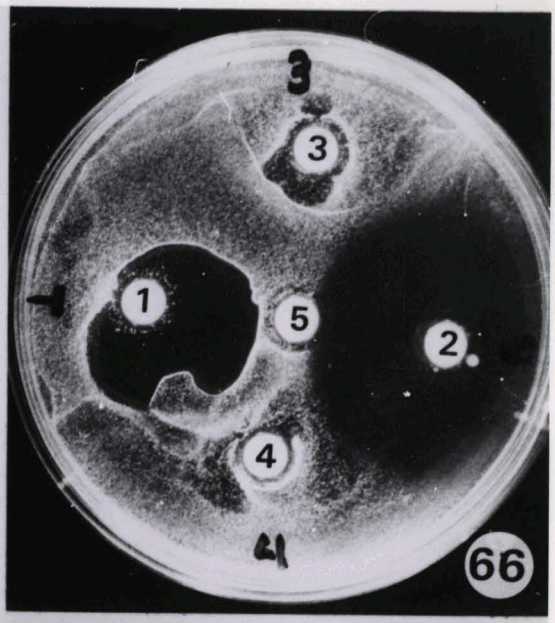
On peut penser que les différentes colonies déclenchant la libération des facteurs à activité bactériostatique représentent un danger pour les Néréidiens qui ont développé un système de défense permanent inhibant la multiplication des bactéries.

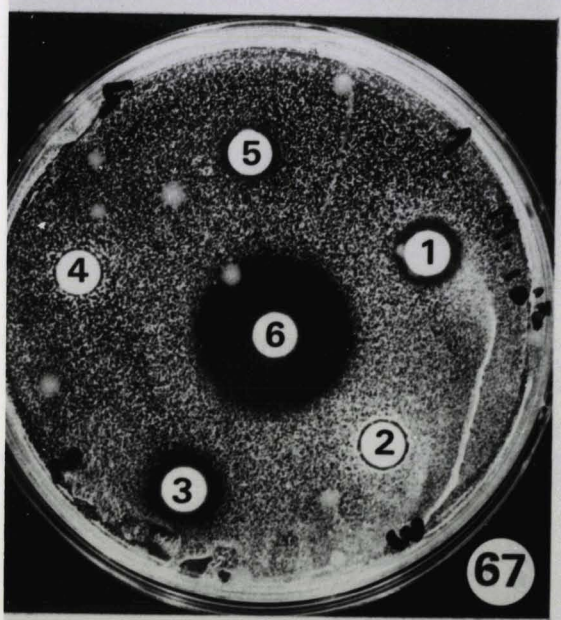
4. Effet bactériostatique de milieux de dégranulation

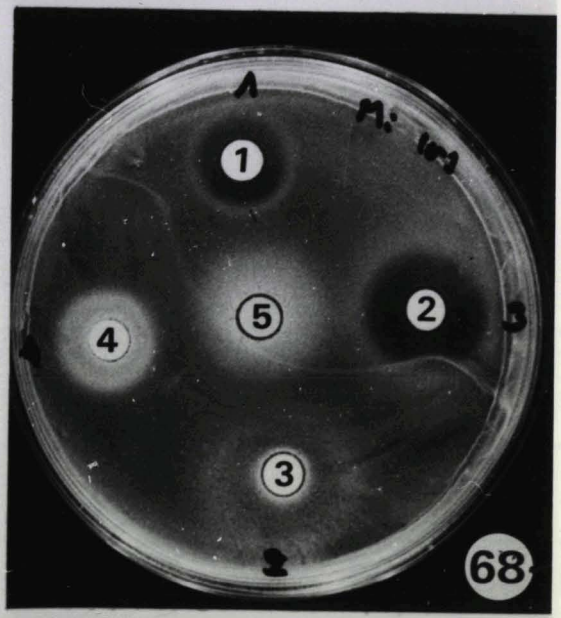
Les milieux de dégranulation obtenus in vitro par l'action de l'ionophore-calcium, du LPS ou du cadmium, ont été soumis aux mêmes tests d'inhibition de la croissance de bactéries. Ils ont révélé que les trois milieux contiennent le facteur bactériostatique (fig. 67). Ce facteur est beaucoup plus abondant lorsque la dégranulation est provoquée par du cadmium ou par l'ionophore-calcium.

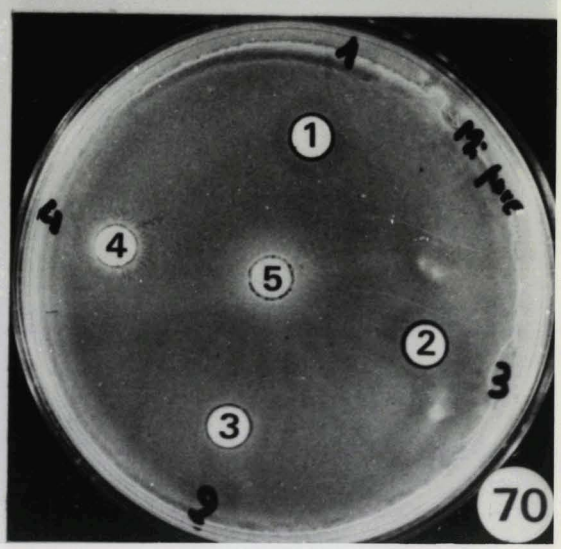
Les fractions solubles provenant d'homogénats de coelomocytes issus de vers immunisés ou pas n'ont montré aucune inhibition sur les cultures d'E. coli et de M. kristinae (figs 67, 68).











BU LILLE

Fig. 65 - Etude de la croissance de la colonie d'Escherichia coli en présence de disques pour antibiogramme neutres imbibés de 20 µl de :

1. liquide coelomique provenant des vers immunisés avec des bactéries Pseudomonas aeruginosa ;
2. liquide coelomique provenant des vers immunisés avec Escherichia coli ;
3. liquide coelomique provenant des vers immunisés avec Bacillus cereus ;
4. liquide coelomique provenant des animaux immunisés avec Bacillus megaterium ;
5. liquide coelomique provenant des vers non immunisés.

Après ensemencement et dépôt des disques, les boîtes de culture ont été placées à 37°C pendant 16 heures.

Fig. 66 - Croissance de Micrococcus kirstinae en présence de disques imprégnés de 20 µl de :

1. liquide coelomique prélevé des vers ayant reçu une injection de Pseudomonas aeruginosa ;
2. liquide coelomique provenant des animaux immunisés avec E. coli.
3. liquide coelomique provenant des vers immunisés avec Bacillus cereus ;
4. liquide coelomique provenant des vers ayant reçu Bacillus megaterium ;
5. liquide coelomique témoin.

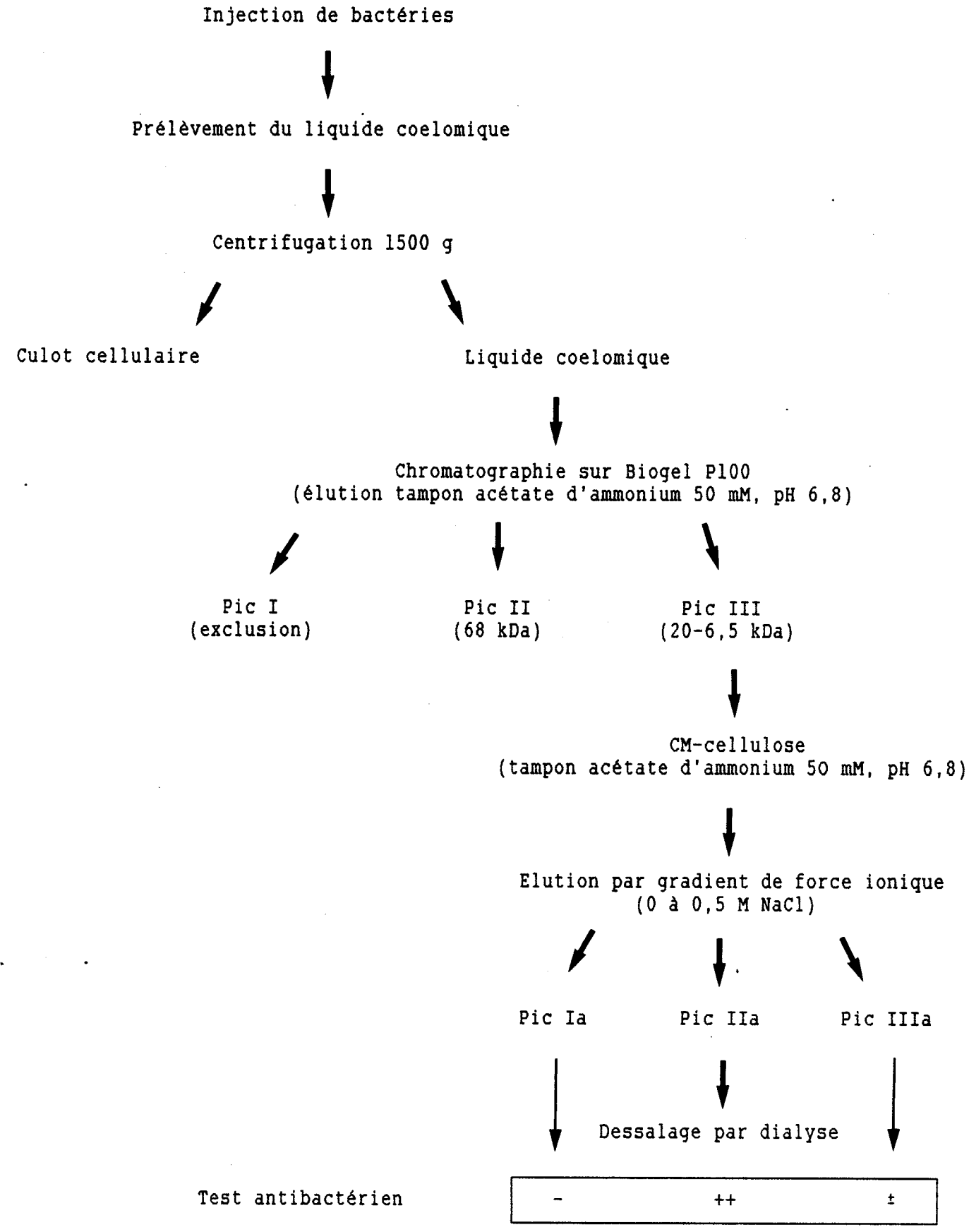
Fig. 67 - Croissance de Micrococcus kristinae en présence des milieux de dégranulation in vitro :
1. milieu de dégranulation sous l'action de l'ionophore-calcium.
2. lysozyme de blanc d'oeuf de poule à 100 µg/ml.
3. milieu de dégranulation en présence de LPS.
4. liquide coelomique provenant des vers non immunisés.
5. tampon contenant du cadmium à 55 ppm.
6. milieu de dégranulation sous l'action du cadmium.

