

**I F R E M E R**

**Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins  
(LBEIM)**

**Unité de Recherche en Pathologie Immunologie  
et Génétique Moléculaire  
(URPIGM)**

**COMPTE-RENDU D'ACTIVITE  
1990**

**B.P. 133 – 17390 LA TREMBLADE (France)**

**Tél. : 46.36.30.07**

**Fax : 46.36.18.47**



# SOMMAIRE

|  | Pages |
|--|-------|
| <b>PERSONNELS</b>  | 1     |
| <b>THESARDS</b>  | 1     |
| <b>STAGIAIRES</b>  | 1     |
| <b>PRINCIPAUX RESULTATS</b>  | 2     |
| <b>1. PATHOLOGIE</b>   | 2     |
| 1.1. Diagnostic/Epidémiologie  | 2     |
| <i>Bonamia ostreae</i>   | 2     |
| <i>Marteilia refringens</i>  | 3     |
| Vibrio P1  | 3     |
| Lymphocystis-like virus  | 4     |
| Rickettsiales  | 5     |
| <i>Perkinsus atlanticus</i>  | 5     |
| 1.2. Pathologie expérimentale  | 6     |
| Bonamiose  | 6     |
| Viroses  | 7     |
| 1.3. Culture cellulaire  | 8     |
| <b>2. IMMUNOLOGIE ANTI-INFECTIEUSE DES MOLLUSQUES<br/>ET DES CRUSTACES</b> | 9     |
| 2.1. Etude des effecteurs cellulaires et humoraux                          | 10    |
| 2.2. Recherche de gènes et de protéines immunitaires                       | 11    |

|   |    |
|---|----|
| <b>3. TRANSGENOSE</b>   | 12 |
| <b>4. ENDOCRINOLOGIE</b>  | 13 |
| <b>5. PUBLICATIONS D'URPIGM (1990)</b>  | 14 |
| 5.1. Revues avec comité de lecture  | 14 |
| 5.2. Revues sans comité de lecture  | 15 |
| 5.3. Communications à des colloques   | 16 |
| <b>6. ENSEIGNEMENTS</b>   | 17 |
| <b>7. MISSIONS A L'ETRANGER</b>   | 17 |
| <b>8. MANIFESTATIONS ORGANISEES PAR L'UNITE</b>                               | 18 |
| <b>9. EXPERTISES</b>  | 18 |
| <b>10 FORMATIONS</b>  | 18 |
| <b>11. PRINCIPALES VISITES DE L'UNITE PAR DES<br/>    VISITEURS ETRANGERS</b> | 19 |

En octobre 1990 le laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins (LBEIM) a été créé, il regroupe les anciens laboratoires :

- Laboratoire National Ecosystèmes Conchylicoles (LEC)
- Laboratoire Pathologie et Génétique des Invertébrés Marins (LPGIM)
- Laboratoire Régional Conchylicole Loire-Gironde (REGI).

Le nouveau laboratoire sous la responsabilité de Maurice HERAL est organisé en 4 unités de recherche :

- Unité de Recherche Ecosystèmes Aquacoles (UREA), sous la responsabilité de Maurice HERAL,
- Unité de Recherche en Pathologie Immunologie et Génétique Moléculaire (URPIGM), sous la responsabilité d'Eric MIALHE,
- Unité de Recherche en Génétique Quantitative et Eclosion (URGE), sous la responsabilité d'André GERARD,
- Unité de Recherche Régionale Aquacole (URRA), sous la responsabilité d'Alain BODOY.

Le rapport d'activité du laboratoire est présenté par chaque unité de recherche. Ce document concerne l'Unité de Recherche en Pathologie Immunologie et Génétique Moléculaire.