Fig. 68 - Etude de la croissance de Micrococcus kristinae en présence de :
1. liquide coelomique des vers ayant reçu une injection d'ionophore-calcium.
2. liquide coelomique des vers intoxiqués avec du cadmium par injection dans le coelome.
3. liquide coelomique des vers immunisés avec du LPS.
4. homogénat cellulaire des vers immunisés avec le LPS.
5. liquide coelomique des vers témoins (non intoxiqués).

Fig. 69 - Activité du liquide coelomique des vers immunisés prétraité avec des enzymes protéolytiques pendant 4 heures à 37°C sur Micrococcus.
1. liquide traité avec la pepsine.
2. liquide coelomique traité avec la pronase.
3. liquide coelomique traité avec la trypsine.
4. liquide coelomique témoin.

Fig. 70 - Effet du liquide coelomique provenant de vers immunisés avec Pseudomonas aeruginosa. Les aliquots ont été traités à la chaleur (56°C et 100°C).
1 et 2. Liquide coelomique traité à 56°C respectivement pendant 5 mn et 15 mn.
3 et 4. Liquide coelomique traité à 100°C respectivement pendant 5 mn et 15 mn.
5. Liquide coelomique des vers non immunisés.

ableau VIII - Principales phases de purification des protéines bactériostatiques du liquide coelomique de Nereis diversicolor.



5. Analyse des protéines antibactériennes par électrophorèse

Après le travail sur la détection des activités antibactériennes apparaissant dans le liquide coelomique des vers immunisés (E. coli) ou intoxiqués (cadmium), nous avons recherché la charge de ces protéines pour savoir si elles présentent un caractère basique ou acide. Nous avons effectué une analyse du liquide coelomique par électrophorèse en gel homogène d'acrylamide à 12 % sans SDS en milieu acide pH 4, et le test d'overlay en recouvrant le gel avec des bactéries vivantes (Micrococcus kristinae). Au bout de 18 heures d'incubation à 37°C nous avons observé une zone d'inhibition de la croissance de bactéries correspondant à la zone de migration des protéines bactériostatiques. Ceci a permis de déduire que l'activité est due à des protéines basiques.

6. Purification des protéines ayant des activités bactériostatiques

(Les différentes étapes sont présentées dans le tableau VIII)

6.1. Chromatographie de gel filtration

Nous avons procédé à un fractionnement des protéines du liquide coelomique, provenant des vers immunisés, par une chromatographie en gel filtration sur Biogel P100 ou P20. La figure 71 montre le résultat de cette filtration. Nous observons que quelque soit le mode de stress (bactéries, Cadmium) le profil présente trois pics : le premier correspond aux protéines exclues, le deuxième correspond aux protéines de poids moléculaires d'environ 68 KDa et le troisième pic aux protéines dont les poids moléculaires sont compris entre 20 kDa et 6,5 kDa. Le test antibactérien effectué sur les trois pics a révélé une réaction positive sur les protéines du pic III tandis que les deux premiers pics n'ont présenté aucune activité.

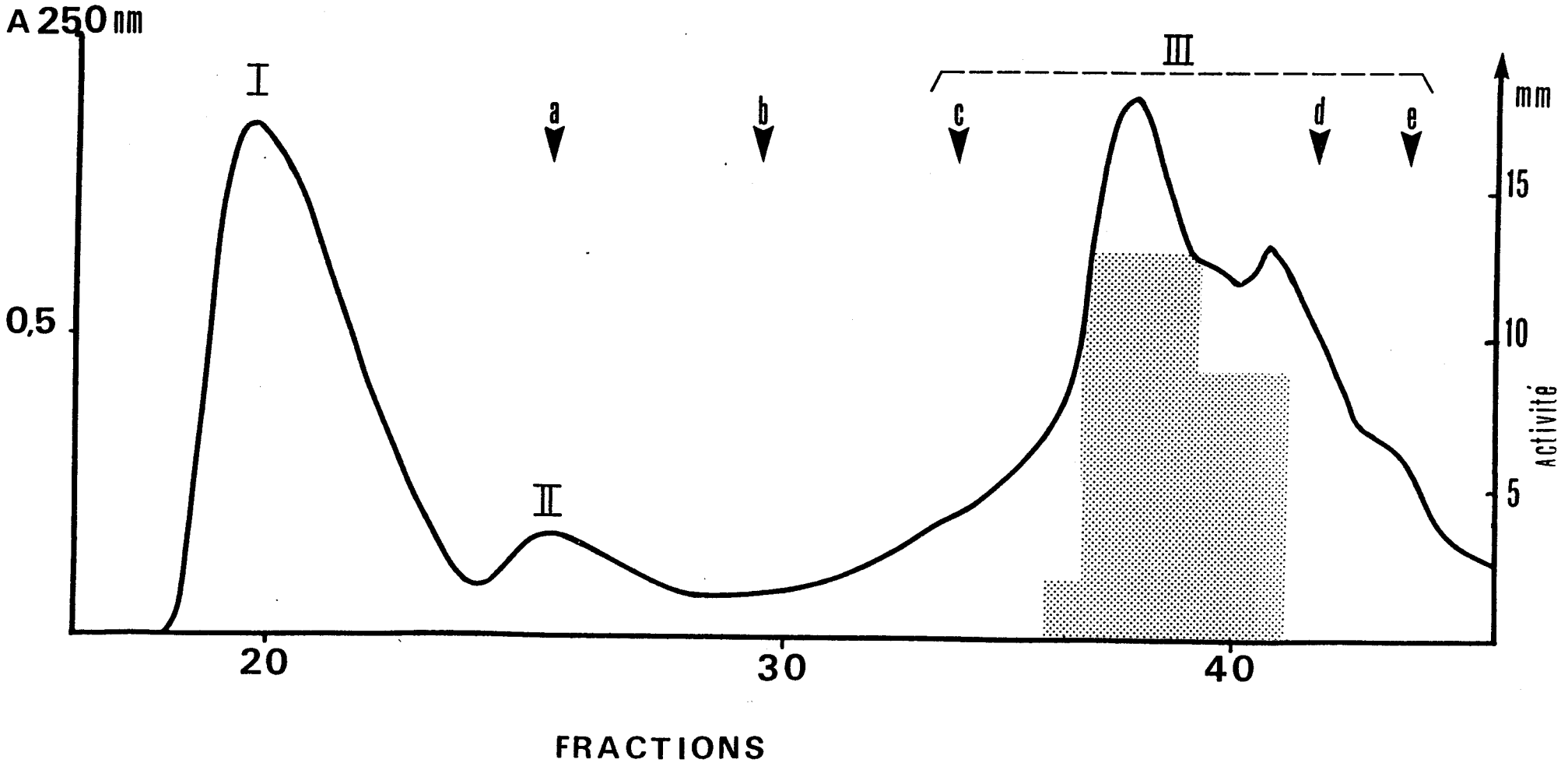
Sachant que ces protéines antibactériennes sont de nature basique, nous nous sommes proposés de poursuivre la purification de ces protéines du pic III.

6.2. Chromatographie d'échange d'ions

Les fractions du pic III ont été regroupées et séparées sur une résine (CM-cellulose) à un débit de 10 ml/heure. Une première élution est effectuée avec le tampon acétate d'ammonium (50 mM, pH 6,8) ; une seconde avec le gradient linéaire en NaCl (0-0,5 M) dans le même tampon. Le profil chromatographique montre trois pics. Après avoir regroupé les fractions correspondant à chaque pic, les échantillons ont été dessalés puis testés sur des

Fig. 71 - Chromatographie de gel filtration sur Biogel P 100 (taille de la colonne : 1,1 x110 cm) de liquide coelomique (2 ml) de Nereis diversicolor infectées par Escherichia coli 24 heures auparavant.
La colonne est éluée par un tampon acétate d'ammonium 50 mM, pH 6,8 à un débit de 5 ml/heure et étalonnée par les protéines de poids moléculaires :
- SAB : 68 kDa (a)
- Ovalbumine : 44 kDa (b)
- α-chymotrypsinogène : 24,5 kDa (c)
- Cytochrome C : 13 kDa
- Trysine inhibitrice : 6,5 kDa

Les protéines non retenues sur la colonne sont représentées par le pic I. L'activité bactériostatique retrouvée au niveau du pic III est exprimée en millimètres (diamètre de la zone d'inhibition).
A : absorbance à 280 nm.


A 250 nm
0,5
I
II
III
a
b
c
d
e
20
30
40
FRACTIONS
mm
15
10
5
Activité

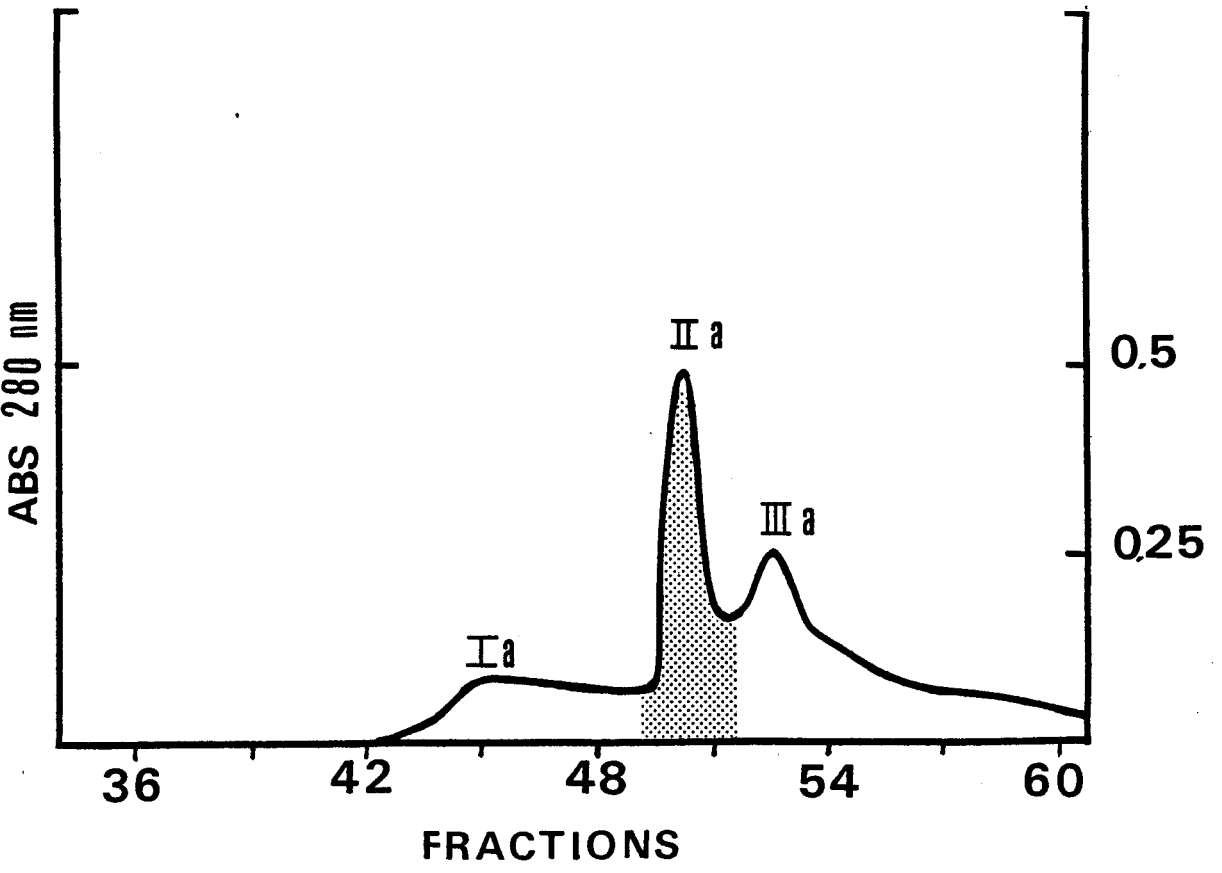


Fig. 72 - Purification par chromatographie d'échange d'ions (sur CM-cellulose, volume des fractions : 5 ml) du pic III contenant des protéines à activité bactériostatique obtenu par gel filtration sur Biogel P100. Eluant : tampon acétate d'ammonium 50 mM, pH 6,8 avec 0-0,5 M NaCl, débit 10 ml/heure. Le profil comprend 3 pics : Ia, IIa et IIIa. L'action bactéristatique est portée par les protéines du pic IIa. ABS : absorbance à 280 nm.

cultures de Micrococcus kristinae. Le test a révélé une forte activité au niveau du pic IIa et une légère au niveau du pic IIIa.

DISCUSSION

Les Invertébrés ne possèdent pas de système de défense aussi complexe que celui des Vertébrés. En dehors de la phagocytose qui représente la fonction principale d'élimination des bactéries, le liquide coelomique joue aussi un rôle prépondérant dans la défense antibactérienne de par les molécules qu'il contient.

Des substances hémolytiques et agglutinantes ont été signalées chez les Annélides Oligochètes par Dupasquier et Duprat (1968), Chateaureynaud-Duprat et Izoard (1973), Cooper et al. (1974), Dupasquier (1971) et chez les Polychètes par Anderson (1980), Dales (1982), Russel et al. (1983), Parrinelo et Rindone (1981).

A côté de ces substances, d'autres telles le lysozyme et certaines protéines jouent un rôle important dans la lutte contre des bactéries. Chez la plupart des Invertébrés, le lysozyme joue un rôle fondamental dans la lyse des bactéries Gram+ dont les parois sont riches en muréine. L'activité du lysozyme est mise en évidence en utilisant un test lytique sur les parois de Micrococcus lysodeikticus, test mis au point par Osserman et Lawlor (1966).

Chez Nereis diversicolor, nous avons mis en évidence cette enzyme dans le liquide coelomique provenant des vers immunisés par des bactéries Gram- (E. coli, Pseudomonas fluorescens et Acinetobacter) alors que le liquide coelomique de vers normaux ne présente pas d'activité de type lysozyme.

Le test effectué sur les fractions solubles des granulocytes s'est révélé positif. Le test est également positif lorsqu'il est effectué sur les milieux de dégranulation après action de l'ionophore-calcium, ou du LPS.

Le lysozyme détecté possède certaines caractéristiques du lysozyme de blanc d'oeuf de poule, à savoir être actif à pH acide (6,2). Cette protéine est de nature basique car son activité a été détectée après électrophorèse en milieu acide pH 4, et son poids moléculaire est d'environ 14000 daltons. L'ensemble de ces propriétés rapproche le lysozyme de Nereis d'autres molécules de lysozymes signalés par Jolles et Zuili (1960) chez Nephthys hombergii, par Zachary et Hoffmann (1984) chez Locusta migratoria, Cheng et al. (1977) chez Biomphalaria glabrata, Cheng et al. (1975) chez Mercenaria mercenaria et par Cheng et Rodrick (1974) chez Mya arenaria. Toutefois cette enzyme semble absente dans d'autres groupes d'Invertébrés, c'est le cas de Lumbricus terrestris et Eisenia foetida (Roch, 1980) et de l'Insecte Phormia (Keppi, 1986a).

En plus de cette protéine lysosomale, d'autres hydrolases telle que la β-glucuronidase semblent associées au lysozyme et sont libérées en même temps au cours d'une infection bactérienne. Chez les Vertébrés cette enzyme a été mise en évidence par Wright et al. (1979), Smolen (1986) et chez certains Invertébrés par Tsukada et Yoshino (1987).

Chez Nereis diversicolor, nous avons mis en évidence la présence d'une faible quantité de β-glucuronidase dans le liquide coelomique des vers normaux. Cette quantité augmente dans le liquide coelomique des vers immunisés. Cette enzyme a été également mise en évidence dans la fraction soluble des coelomocytes et dans les milieux de dégranulation après action de l'ionophore-calcium ou du LPS. D'après le test effectué après électrophorèse et transfert sur feuille de nitrocellulose, cette enzyme possède un poids moléculaire d'environ 470 kDa. Ce poids moléculaire est très proche de celui mis en évidence chez un insecte, Ampularia, dont la molécule possède deux sous unités d'environ 340 kDa (Tsukada et Yoshino, 1987).

Outre ces enzymes lysosomales nous avons mis en évidence dans le liquide coelomique provenant des vers immunisés par des bactéries ou traités avec du cadmium, la présence d'un facteur dont l'activité a été détectée à la fois sur des bactéries Gram- et Gram+ alors que le lysozyme exerce son activité uniquement sur des bactéries Gram+. Cette activité antibactérienne décelée chez Nereis est semblable à celle mise en évidence dans plusieurs familles d'Insectes (Engström et al., 1984 chez Hyalophora cecropia ; Keppi, 1986b chez Phormia terranovae et Flyg et al., 1987 chez Drosophila melanogaster) et chez certaines Annélides Oligochètes et Polychètes (Valembois et al., 1982 chez Eisenia foetida et Anderson et Chain, 1982 chez Glycera dibranchiata). Dans ces différents cas on retrouve un certain nombre de caractères communs, à savoir activité à pH acide, migration en milieu acide pH 4 et activité sur les cultures d'E. coli et M. kristinae. Il est probable que l'activité observée sur les cultures est due à une ou plusieurs protéines de poids moléculaires assez proches.

D'après les tests effectués sur les fractions du liquide coelomique obtenues après séparation en chromatographie sur un gel Biogel P 100 qui sépare les protéines de poids moléculaires compris entre 6,5 kDa et 100 kDa, l'activité est portée par des protéines d'un poids moléculaire compris entre 14 kDa et 10 kDa. C'est le cas de la protéine détectée par Anderson et Chain (1982) chez le Polychète Glycera dibranchiata . Il rappelle également les molécules isolées chez Phormia terranovae (Keppi et al., 1986b), de Hyalophora cecropia (Engström et al., 1984) et celles de Drosophila melanogaster (Fly et al., 1987). Il faut noter que si chez les Invertébrés cités ci-dessus l'activité semble être portée par plusieurs molécules, chez Nereis le nombre de

molécules reste encore inconnu. Une purification de ces molécules permettra d'apporter une réponse à la question de savoir le nombre de protéines portant l'activité.

Chez Nereis, la molécule décelée est thermolabile comme celle détectée chez Glycera dibranchiata (Anderson et Chain, 1982) alors que les molécules de Phormia terranovae (Keppi et al., 1986b) sont thermostables.