# **URPIGM**

Unité de Recherche en Pathologie Immunologie  
et Génétique Moléculaire

## **PERSONNELS :**

### **SCIENTIFIQUES :**

Eric MIALHE (responsable unité)  
Evelyne BACHERE  
Viviane BOULO  
Jean-Paul CADORET (1/2 temps)  
Ginette CAILLETEAU (1/2 temps)  
Thierry NOEL

### **ADMINISTRATIFS :**

Yvonne FAVINO, documentation, (1/4 temps)  
Yvette SIMIAN, secrétariat, (1/3 temps)

## **THESARDS :**

Dominique HERVIO, bourse IFREMER, Université de Clermont-Ferrand (thèse 1991).

Sylvain GENDREAU, bourse SANOFI, Université de Brest (thèse 1992).

Danièle NOEL, contrat CEE, Université de Bordeaux (thèse 1992).

Marc OHRESSER, bourse ELF, Université Aix-Marseille II (thèse 1992).

Kristell COUSIN, bourse IFREMER, Université de Caen, (thèse 1993),  
codirection avec M. Mathieu.

## **STAGIAIRES :**

Jenny RODRIGUEZ (Equateur), bourse du gouvernement français, stage de DEA, Université de Clermont-Ferrand.

Rose-Marie LE DEUFF, stage de DEA, Université de Bordeaux.

Ren-Shiang LEE (Taiwan), bourse du gouvernement français, stage d'insertion en vue de préparation de DEA.

Louise GOGGIN (Australie), bourse du gouvernement français, stage post-doctoral.

Jean-Michel DELECHENEAU, stage Intechmer, Cherbourg.

Isabelle LACROIX, stage post-BTS, Bordeaux.

Laure MACHEFAUX, stage BTS, Quimper.

## PRINCIPAUX RESULTATS

### 1. PATHOLOGIE

#### *1.1 Diagnostic / Epidémiologie*

L'activité de préparation de réactifs spécifiques et de leur utilisation pour le diagnostic et la caractérisation des agents pathogènes a été poursuivie. Parallèlement aux méthodes immunologiques basées sur des anticorps polyclonaux et monoclonaux, plusieurs techniques utilisant des sondes nucléiques ont été développées en raison de la complémentarité de leurs applications (ref. Rochefort, Martigues, Vigo). Par ailleurs, il faut noter que cette stratégie de développement de techniques de diagnostic a été considérée comme prioritaire par le groupe de travail "pathology and diseases of marine organisms" du CIEM (ref) ainsi que par la CEE (DG XIV programme AIR). En effet, la mise en place d'une législation internationale sur la prophylaxie des maladies de mollusques repose nécessairement sur des méthodes de diagnostic standardisées et efficaces quelques soient les types d'agents pathogènes. Les travaux de l'unité ont concerné plusieurs agents dont la nature pathogène est reconnue ou potentielle.

#### ***Bonamia ostreae :***

Le clonage partiel du génome de ce parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* a permis de disposer de sondes nucléiques marquées par la peroxydase. La sensibilité de ces réactifs utilisés selon la technique de dot-blot s'est avérée équivalente à celle des anticorps monoclonaux appliqués à un immunodosage enzymatique de type ELISA. En pratique cela signifie que les phases précoces d'infection correspondant environ aux deux premiers mois ne peuvent être diagnostiquées. C'est pourquoi le séquençage de fragments clonés et la synthèse d'oligonucléotides spécifiques ont été entrepris afin de tester la technique de P.C.R. (polymerase chain reaction) dont la sensibilité théorique est de l'ordre de 1 génome, ce qui a été récemment établi en pathologie humaine. Cette technique, originale en pathologie des mollusques, est maintenant parfaitement maîtrisée et sa validation clinique est en cours (ref).

Une demande de coopération a été formulée par un collègue de Nouvelle-Zélande (M. Hine) pour tester l'ensemble de ces réactifs vis-à-vis du parasite *Bonamia* sp. qui provoque actuellement des mortalités massives sur l'huître *Tiostrea lutaria*.

Dans le cadre d'une coopération franco-canadienne (Ministry of Fisheries and Ocean) il a été prévu de tester ces sondes nucléiques sur le protozoaire *Mikrocytos...* pathogène de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* et responsable de mortalités sur la côte ouest du Canada.

### ***Marteilia refringens* :**

Les parasites du genre *Marteilia* infectent la glande digestive de plusieurs espèces de bivalves d'intérêt économique. Leur diagnostic est aléatoire dans les phases précoces d'infection car les parasites sont alors difficiles à détecter en histologie. De plus, les relations entre les parasites associés aux différentes espèces hôtes sont inconnues, ce qui est problématique d'un point de vue épidémiologique pour identifier des hôtes réservoirs. Le travail de préparation et de séquençage de sondes pour *Marteilia refringens* a eu pour but de disposer d'une méthode de diagnostic sensible et de comparaison des souches parasitaires. Les résultats acquis en collaboration avec V. Lubat (Université de Montpellier) ont révélé par ailleurs l'existence de séquences génomiques répétées similaires à celles caractérisées chez d'autres groupes de protozoaires d'importance médicale (ref).

Des comparaisons taxonomiques entre souches de *Marteilia* et la validation clinique des sondes nucléiques sont en cours, ces travaux étant réalisés en collaboration avec les pathologistes espagnols (Vigo) et australiens (coopération URPIGM/Université du Queensland).

### ***Vibrio P1* :**

Le diagnostic du *Vibrio P1*, responsable de la maladie de l'anneau brun chez les palourdes *Tapes philippinarum* et *T. decussatus*, a été initialement établi sur la base de deux étapes successives de culture sur milieux gélosés, des colonies devant être ensuite caractérisées biochimiquement sur galerie API. En pratique, le délai d'un tel diagnostic nécessite plusieurs jours et un

nombre très limité de colonies peut être analysé. C'est pourquoi des anticorps monoclonaux ont été produits selon la technique d'hybridation lymphocytaire, le criblage des hybridomes étant réalisé selon un test Elisa comparatif de la réactivité des anticorps vis-à-vis-du *Vibrio* P1 et des principales bactéries pathogènes en aquaculture. En bilan ce travail, qui a été conçu en collaboration avec J.L. Nicolas, a conduit à l'obtention de plus de vingt hybridomes spécifiques du *Vibrio* P1. Leur application au diagnostic rapide de ce pathogène a été entreprise selon une méthode de type ELISA pratiquée sur des colonies bactériennes transférées sur membrane de nitrocellulose, la validation clinique de ce diagnostic étant basée sur des corrélations entre identification biochimique et immunologique (collaboration J.L. Nicolas et D. Blatteau)

### ***Lymphocystis-like virus :***

Des mortalités d'huîtres ont été plusieurs fois associées à des virus de type *Lymphocystis (Iridoviridae)* ce qui a conduit à les considérer comme des agents pathogènes majeurs en raison de leur impact potentiel sur les stocks de *C. gigas*. Aucune souche virale spécifique d'huître n'étant actuellement disponible, des réactifs ont été préparés à partir d'un *Lymphocystivirus* de poisson (LDV) similaire d'un point de vue ultrastructural à ceux décrits chez les mollusques. Des anticorps polyclonaux et monoclonaux ont été produits, mais la spécificité souvent stricte des réactifs immunologiques a conduit à préparer également des sondes nucléiques qui ont un spectre de spécificité plus large en raison des homologues de séquences existant entre les virus d'une même famille. Ainsi le génome du LDV a été cloné, ce qui permet de disposer d'une quantité illimitée de sondes froides applicables également à la recherche de virus de type *Lymphocystis* dans des échantillons biologiques. Par ailleurs, sur la base de séquences virales conservées, des oligonucléotides ont été synthétisés et utilisés en PCR pour mettre en évidence des séquences virales dans des extraits d'embryons de *C. gigas* artificiellement contaminés par de l'ADN de LDV. Selon le protocole établi il apparaît possible de détecter quelques génomes viraux (ref).

Des contacts sont établis avec R. Elston (USA) qui a décrit récemment la maladie OVVD due à un *Lymphocystivirus-like* chez des larves de *C. gigas*.