En ce qui concerne l'origine, chez Nereis diversicolor, les coelomocytes constituent la source d'activité antimicrobienne car elle a été décelée dans les milieux de dégranulation in vitro obtenus après action de l'ionophore-calcium, du LPS et du cadmium. La ou les molécules seraient stockées dans les granules sous forme inactive. En effet, les tests effectués sur les fractions solubles des homogénats cellulaires se sont révélés négatifs. Ceci laisse à penser à l'existence d'un système semblable à celui des Arthropodes qui est le système prophénol-oxydase (ProPo) qui déclenche la cascade des réactions de défense immunitaire. Ce système est localisé dans les hémocytes sous forme inactive, il peut être activé par une incubation avec du LPS ou la laminarine ou β 1-3 glucan. Nous pouvons tirer comme conclusion que la réaction négative obtenue sur les fractions solubles semblerait être due à une inactivation des molécules intracellulaires par absence de l'activation du système semblable à celui des Arthropodes.

DISCUSSION ET CONCLUSION

GENERALES

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

Le travail relatif à la cytophysiologie des coelomocytes de Nereis diversicolor a permis dans un premier temps de confirmer par plusieurs méthodes d'expérimentation les résultats obtenus par Dhainaut (1984) à savoir l'existence de deux populations de coelomocytes : les cellules non adhérentes qui sont les éléocytes et les cellules adhérentes, les granulocytes, qui sont à leur tour subdivisés en trois sous-populations majeures :

- Les granulocytes I sont caractérisés par la présence de faisceaux de microfilaments et renferment deux catégories de granules cytoplasmiques. Ils présentent un voile circulaire lorsqu'ils s'étalent sur un support. Cette structure les rapproche des granulocytes de type I de Lumbricus terrestris (Linthicum et al., 1977), des leucocytes fibrilaires d'Eisenia fetida (Valembois, 1977) et des granulocytes I de Perinereis cultrifera (Baskin, 1974 ; Dhainaut, 1984).

- Les granulocytes II sont des cellules de grande taille (5 à 6 µm de diamètre) caractérisées par du glycogène et un cytoplasme renfermant d'abondants granules, ce qui les rapproche des neutrophiles des Vertébrés.

- Les granulocytes III sont de petites cellules possédant un volumineux noyau central et des granules. Ils ressemblent aux amibocytes d'Arenicola marina (Dales et Dixon, 1982), aux coagulocytes de certains Insectes (Ashok Raina, 1976) et aux leucocytes du Gastéropode Biomphalaria glabrata (Jeong et Heyneman, 1976).

L'emploi du SAMBA 200 a permis, grâce à l'analyse des 15 paramètres mis en mémoire, de confirmer l'existence de trois sous-populations de granulocytes.

La mise en évidence des récepteurs membranaires des coelomocytes par l'utilisation des lectines a permis d'étayer les subdivisions établies sur les critères morphologiques

Plusieurs lectines ont été utilisées. Pour la ConA, il s'est avéré que tous les coelomocytes présentent à leur surface des récepteurs pour cette lectine. Toutefois les granulocytes présentent davantage de sites récepteurs que les éléocytes. Il est intéressant de noter que les résidus mannose reconnus par la ConA ont été également décelés au niveau des hémocytes de plusieurs Invertébrés (Gebbinck, 1980 ; Yoshino, 1983 ; Yoshino et al., 1979) par contre, ces résidus n'existent qu'à la surface des leucocytes non adhérents d'Eisenia fetida (Roch et Valembois, 1978) et sont absents chez Mytilus edulis et chez Aplysia (Gebbinck, 1980).

D'autres résidus ont été mis en évidence uniquement au niveau des granulocytes II et des granulocytes III. Les lectines SBA, PNA et RCA1 ont révélé d'abondants résidus galactose au niveau des granulocytes II. Des caractéristiques similaires ont été notées chez les hémocytes d'Helix pomatia (Renwrantz et Cheng, 1977) et de Biomphalaria glabrata (Schoenberg et Cheng, 1981).

Les résidus fucose ont été détectés en grande quantité par l'utilisation de l'UEA1 et AAA à la surface des granulocytes III, ils sont rares par contre sur les granulocytes II. Dans la littérature, la présence du fucose a été signalée chez les hémocytes d'Helix pomatia (Renwrantz et Cheng, 1977).

Les revêtements glucidiques membranaires sont impliqués dans les processus d'agglutination lorsque les lectines sont ajoutées au milieu de culture, c'est ainsi que les lectines spécifiques du fucose provoquent l'agglutination des granulocytes III mais non celle des granulocytes I et II. Nous avons mis à profit cette propriété pour tenter d'obtenir une séparation des différentes catégories cellulaires en procédant à des agglutinations spécifiques selon la technique mise au point par Reisner et Sharon (1980). En utilisant respectivement de la PNA (galactose) et de l'UEA1 (fucose), nous sommes arrivés à séparer les deux sous-populations de granulocytes II et III. Les différents agrégats obtenus sont ensuite dissociés par des incubations en présence de fortes concentrations du sucre inhibiteur : D-galactose et L-fucose. Toutefois, bien que de nombreuses lectines aient été testées, nous ne sommes pas arrivés à obtenir l'isolement des granulocytes I. Signalons qu'une technique similaire a été utilisée chez Asterias rubens (Redziniak et al., 1978) pour obtenir une séparation des cellules de l'organe axial. De même, chez les Vertébrés, la purification des thymocytes a été obtenue par cette méthode (Reisner et Sharon, 1980 ; Reisner et al., 1976 ; Poretz et al., 1986).

En ce qui concerne le rôle des récepteurs des coelomocytes de Nereis diversicolor, nous ne possédons que peu de données. Ils assurent vraisemblablement les mêmes rôles que chez d'autres Invertébrés à savoir : intervention dans les processus de reconnaissance cellulaire et dans les fonctions phagocy-

taires (Bar-Shavit et al., 1977 ; Freimer et al., 1978 ; Cooper, 1979 ; Stahl et al., 1984 ; Teodorescu, 1984 ; Miegeville et al., 1987).

Nous avons ensuite abordé l'étude de diverses fonctions physiologiques des granulocytes.

Le processus de dégranulation a tout d'abord été envisagé. Des observations cytologiques réalisées in vitro ont montré que sous l'action de certains agents stimulants (ionophore-calcium, LPS ou laminarine), les granulocytes libèrent dans le milieu extracellulaire leurs granules cytoplasmiques, lesquels, après avoir conservé un certain temps leur forme initiale, libèrent ultérieurement leurs protéines dans le milieu de culture. Il est connu que dans un certain nombre de cas des agents responsables de la dégranulation, tels le LPS, agissent par l'intermédiaire des récepteurs membranaires. Ceci nous a conduits à analyser l'effet d'un blocage supposé de ces récepteurs par utilisation des lectines.

La nature de la réponse peut être différente selon les facteurs utilisés. C'est ainsi que chez le Crustacé Pacifastacus, le LPS et la laminarine ne provoquent la réaction que d'un seul type d'hémocytes, tandis que plusieurs populations répondent après incubation avec l'ionophore-calcium (Johansson et Söderhall, 1985). Dans le cas de notre matériel, l'ionophore-calcium provoque la dégranulation des granulocytes I et III, le LPS déclenche la réaction des granulocytes I, II et III, par contre le cadmium s'est montré spécifique de la réponse des granulocytes I.

Utilisée seule, la ConA provoque une dégranulation partielle des granulocytes ; un processus similaire a été observé sur les mastocytes de Vertébrés (Lawson et al., 1978). Les lectines UEA1 et PNA, par contre, ne provoquent aucune réaction. Lorsque les cellules sont préincubées avec ces lectines, l'activation déclenchée par le cadmium est réduite. Le blocage est total quand les cellules sont mises en présence de LPS. Conformément à l'hypothèse de départ, il est vraisemblable que les lectines soient entrées en compétition avec les récepteurs du LPS. Par contre, vis-à-vis du cadmium, les résultats restent plus difficiles à expliquer.

Une analyse des constituants granulaires rejetés par dégranulation, soit dans le liquide coelomique, soit dans le milieu de culture des cellules a été effectuée par électrophorèse.

Il en ressort que la composition en protéines des exudats varie en fonction des stimulus utilisés : les bandes protéiques diffèrent selon que les dégranulations sont provoquées par l'ionophore-calcium, le LPS ou le Cadmium. Un point à compléter sera de reprendre ce travail en utilisant des sous-populations distinctes de granulocytes. Parmi les protéines libérées par la

dégranulation, certaines coïncident avec les protéines solubles des coelomocyte. L'une d'entre elle a pu être analysée avec certitude. Il s'agit de celle se liant avec le Cd (Nejmeddine et al., 1988) et localisée par voie immunocytochimique au niveau des granulocytes I (Dhainaut-Courtois et al., 1987). Par utilisation d'un anticorps monoclonal (Porchet-Henneré et al., 1987b), la libération de cette protéine dans le liquide a pu être démontrée lors d'une dégranulation réalisée in vivo.

Le rejet de matériel protéique par les granulocytes étant acquise, il convenait d'envisager le rôle physiologique de ces molécules. Guidé par les résultats acquis chez d'autre groupes d'Invertébrés, nous nous sommes orientés vers la détection de molécules à propriétés antibactériennes.

Dans un premier temps, nous avons recherché la présence de lysozyme. Il est apparu que le liquide coelomique des vers normaux n'en contient pas. Par contre, après intoxication par le Cd ou immunisation par des bactéries, 24 heures au préalable, le lysozyme apparaît dans le liquide coelomique. Son activité, dosée par action lytique sur les parois sèches de Micrococcus lysodeikticus est variable selon la nature des bactéries injectées (E. coli, Pseudomonas fluorescens, Acinetobacter).