### ***Rickettsiales* :**

La rickettsiose branchiale de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* est une infection dont l'étude mérite d'être poursuivie afin de comprendre son impact réel sur cette espèce, plusieurs infections de ce type étant reconnues chez les mollusques comme certainement pathogènes, peut-être en synergie avec des facteurs environnementaux. Concernant la transmission de la rickettsiose, qui avait été établie être de type horizontal, il a été mis en évidence qu'elle devait essentiellement s'effectuer au cours des premiers mois de la vie de l'animal. En effet, des coquilles pré-élevées en Méditerranée présentent, après plusieurs mois d'élevage en zone contaminée, des taux et des degrés d'infection extrêmement faibles comparativement aux animaux témoins directement élevés dans cette zone.

Le diagnostic de la rickettsiose sur frottis de tissus branchiaux selon une technique d'immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps monoclonal a été validé par comparaison à l'examen de coupes histologiques lors d'une étude clinique. A partir d'une banque génomique partielle, des sondes nucléiques et oligonucléotidiques ont été préparées afin de disposer des outils nécessaires à des recherches ultérieures sur l'épidémiologie, la taxonomie et la pathogénicité de ces microorganismes.

### ***Perkinsus atlanticus* :**

Dans le cadre d'un stage post-doctoral au sein de l'unité, L. Goggin (Australie) a réalisé une étude épidémiologique sur les protozoaires *Perkinsus* (Apicomplexa). Il a été montré que le parasite *P. atlanticus*, responsable de mortalités massives de la palourde *Tapes decussatus* au Portugal, est présent dans plusieurs populations de cette espèce en France, les prévalences étant dans certains cas voisines de 100 %. Grâce au soutien de la DRCI le stage de L. Goggin a été prolongé afin d'associer ses connaissances des parasites *Perkinsus* aux compétences de l'unité pour la purification des parasites et la préparation de réactifs spécifiques. Ce travail devrait être organisé ultérieurement avec les pathologistes portugais (C. Azevedo, Porto) et canadiens (S. Mc Gladerry), ces derniers étant préoccupés par une parasitose à *Perkinsus* chez les pétoncles.

## **Remarques :**

Il apparaît que des réactifs de diagnostic sont disponibles pour la majorité des agents pathogènes majeurs de mollusques. Des modalités d'organisation en développement et production devront être trouvées pour assurer la valorisation de ces réactifs de recherche dans le domaine du diagnostic en conchyliculture (dossier soumis à J. Querellou).

Plusieurs pays (Canada, Australie) ont pris contact avec l'unité pour développer dans le cadre de collaborations des réactifs spécifiques d'agents pathogènes indigènes.

Un programme de travail a été établi avec G. Breuil, M. Comps et J.F. Pepin (DEVA) en vue de la préparation d'anticorps monoclonaux spécifiques d'un virus de type *Picornavirus* du bar.

Des problèmes de culture d'hybridomes ont été observés au cours de la préparation d'anticorps spécifiques de *Baculovirus*, ce qui a conduit à devoir prendre en considération l'ensemble des facteurs susceptibles d'en être la cause. Après renouvellement de la souche de myélome et changement de lot du milieu de culture, les travaux se sont à nouveau déroulés normalement.

### **1.2 Pathologie expérimentale**

#### **Bonamiose :**

Les travaux de pathologie expérimentale ont encore été focalisés sur le modèle de la bonamiose de l'huître plate et ont eu pour motivation essentielle d'optimiser les techniques de reproduction de cette maladie, ceci dans l'optique de les transférer aux collègues de l'URGE impliqués dans la sélection par génétique quantitative d'individus résistants. Plusieurs résultats significatifs ont été acquis, certains grâce aux collaborations établies avec plusieurs équipes européennes dans le cadre d'un contrat CEE (ref). Les injections de parasites purifiés peuvent être effectuées directement dans la cavité péricardique ce qui évite les septicémies observées suite à des inoculations dans la glande digestive. L'anesthésie des animaux par immersion dans de l'eau de mer additionnée de MgCl<sub>2</sub> s'est avérée particulièrement efficace pour *O. edulis* ainsi que pour *C. gigas*, bien que

pour cette dernière il soit nécessaire de pratiquer une entaille dans les valves afin de favoriser la pénétration de la solution anesthésiante. Dans ces conditions, les mortalités chez les témoins, liées à l'expérimentation sont quasiment nulles et le développement de l'infection a pu être précisément analysé pour différentes doses infectieuses. Pour la première fois en pathologie des mollusques, la notion de dose infectieuse 50 % a été introduite, ce qui a permis d'entreprendre des comparaisons objectives de la sensibilité de différentes souches d'huîtres vis-à-vis de *Bonamia ostreae*, notamment les huîtres F1 "résistantes" (ref;collaboration N. Cochennec, M.J. Lecoguic, La Trinité/mer). Ces expérimentations, réalisées à l'échelle de l'animal, ont aussi révélé une grande variabilité individuelle de la sensibilité au parasite. L'analyse de ce phénomène est du domaine de l'immunologie anti-infectieuse et basée essentiellement sur des expérimentations *in vitro* résumées dans la partie immunologie.

### **Viroses :**

Les viroses de mollusques et de crevettes sont encore peu étudiées, essentiellement en raison de l'absence de lignées cellulaires permettant la multiplication des virus et consécutivement leur étude *in vitro*. Compte tenu des épidémies virales qui ont dans le passé décimé des élevages d'huîtres et de crevettes et du risque potentiel que constituent en permanence les viroses, un programme de recherche sur l'inhibition de virus par des séquences anti-sens a été initié avec le soutien de Sanofi-Elf. Le modèle choisi correspond à un Baculovirus d'insecte (*Autographa californica*) pour lequel il existe une lignée cellulaire permissive (Sf9) et dont la biologie moléculaire est très bien connue, notamment en ce qui concerne des gènes précoces régulateurs. En effet, les transcrits de tels gènes sont des cibles privilégiées pour des molécules anti-sens susceptibles d'inhiber leur traduction et par conséquent la multiplication du virus. Il faut noter par ailleurs que des homologies de séquences ont été récemment démontrées par nos collègues australiens entre ce Baculovirus-modèle et un Baculovirus de crevette. Les travaux ont été initialement consacrés à l'introduction d'ADN dans les cellules Sf9 selon différentes techniques : simple diffusion; électroporation ; lipofection. Cette dernière s'est avérée la plus performante d'un point de vue quantitatif (0.1 pg d'ADN/cellule) mais aussi qualitatif puisque la mortalité cellulaire résultant de ce traitement est pratiquement nulle à la différence de l'électroporation qui provoque des altérations cellulaires. La quantification de

la multiplication du virus a ensuite été prise en considération car son estimation précise est indispensable à l'analyse de l'effet inhibiteur de molécules anti-sens différant par leur séquence, leur taille ou leur structure. La méthode de quantification de l'ADN viral qui a été retenue est basée sur une hybridation entre une sonde virale froide et l'ADN viral extrait des cellules et fixé sur une membrane de nylon. Des essais d'inhibition du virus sont maintenant réalisés avec des desoxyoligonucléotides, normaux ou modifiés, correspondant aux gènes IE-1 et DNA-pol.