Par la technique d'overlay appliquée au gel d'électrophorèse bidimensionnelle, nous avons déterminé le poids moléculaire de ce lysozyme de Néréidien par comparaison avec le lysozyme de blanc d'oeuf de poule et des protéines de poids moléculaires connus, utilisées comme témoins ; il se situe entre 14 et 18 kDa.

La recherche de la β-glucuronidase a été effectuée grâce au test mis au point par Talalay et al. (1946) par l'emploi de p-nitrophényl β-D-glucuronide comme substrat. Les dosages réalisés sur du liquide coelomique ont permis de mettre en évidence de la β-glucuronidase aussi bien chez des animaux normaux que chez des animaux immunisés (bactéries) ou intoxiqués (cadmium) ; il faut noter que le taux de l'enzyme est beaucoup plus élevé chez les animaux traités que chez les non traités. Après transfert sur feuille de nitrocellulose, nous avons pu localiser l'activité enzymatique après une séparation électrophorétique en milieu non dénaturant. Il s'avère que la β-glucuronidase présente un poids moléculaire de l'ordre de 470 kDa, chiffre légèrement supérieur à celui signalé pour cette molécule chez l'Insecte Ampullaria (Tsukada et Yoshino, 1987).

Comme chez les Mollusques (Cheng et al., 1975 ; Mohandas et al., 1985), il ressort de notre étude que les coelomocytes sont vraisemblablement à l'origine des enzymes lysosomales présentes dans le liquide coelomique ; en effet, les homogénats de granulocytes présentent une activité enzymatique analogue à celle du milieu coelomique. Par contre, nous ne pouvons préciser

actuellement le type de granulocytes impliqué. Une tentative de détection immunocytochimque utilisant les anticorps anti-lysozyme de poule s'est révélée infructueuse.

Outre les enzymes lysosomales, nous avons aussi recherché, aussi bien dans le liquide coelomique que dans les milieux de dégranulation, s'il existait d'autres substances possédant des propriétés antibactériennes. Ces activités ont été decelées par l'emploi des tests antibiogrammes sur les cultures de bactéries (E. coli et Micrococcus kristinae). Chez les animaux normaux, le test effectué sur du liquide coelomique s'est révélé négatif. Par contre, lorsque les animaux sont immunisés par des injections de bactéries ou de LPS, ou intoxiqués par du cadmium, il apparaît une inhibition de la croissance des bactéries. Une forte inhibition est observée sur du liquide coelomique proveenant de vers immunisés avec Escherichia coli ou Pseudomonas aeruginosa ou intoxiqués avec du cadmium.

Un traitement par la chaleur et par des enzymes protéolytiques a permis de préciser que les activités antibactériennes sont dues à des protéines thermolabiles. Celles-ci ont un pH basique car elles peuvent être séparées par électrophorèse en milieu acide. Pour essayer de caractériser ces protéines nous avons procédé tout d'abord à une analyse par chromatographie en gel filtration. L'activité bactériostatique a été localisée dans les fractions composant le deuxième pic dont le poids moléculaire est compris entre 14 kDa et 6,5 kDa. Dans un second temps, une purification sur échangeuse d'ions a été entreprise pour caractériser les protéines responsables de l'activité antibactérienne.

Bien que préliminaires, les caractéristiques des protéines antibactériennes des Néréidiens permettent de les comparer aux molécules exerçant une fonction comparable chez divers groupes d'Invertébrés (Insectes : Engström et al. (1984) chez Hyalophora cecropia ; Flyg et al. (1987) chez Drosophila melanogaster, et chez certaines Annélides : Valembois et al. (1982) chez Eisenia fetida et Anderson et Chain (1982) chez Glycera dibranchiata).

En conclusion, il apparaît que le liquide coelomique des Néréidiens, de même que le milieu intérieur de différents Invertébrés (Kepi et al. 1986a, Hoffmann et al., 1981 ; Postlethwait et al., 1988 chez les Insectes ; Valembois et al., 1982 chez l'Annélide Oligochète Eisenia fetida et Anderson et Chain, 1982 chez le Polychète Glycera dibranchiata) est, dans les conditions normales, pratiquement dépourvu de toute activité antimicrobienne. Il est nécessaire que survienne un "stress" d'origine microbienne, ou résultant d'une intoxication pour que les mécanismes de défense soient mobilisés. Dans ces conditions, vraisemblablement par l'intermédiaire de récepteurs spécifi-

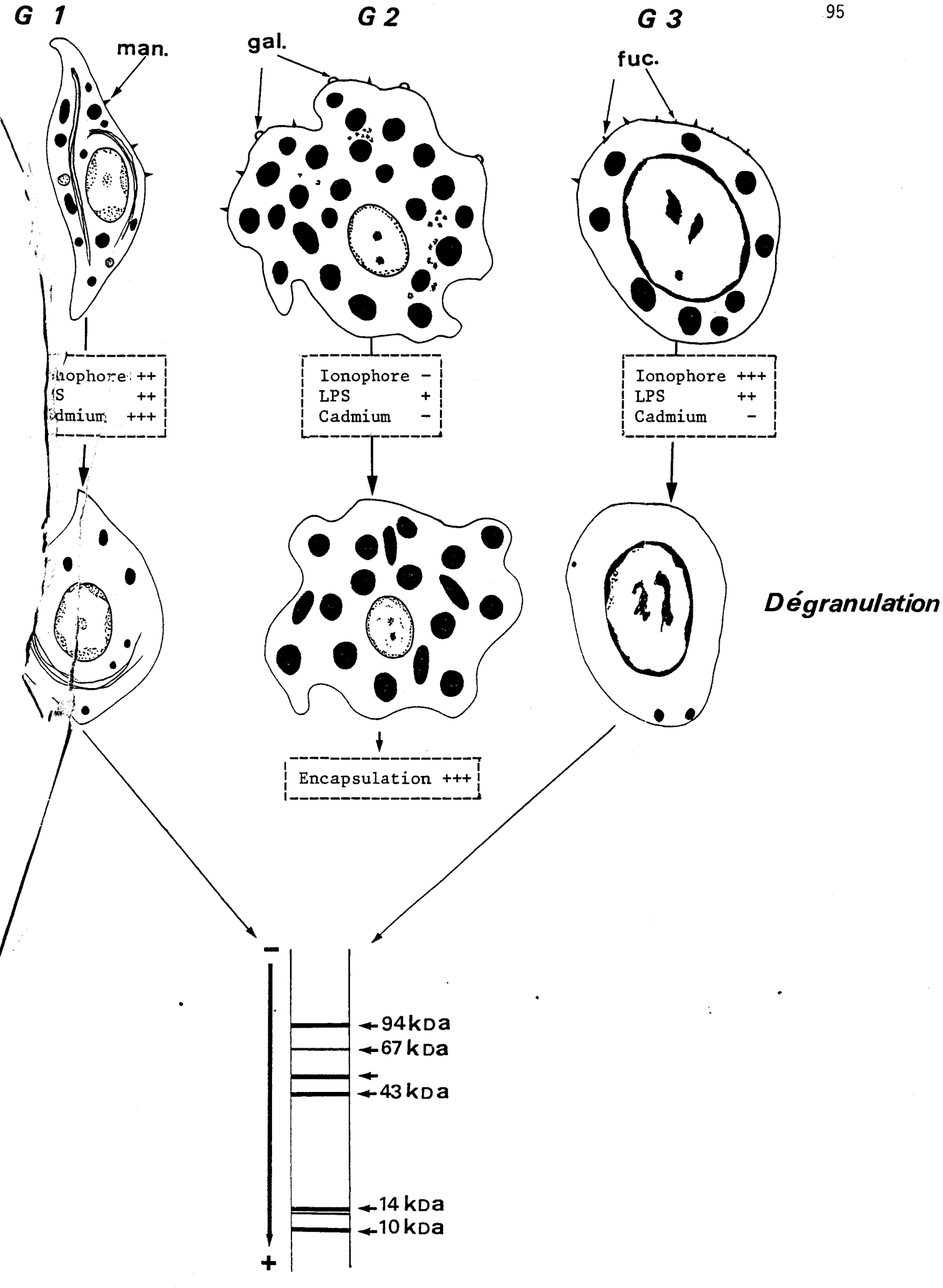
ques (galactose, fucose), les granulocytes libèrent dans le milieu coelomique un certain nombre de protéines. Certaines auront la propriété de se fixer au cadmium et à d'autres métaux lourds et de les neutraliser en les complexant, d'autres par contre seront spécialisées dans la lutte antibactérienne.

Schéma récapitulatif des caractéristiques des 3 catégories de granulocytes (Gr 1, Gr 2, Gr 3) et de leur capacité de dégranulation.

La rangée supérieure résume les principaux aspects morphologiques et la nature des récepteurs lectiniques membranaires des 3 types de granulocytes.

La rangée inférieure présente les transformations résultant des processus de dégranulation.

Sur l'électrophorèse sont figurées plusieurs bandes caractéristiques des produits libérés lors de la dégranulation.


G 1
G 2
G 3
man.
gal.
fuc.
nophore ++
S ++
dmium +++
Ionophore –
LPS +
Cadmium –
Ionophore +++
LPS ++
Cadmium –
Encapsulation +++
Dégranulation
94kDa
67kDa
43kDa
14kDa
10kDa

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Anderson R.S., 1980. Hemolysins and hemagglutinins in the coelomic-fluid of a polychaete annelid Glycera dibranchiata. Biol. Bull., 159, 259-268.

Anderson R.S. et Chain B.M., 1982. Antibacterial activity in the coelomic fluid of marine Annelid Glycera dibranchiata. J. Invert. Pathol., 40, 320-326.

Armstrong P.B. et Rickles F.R., 1982. Endotoxin induced degranulation of the Limulus amoebocyte. Exptl Cell Res., 140, 15-24.

Ashida M., Ishizaki Y. et Ywahana H., 1983. Activation of Prophenoloxidase by bacterial cell walls or by β 1,3 glucans in plasma of the silkworm, Bombyx mori. Biochem. Biophys. Res. Commun., 113, 562-568.

Ashok K.R., 1976. Ultrastructure of the larval hemocytes of the pink bollworm, Pectinophora gossypiella (Saunders) (Lepidoptera : Gelechiidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol., 5, 187-195.

Baert J.-L. et Slomianny M.-C., 1987. Heterosynthetic origin of the major yolk protein , vitellin, in a Nereid Perinereis cultrifera (Polychaeta annelid). Comp. Biochem. Physiol., 88B, 1191-1199.

Bar-Shavit Z., Ofek I. et Goldman R., 1977. Mannose residues on phagocytes as receptors for the attachment of Escherichia coli and Salmonella typhi. Biochem. Biophys. Res., 78, 455-460.

Baskin D.G., 1974. The coelomocytes of Nereid Polychaetes. Contemp. Topics Immunol., 4, 55-64.

Bernard W. et Avrameas S., 1971. Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of concanavalin A. Exptl Cell Res., 64, 232-236.

Best L.C., Martin R.J., Russel R.G. et Preston F.F., 1977. Nature, 267, 850.

Boilly-Marer Y., 1979. Mise en évidence des réactions de rejet après transplantation chez les Néréidiens (Annélides polychètes). C. R. Acad. Sci. Paris, 288, 1411-1414.

Bradford M., 1976. Anal. Biochem., 72, 248.

Brehelin M., Zachary D. et Hoffmann J.A., 1976. Fonction des granulocytes typiques dans la cicatrisation chez l'Orthoptère Locusta migratoria L. J. Microsc. Biol. Cell., 25, 133-136.

Brugal G, 1984. Image analysis of microscopic preparations. In : Methods and achievements in experimental pathology, Jasmin G et Proschek L. Eds., 11, pp. 1-33.

Brugal G., 1985. Samba 200 : Système d'analyse microphotométrique à balayage automatique. Tech. Sci. Inform., 4, 289-295.

Chateaureynaud-Duprat P. et Izoard F., 1973. Etude des mécanismes de défense chez Lumbricus terrestris. C. R. Acad. Sci. Paris, 276, 2859-2862.

Chateaureynaud-Duprat P. et Lestage J., 1980. Etude in vitro des diverses fonctions des leucocytes de Lumbricus terrestris dans les réactions immunitaires. C. R. Acad. Sci. Paris, 291, 889-892.

Cheng T.C., 1977. The role of hemocytic hydrolase in the defense of Molluscs against invading parasites. Haliotis, 8, 193-209.

Cheng T.C. et Rodrick G.E., 1974. Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the soft-shelled clam Mya arenaria. Biol. Bull., 147, 311-320.

Cheng T.C., Rodrick G.E., Foley D.A. et Koehler S.A., 1975. Release of lysozyme from hemolymph cells of Mercenaria mercenaria during phagocytosis. J. Invert. Pathol., 25, 261-265.

Cheng T.C., Chorney M.J. et Yoshino T.P., 1977. Lysozyme activity in the hemolymph of Biomphalaria glabrata challenged with bacteria. J. Invert. Pathol., 29, 170-174.

Cheng T.C., Huang J.W., Karadogan H., Renwrantz L.R. et Yoshino T.P., 1980. Separation of Oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors. J. Invert. Pathol., 36, 35-40.

Cohen S. et Porter R.R., 1964. Heterogeneity of the peptide chains of -globulin. Biochem. J., 90, 278-282.

Cooper E.L., Lemmi C.A. et Moore T.C., 1974. Agglutinins and cellular immunity in earthworms. Ann. N.Y. Acad. Sci., 234, 34-50.

Cooper I.L. et Roch P., 1984. Earthworm leukocyte interactions during early stage of graft rejection. J. Exp. Zool., 232, 67-72.

Cotuk Aysin et Dales R.P., 1984. The effect of the coelomic fluid of the earthworm Eisenia foetida Sav. on certain bacteria and the role of the coelomocytes in internal defence. Comp. Biochem. Physiol., 78A, 271-275.

Dales R.P., 1964. The coelomocytes of the terebellid Polychaete Amphitrite johnstoni. Quart. J. Microsc. Sci., 105, 263-279.

Dales R.P., 1982. Haemagglutinins and haemolysins in the body fluids of Neoamphitrite figulus and Arenicola marina (Annelida Polychaeta). Comp. Biochem. Physiol., 73A, 663-667.

Dales R.P. et Dixon L.R.J., 1982. Polychaetes. In Invertebrate blood cells, Ratcliffe N.A. et Rowley A.F. Eds, I, pp. 35-74.

Davis B.J., 1964. Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404-427.

Dhainaut A., 1966a. Etude ultrastructurale de l'évolution cytoplasmique au cours des premiers stades de l'ovogenèse chez N. pelagica. C. R. Acad. Sci. Paris, 262, 2616-2619.

Dhainaut A., 1966b. Etude ultrastructurale de l'évolution des éléocytes chez Nereis pelagica L. (Annélide Polychète) à l'approche de la maturité sexuelle. C. R. Acad. Sci. Paris, 262, 2740-2743.

Dhainaut A., 1967. Etude de la vitellogenèse chez N. diversicolor par autoradiographie à haute résolution. C. R. Acad. Sci. Paris, 265, 434-436.

Dhainaut A., 1968. Etude par autoradiographie à haute résolution de l'élaboration des mucopolysaccharides acides au cours de l'ovogenèse de Nereis pelagica. J. Microscopie, 7, 1075-1080.

Dhainaut A., 1970. Contribution à l'étude de la gamétogenèse des Néréidiens dans les conditions naturelles et en absence d'hormone cérébrale. Thèse Doct. Sci. Nat. Lille.

Dhainaut A., 1984. Aspects cytophysiologiques des coelomocytes de Néréidiens (Annélides Polychètes). Arch. Anat. microsc. Morph. exp., 73, 133-150.

Dhainaut A., 1988. Haemocytes and coelomocytes. In Forschritte der Zoologie. Hartman et Westheide Eds (sous presse).

Dhainaut A. et Porchet M., 1977. Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de P. cultrifera (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. II. Etude autoradiographique des ovocytes jeunes. Biol. Cell., 28, 233-240.

Dhainaut-Courtois N., Nejmeddine A., Baert J.-L. et Dhainaut A., 1987. Localisation immunocytochimique en microscopie électronique d'une protéine complexant le cadmium chez un ver marin (Nereis diversicolor O.F. Müller). C. R. Acad. Sci. Paris, 305, Sér. III, 237-241.

Dupasquier L., 1971. Etude comparée d'un facteur cytolytique humoral chez une larve d'Amphibien et chez un Oligochète. Arch. Zool. Exp. Gen., 112, 81-87.

Dupasquier L. et Duprat P., 1968. Aspects humoraux et cellulaires d'une immunité naturelle non spécifique chez l'Oligochète Eisenia fetida (Lumbricidae). C. R. Acad. Sci. Paris, 266, 538-541.

Dwyer D.M., 1974. Lectin binding saccharides on a parasitic protozoan. Science, 184, 471-472.

Elferink J.G.R., 1979. Chloropromazine inhibits phagocytosis and exocytosis in rabbit polymorphonuclear leukocytes. Bioch. Pharmacol., 28, 965-968.

Elferink J.G.R., Deierkauf M. et Van Steveninck J., 1986. Toxicity of organotin compounds for polymorphonuclear leukocytes : The effect on phagocytosis and exocytosis. Bioch. Pharmacol., 35, 3727-3732.

Emptoz H., Terrenoire M. et Tounissoux D., 1978. Indetermination measure for a sequential identification process. Proc. 4th Intern. Conf. Pattern Recogn., 262-264.

Engström A., Engström P., Tao S.J., Carlsson A. et Bennich H., 1984. Insect immunity, the primary structure of the antibacterial protein attacin F and its relation of two native attacins from Hyalophora cecropia. EMBO J., 3, 2065-2070.

Feltz A., 1986. Multiplicité des perméabilités calciques. J. Physiol., 81, 162-167.

Fitzgerald S.W. et Ratcliffe N.A., 1982. Evidence for the presence of subpopulations of Arenicola marina coelomocytes identified by their selective response towards Gram+ Ve and Gram- Ve bacteria. Dev. Comp. Immunol., 6, 23-24.

Flyg C., Dallhammar G., Rasmuson B. et Boman H.G., 1987. Inducible antibacterial activity in drosophila. Insect Biochem., 17, 153-160.

Foley D.A. et Cheng T.C., 1977. Degranulation and other changes of Molluscan granulocytes associated with phagocytosis. J. Invert. Pathol., 29, 321-325.

Fontaine F., Gevaert M.-H. et Porchet M., 1984. Distribution of neutral lipids in coelomic constituents during oogenesis of Perinereis cultrifera (Annelida Polychaeta). Comp. Biochem. Physiol., 77A, 45-50.

Freimer N.B., Demundsdottir H.M., Blackwell C.C., Sutherland I.W., Graham L. et Weir D.M., 1978. The role of cell wall carbohydrates in binding of micro-organisms to mouse peritoneal exudate macrophages. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 36B, 53-57.

Fretter V., 1953. Experiments with radioactive strontium (90 Sr) on certain Mollusca and Polychaetes. J. Mar. Biol. Assoc. UK, 32, 367-384.

Gebbinck K., 1980. Some observations on concanavalin A receptors on free cells of marine Invertebrates. Dev. Comp. Immunol., 4, 33-42.

Gothelf Y., Sharon N. et Gazit E., 1986. Fractionation of human bone-marrow mononuclear cell with peanut agglutinin phenotypic characterization with monoclonal antibodies. Human Immunol., 17, 37-44.