### **1.3 Culture cellulaire :**

L'absence de lignée cellulaire de mollusque constitue toujours un facteur limitant pour l'étude *in vitro* des agents pathogènes qui sont en majorité intracellulaires. A la suite du colloque de biotechnologies marines (Martigues), un réseau de collaborations a commencé à s'organiser sur ce thème de recherches, l'animation de ce réseau étant parfaitement prise en charge par G. Dorange et ses collègues (Université de Brest). Alors que les différents partenaires du réseau doivent s'intéresser tout particulièrement à l'élaboration de milieux de culture sur la base de tests de capacité fonctionnelle de cellules en primocultures, la participation de l'unité est focalisée sur l'étude des oncogènes impliqués, d'une part, dans une tumeur hémocytaire de la moule et, d'autre part, dans la multiplication et la différenciation cellulaires lors des phases précoces du développement embryonnaire. Ces travaux ont pour but de pouvoir aborder l'immortalisation de cellules de mollusques par transformation expérimentale avec des oncogènes hétérologues ou homologues, comme cela est maintenant pratiqué pour de nombreux types de cellules chez les vertébrés et la drosophile.

L'étude de la tumeur hémocytaire de la moule a été poursuivie par la caractérisation des anticorps monoclonaux spécifiques. En collaboration avec l'équipe de R. Elston (Battelle, USA) il a été établi que certains d'entre eux sont spécifiques de cellules tumorales 4N et d'autres de cellules 5N, la signification de ces observations étant encore incomprise. Sur la base de données cytologiques, il a été montré que plusieurs anticorps spécifiques de cellules tumorales réagissent avec des épitopes membranaires alors que d'autres épitopes ont une localisation nucléaire. Ces données suggèrent qu'il y ait expression spécifique de plusieurs gènes pouvant être assimilés à des

oncogènes (ref). Des travaux ont été initiés pour déterminer les poids moléculaires des différentes protéines reconnues par ces anticorps et rechercher ainsi des similitudes avec les oncoprotéines caractérisées chez des vertébrés ou des invertébrés. Parallèlement à cette approche immunologique, l'utilisation de sondes nucléiques a été abordée pour rechercher des oncogènes. L'hybridation d'une sonde spécifique de l'oncogène ras a été suivie par une étude comparative des séquences établies pour cet oncogène chez différents groupes zoologiques. L'analyse des séquences nucléiques et peptidiques des banques de données EMBL et GENBANK à l'aide des systèmes d'exploitation "Bisance" a permis d'identifier des séquences consensus pour les gènes ras dont un représentant a été récemment caractérisé chez le gastéropode *Aplysia*. A partir de ces informations, des oligonucléotides ont été synthétisés en vue de l'amplification par PCR de l'oncogène ras de la moule, soit à partir d'ADN génomique, soit à partir d'ARNm.

Les recherches sur les cellules embryonnaires visant, d'une part, à analyser l'expression temporelle des oncogènes et, d'autre part, à transfecter ces cellules avec de l'ADN exogène, ont porté à ce jour essentiellement sur la mise au point de méthodologies expérimentales: protocole fiable de dissociation cellulaire basé sur l'utilisation d'homogénéiseur de tissus de type Dounce et de milieu antiaggrégant de type Alsever ; test de viabilité; établissement de primocultures; électroporation et lipofection; traitement des échantillons cellulaires pour la détection des acides nucléiques à l'aide de sondes froides selon la technique de dot-blot.

## **2. IMMUNOLOGIE ANTI-INFECTIEUSE DES MOLLUSQUES ET DES CRUSTACÉS**

Ce domaine de recherches correspond à une évolution logique des travaux développés en pathologie qui ont conduit à la maîtrise de techniques de purification et de dosage des agents pathogènes ainsi qu'à la reproduction expérimentale de certaines infections. Ainsi il est devenu progressivement possible d'aborder l'étude *in vitro* des interactions entre les agents pathogènes et le système immunitaire des mollusques et des crustacés.