Hoffmann D., Hultmark D. et Boman H.G., 1981. Galleria mellonella and other Lepidoptera have cecropia-P 9-like factors active against gram negative bacteria. Insect Biochem., 11, 537-548.

Huber H. et Douglas S.D., 1973. Opsonization the role of plasma membrane receptors sites on mononuclear cells. In Non specific factors influencing jost resistance. Braun W. et Unger J. Eds, Karger, Basel, pp. 11-23.

Hulmark D., Steiner H., Rasmuson T. et Boman H.G., 1980. Insect immunity : Purification and properties of three inducible bactericidial proteins from hemolymph of immunized pupae of Hyalophora cecropia. Eur. J. Biochem., 106, 7-16.

Jeong K.H. et Heyneman K., 1976. Leukocytes of Biomphalaria glabrata : morphology and behavior of granulocytic cells in vitro. J. Invert. Pathol., 28, 357.

Johansson M.W. et Söderhäll K., 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. J. Comp. Physiol, B, 156, 175-181.

Joky A., Matrigon-Gondran M. et Benex J., 1983. Fine structural differences in the amoebocytes of Biomphalaria glabrata. Dev. Comp. Immunol., 7, 669-672.

Jolles P. et Zuilis S., 1960. Purification et étude comparée de nouveaux lysozymes de poule et de Nephthys hombergii. B.B.A., 39, 212-217.

Kaaya G.P., Flyg C. et Boman H.G., 1987. Induction of cecropin and attacin-like antibacterial factors in the haemolymph of Glossina morsitans morsitans. Insect Biochem., 17, 309-315.

Karnovsky J.J. et Graham R.C., 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastuctural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem., 14, 291-307.

BU LILLE

Keppi E., Zachary D., Robertson M., Hoffmann D., Hoffmann J.A., 1986a. Induced antibacterial proteins in the haemolymph of Phormia terranovae (Diptera). Insect Biochem., 26, 395-402.

Keppi E., Dimarcq J.L., Lambert J., Zachary D., Reichhart J.M., Hoffmann D., Keller R., Hoffmann J., 1986b. Recherches sur les mécanismes de défense antibactérienne chez les Insectes : isolement des peptides antibactériens dans l'hémolymphe du Diptère Phormia terranovae. C. R. Acad. Sci. Paris, 303, Sér. III, 155-160.

Kermack D.M., 1955. The anatomy and physiology of the gut of the Polychaete Arenicola marina. Proc. Zool. Soc. London, 125, 347-381.

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature, 227, 680-685.

Lassègues M., Roch P., Cadoret M.-A. et Valembois P., 1984. Mise en évidence des protéines hémolytiques et hémagglutinantes spécifiques de l'albumen des cocons du Lombricien Eisenia fetida. C. R. Acad. Sci. Paris, 299, Sér. III, 691-696.

Lawson D., Fewtrell C. et Raff M., 1978. Localized mast cell degranulation induced by concanavalin A-sepharose beads. J. Cell Biol., 79, 394-400.

Leonard C., Söderhäll K; et Ratcliffe N.A., 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of Blaberus craniifer haemocytes. Insect Biochem., 15, 803-810.

Linthicum D.S., Stein E.A., Marks D.H. et Cooper E.L., 1977. Electron microscopic observations of normal coelomocytes from the earthworm Lumbricus terrestris. Cell Tissue Res., 185, 315-330.

Loor F., 1973. Lectin-induced lymphocyte agglutination. An active cellular process. Exptl Cell Res., 82, 415-425.

M'Béri M., Debray H., Dhainaut A. et Porchet-Henneré H., 1988a. Distribution and nature of membrane receptors for different plant lectins in the coelomocyte subpopulations of the Annelida Nereis diversicolor. Dev. Comp. Immunol., 12, 1-15.

M'Béri M., Debray H. et Dhainaut A., 1988b. Separation of two different populations of granulocytes of Nereis diversicolor (Annelida) by selective agglutination with lectins. Dev. Comp. Immunol. (sous presse).

McKay D. et Jenkin C.R., 1970. Immunity in the Invertebrates. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (Parachaeraps bicarinatus). Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 48, 139.

Mead G.P., Ratcliffe N.A. et Renwrantz L.R., 1986. The separation of Insect haemocytes types on percoll gradients ; methodology and problems. J. Insect Physiol., 32, 167-171.

Miegeville M., Robert R., Bouillard C., Avranche P., 1987. Utilisation de billes de latex marquées par les lectines dans la mise en évidence des sites récepteurs salmonelle Shistosoma mansoni. C. R. Acad. Sci. Paris, 305, Sér. III, 255-258.

Mohandas A. et Cheng T.C., 1985. An electron microscope study of the structure of lysosomes released from Mercenaria mercenaria granulocytes. J. Invert. Pathol., 46, 332-334.

Mohandas A., Cheng T.C. et Cheng J.B., 1985. Mechanism of lysosomal enzyme release from Mercenaria mercenaria granulocytes : A scanning electron microscope study. J. Invert. Pathol., 46, 189-197.

Monsigny M. et al., 1976. Protides of the biological fluids. Pecters H. Ed., Pergamon Press, Oxford, 24, pp. 815-818.

Mürer E.H., Levin J. et Holme R., 1975. Isolation and studies of the granules of the amebocytes of Limulus polyphemus, the Horseshoe crab. J. Cell Physiol., 86, 533-542.

Nappi A.J. et Silvers M., 1984. Cell surface changes during parasite encapsulation and tymorigenesis in Drosophila. Science, 225, 1166.

Nejmeddine A., Dhainaut-Courtois N., Baert J.-L., Sautière P., Fournet B. et Boulenguer P., 1988. Purification and characterization of a cadmium-binding protein from Nereis diversicolor (Annelida, Polychaeta). Comp. Biochem. Physiol., 89C, 321-326.

Novogrodsky A. et Katchalsky E., 1973. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 70, 2515.

Ochoa j.L., 1979. Pathol. Biol., 27, 103-113.

Ossermann E.F. et Lawlor D.P., 1966. J. Exp. Med., 124, 21.

Otto I., 1988. Le calcium, un messager universel. Sciences et Vie, Mars 1988, 60-61.

Papanicolaou G.N., 1963. Atlas of exfoliative cytology. Harvard University Press, Cambridge.

Parrinello N. et Rindone D., 1981. Studies on the natural hemolytic system of the annelid worm Spirographis spallanzanii vivrani (Polychaeta). Dev. Comp. Immunol., 5, 33-42.

Porchet M., 1970. Relation entre cycle hormonal cérébral et évolution ovocytaire chez Perinereis cultrifera. Gen. Comp. Endocrinol., 15, 220-231.

Porchet M. et Cardon C., 1972. Régulation de l'activité endocrine cérébrale chez les Nereidae (Annélides Polychètes). C. R. Acad. Sci., 275, 2375-2378.

Porchet M. et Durchon M., 1968. Influence de la maturité génitale sur la régénération postérieure chez P. cultrifera. C. R. Acad. Sci., 267, 194-196.

Porchet-Henneré E. et M'Béri M., 1987. Cellular reactions of the Polychaete Annelid Nereis diversicolor against coelomic parasites. J. Invert. Pathol., 50, 58-66.

Porchet-Henneré E., M'Béri M., Dhainaut A. et Porchet M., 1987a. Ultrastructural study of the encapsulation-response of the Polychaete Annelid Nereis diversicolor. Cell Tissue Res., 248, 463-471.

Porchet-Henneré E. Nejmeddine A., Baert J.-L. et Dhainaut-Courtois N., 1987b. Selective immunostaining of type I granulocytes of the Polychaete Annelid Nereis diversicolor by a monoclonal antibody against a cadmium-binding protein (MP II). J. Biol. Cell., 60, 259-261.

Poretz R.D., Tang M. et Vucenik I., 1986. The separation of lymphocyte subpopulations with lectins. Immunol. Invest., 15, 521-529.

Postlethwait J.H., Saul S.H. et Postletwait J.A., 1988. The antibacterial immune response of the medfly, Ceratitis capitata. J. Insect Physiol., 34, 91-96.

Rattenbury J.M., 1966. The coelomocytes of Hermodice carunculata (Polychaeta : Amphinomidae) in relation to digestion and excretion. Can. J. Zool., 44, 377-389.

Redziniak G., Leclerc M., Panijel J. et Monsigny M., 1978. Separation of two different populations of axial organ cells of Asterias rubens by the use of lectins. Biochem., 60, 525-527.

Reisfeld R.A., Dray S. et Nisonoff A., 1965. Differences in amino acid composition of rabbit globulin light polypeptid chains controlled by allelic glues. Immunochem., 2, 155-161.

Reisner Y. et Sharon N., 1980. Cell fractionation by lectins. TIBS Février, 29-31.

Reisner Y., Ravid A., Sharon N., 1976. Use of soybean agglutinin for the separation of mouse B and T lymphocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 72, 1585-1591.

Renwrantz L.R. and Cheng T.C., 1977. Identification of agglutinin-receptors on hemocytes of Mytilus edulis. J. Invert Pathol., 29, 96-99.

Renwrantz L.R. 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.

Renwrantz L.R., Daniels J. et Hansen P.D., 1985. Lectin-binding to hemocytes of Mytilus edulis. Develop. Comp. Immunol., 9, 203-210.

Reynolds R., 1963. The rise of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17, 208-212.

Roch P. et Valembois P., 1978. Evidence for concanavalin A receptors and their redistribution on Lumbricid leukocytes. Dev. Comp. Immunol., 2, 51-64.

Roch P., 1979. Protein analysis of earthworm coelomic fluid. I. Polymorphic system of the natural hemolysin of Eisenia fetida. Dev. Comp. Immunol., 8, 599-608.

Roch P., 1980. Thèse Doctorat Etat, n° 648, 127 p.

Roch P., Davant N., Lassègues M., 1984. Isolation of agglutinins from lysins in earthworm coelomic fluid by gel filtration followed by chromatofocusing. J. Chromatogr., 290, 231-235.

Rofolovitch M., Amira M. et Ginsburg H., 1987. Degranulation of in vitro differentiated mast cells stimuted by two monoclonal IgE specificities. Eur. J. Immunol., 17, 385-392.

Russel K., Hostetter P. et Cooper E.L., 1972. Coelomocytes as effector cell in earthworm immunity. Immunol. Commun., 1, 155-183.

Russel C.S., Rodriguez J. et Lai P.S., 1983. Hemagglutinin activity in Nereis coelomic fluid. Comp. Biochem. Physiol., 75A, 57-64.

Schoenberg D.A. et Cheng T.C., 1980. Lectin-binding specificities of hemocytes from two strains of Biomphalaria glabrata. Dev. Comp. Immunol., 4, 617.

Schoenberg D.A. et Cheng T.C., 1981. Lectin-binding specificities of Bulinus truncatus hemocytes as demonstrated by microhemadsorption. Develop. Comp. Immunol., 5, 229.

Schrevel J., Kieda C., Caigneaux E., Gros D., Delmotte F. et Monsigny M., 1979. Visualization of cell surface carbohydrates by a general two-step lectin technique. Lectins and glycosylated cytochemical markers. J. Biol. Cell. 36, 259-266.

Schuber I. et Messner B;, 1971. Untersuchungen über das Vorkomenm von lysozyme bei Anneliden. Zool. Zahrb. Physiol., 76, 36-50.

Selsted M.E., 1980. Anal.. Biochem., 67, 109.

Slater G.G., 1969. Stable pattern formation and determination of molecular size by pou-limit electrophoresis. Anal. Chem., 41, 1039-1041.

Slutsky B., Jarvis D., Bibb P., Feldberg R.S. et Cochrane D.E., 1987. Viability and recovery from degranulation of isolated rat peritoneal mast cells. Exptl Cell Res., 168, 63-78.

Sminia T., Wissemus A.A. et Van Der Knaap W.P.W., 1981. Recognition of foreignness by blood cell of the fresh-water snail Lymnaea stagnalis, with special reference to the role and structure of the cell coat. J. Invert. Pathol., 38, 175-183.

Smith V.J., Söderhäll K. et Hamilton M., 1984. β 1,3-glucan induced cellular defence reactions in the shore crab Carcinus maenas.Comp. Biochem. Physiol., 77A, 635-639.

Smolen J.E., 1986. Molecular mechanisms of leukocytes stimulation : contributions of permeabilized cell systems. Leuk. Emigr. Seq., 140-149.

Söderhäll K., 1981. Fungal cell wall β 1-3 glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate. Dev. Comp. Immunol., 5, 565-573.

Söderhäll K. et Smith V.J., 1983. Separation of the haemocyte population of Carcinus maenas and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunol., 7, 229-239.

Söderhäll K., Smith V.J., Johansson M.W., 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocytes populations of two crustaceans : evidence for cellular cooperation in the defence reactions of Arthropods. Cell Tissue Res., 245, 43-49.

Stang-Voss C.H., 1971. Zur ultrastruktur der bluitzellen wirbelloser tiere IV. Die Hämocyten von Eisenia foetida L. (Sav.) (Annelidae). Z. Zellforsch., 117, 451-462.

Stein E., Avtalion R.R. et Cooper E.L., 1977. The coelomocytes of earthworm Lumbricus terrestris : Morphology and phagocytic properties. J. Morph., 153, 463-478.

Stein E. et Cooper E.L., 1981. The role of opsonins in phagocytosis by coelomocytes of the earthworm Lumbricus terrestris. Dev. Comp. Immunol., 5, 415-425.

Stein E.A., Wojdani A. et Cooper E.L., 1982. Agglutinins in the earthworm Lumbricus terrestris : naturally occuring and induced. Dev. Comp. Immunol., 6, 407-421.

Stein E., Younai S. et Cooper E.L., 1986. Bacterial agglutinins of earthworm Lumbricus terrestris. Comp. Biochem. Physiol., 84B, 409-415.

Taki H.,Baert J.-L. et Dhainaut A., 1988. Synthesis and release of vitellogenin-associated phospholipids by the coelomocytes of Perinereis cultrifera (Annelida Polychaeta) (sous presse).

Talalay P., Fishman W.H., et Huggins C., 1946. Chromatogenic substrates. II. Phenolphthalein glucuronic acid as substrate for the assay of glucuronidase activity. J. Biol. Chem., 166, 757.

Teodorescu M., 1984. Binding of bacteria in lymphocyte subpopulations : role of lectin-carbohydrate interactions. J. Biol. Cell, 51, 251-258.

Terrenoire M. et Tounissoux D., 1979. Processus non arborescent pour la reconnaissance d'une variable continue. 2ème Congrès AFCET-IRIA : Reconnaissance des formes et intelligence artificielle, Toulouse, T2, 410-417.

Tsukada T. et Yoshino M., 1987. β-glucuronidase from Ampullaria. Purification and kinetic properties. Comp. Biochem. Physiol., 86B, 565-569.

Tuckova L., Rejnek J., Sima P. et Ondrejova R., 1986.Lytic activities in coelomic fluid of Eisenia foetida and Lumbricus terrestris.Dev. Comp. Immunol., 10, 181-189.

Valembois P., 1971. Etude ultrastructurale des coelomocytes du Lombricien Eisenia fetida Sav. Bull. Soc. Zool. Fr., 96, 59-72.

Valembois P. et Roch P., 1977. Identification par autoradiographie des leucocytes stimulés à la suite d'une plaie ou de greffes chez un ver de terre. Biol. Cell, 28, 81-82.

Valembois P., Roch P., Lassègues M. et Cassand P., 1982. Antibacterial activity of the hemolytic system from the earthworm Eisenia fetida Andrei. J. Invert. Pathol., 40, 21-27.

Valembois P., Roch P. et Lassègues M., 1984. Simultaneous existence of hemolysins and hemagglutinins in the coelomic fluid and cocoon albumen of the earthworm Eisenia fetida Andrei. Comp. Biochem. Physiol., 78A, 141-145.

Valembois P., Lassègues M., Roch P. et Vaillier J., 1985. Scanning electron microscopic study of the involvement of coelomic cells in earthworm antibacterial defense. Cell Tissue Res., 240, 479-484.

Valembois P., Roch P. et Lassègues M., 1986. Antibacterial molecules in Annelids. Immunity in Invertebrates. Brehelin M. Ed., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 74-93.

Wojdani A., Stein E.A., Lemmi C.A. et Cooper E.L., 1982. Agglutinins and proteins in the earthworm, Lumbricus terrestris, before and after injection of erythrocytes, carbohydrates and other materials. Dev. Comp. Immunol., 6, 613-614.

Wright D.G., Malawista S.E., 1972. The mobilization and extracellular release of granular enzyme from human leukocytes during phagocytosis. J. Cell Biol., 53, 788-797.

Wright D.G.,Kauffmann J.C., Terpstra G.K., Graw R.G., Deisseroth A.D. et Gallin J.I., 1978. Mobilization and exocytose of specific (secondary) granules by human neutrophils during adherence to nylon wool in filtration leukapheresis (FL). Blood, 52, 770-782.

Wright D.G. et Gallin J.I., 1979. Secretory responses of human neutrophils : exocytosis of specific (secondary) granules by human neutrophils during adherence in vitro and during exudation in vivo. J. Immunol., 123, 285-294.

Yoshino T.P., 1981. Comparison of concanavalinA-reactive determinant on hemocytes of two Biomphalaria glabrata snail stocks : receptor binding and redistribution. Dev. Comp. Immunol., 5, 229.

Yoshino T.P., 1983. Lectins and antibodies as molecular probes of Molluscan haemocytes surface membrane. Dev. Comp. Immunol., 7, 641-644.

Yoshino T.P., Renwrantz L.R. et Cheng T.C., 1979. Binding and redistribution of surface membrane receptors for concanavalin A on oyster hemocytes. J. Exp. Zool., 297, 439.

Zachary D. et Hoffmann D., 1984. Lysozyme is stored in the granules of certains hemocytes types in Locusta. J. Insect Physiol., 30, 405-411.

Résumé

Dans la population des cellules coelomiques de Nereis diversicolor, les critères cytologiques et l'utilisation de l'analyseur d'images (SAMBA 200) ont abouti à la caractérisation de 3 catégories de granulocytes (GR I, GR II, GR III).

Par l'utilisation de lectines la distribution et la nature de récepteurs membranaires des granulocytes ont pu être précisées. Les granulocytes II fixent les lectines spécifiques du galactose, les granulocytes III, celles spécifiques du fucose. L'agglutination provoquée par ces ligands a permis d'obtenir la purification de ces sous-populations de granulocytes.

L'action de divers facteurs (ionophore-calcium, LPS, cadmium, etc.) provoque la dégranulation des granulocytes. Leur réponse varie en fonction du stimulus utilisé. L'incubation préalable avec les lectines modifie les capacités de réponse.

L'analyse par électophorèse a permis d'identifier et d'établir une comparaison entre les protéines des granulocytes et celles libérées dans le milieu. Le liquide coelomique des animaux témoins renferme peu de protéines à activité anti-bactérienne. Celles-ci sont libérées (dégranulation) par immunisation (bactéries) ou intoxication préalable (cadmium). La présense du lysozyme et de la β-glucuronidase a été établie. Par test antibactériogramme, il a en outre été démontré l'existence d'une molécule anti-bactérienne à caractère basique, d'un poids moléculaire compris entre 20 et 10 kDa, en cours de purification.