## **2.1 Etude des effecteurs cellulaires et humoraux**

Un certain nombre de travaux ont été focalisés sur la caractérisation fonctionnelle en chimioluminescence des hémocytes des mollusques *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis*, *Tapes philippinarum* et *Pecten maximus* (ref). Il a été montré chez toutes ces espèces de bivalves que la phagocytose de particules inertes par les hémocytes s'accompagne de la production de radicaux libres de l'oxygène (ref) comme cela a été précédemment démontré chez des gastéropodes (Equipe d'Amsterdam, projet de coopération). Les résultats obtenus pour des nombres constants d'hémocytes se sont révélés très variables selon l'espèce et selon l'individu. Cette variabilité individuelle, dont la signification immunologique devrait être étudiée en relation avec l'état physiologique et les conditions environnementales (équipe espagnole de Villagarcia), a été considérée pour des huîtres d'un même lot. Des corrélations avec la formule hémocytaire ont été alors recherchées et ont rapidement mis en évidence la difficulté d'identification de différents types hémocytaires sur la seule base de critères morphologiques. Les anticorps monoclonaux préparés contre les hémocytes de *C. gigas* sont en cours d'exploitation pour essayer de caractériser des types antigéniques, plusieurs de ces anticorps pouvant par ailleurs constituer des réactifs applicables à d'autres espèces puisque des réactivités interspécifiques ont été mises en évidence. Parallèlement, des sous-populations hémocytaires séparées par centrifugation isopycniqne sur gradient de densité de Percoll sont analysées à l'aide de ces anticorps chez *C. gigas*.

Des travaux similaires de séparation d'hémocytes ont été réalisés en collaboration avec J.F. Samain pour identifier les types cellulaires sécréteurs de lysozyme chez *T. philippinarum* (ref). Ces résultats sont particulièrement intéressants dans l'optique d'étudier le gène de cette protéine antibactérienne car ils informent sur les cellules à partir desquelles les ARNm pourront être extraits. Des contacts ont été établis par J.F. Samain avec le Pr. Jollès, spécialiste du lysozyme qui dispose de sondes nucléiques. De plus, des collègues espagnols (Vigo) qui étudient actuellement le lysozyme de l'hémolymphe de la palourde se sont déclarés intéressés par une collaboration sur ce sujet et sur l'activité du lysozyme vis-à-vis du *Vibrio* P1 (dossier pour comité mixte franco-espagnol transmis à J. Fuchs).

L'immunologie des crevettes pénéides est un domaine pratiquement vierge, les connaissances se limitant pratiquement à des descriptions morphologiques des hémocytes. Par contre, de très nombreuses données sont disponibles chez les insectes (plusieurs équipes européennes) et l'écrevisse qui a acquis le statut de modèle d'étude (Equipe de Söderhall, Suède). Dans le but d'avoir une approche complémentaire, l'unité a choisi d'exploiter ses compétences dans le domaine de la préparation d'anticorps monoclonaux afin de disposer de réactifs permettant, d'une part, de caractériser d'un point de vue antigénique et fonctionnel les hémocytes et leur sécrétions, d'autre part, de tester les réactivités de ces anticorps vis-à-vis des protéines immunitaires qui ont été purifiées chez les insectes et l'écrevisse. Après avoir établi un milieu de prélèvement de l'hémolymphe de crevette qui évite les phénomènes de coagulation et de mélanisation, un protocole de criblage a été conçu afin de pouvoir sélectionner simultanément les hybridomes spécifiques de protéines sécrétées ou d'hémocytes de *Penaeus japonicus*. Une vingtaine d'hybridomes ont été obtenus, certains réagissant, avec tous ou une partie des hémocytes, d'autres avec des sécrétions. La caractérisation de tous ces hybridomes est en cours, basée sur des analyses en immunohistologie et en immunoblotting. Ces anticorps monoclonaux seront prochainement utilisés pour l'étude fonctionnelle des protéines sériques sur la base de test d'immuno-inhibition.

Les travaux concernant l'activité de type sérine protéase mise en évidence dans l'hémolymphe de bivalves et impliquée dans la neutralisation de virus (ref) ont été poursuivis par S. Mortensen (Institut de Bergen) sur le modèle *Birnavirus/Pecten maximus* alors que l'unité a envisagé de purifier cette protéine. Dès les essais préliminaires, des difficultés techniques sont apparues qui ont été considérées comme impossibles à résoudre par l'unité en raison de son manque de compétence dans ce domaine. Des contacts ont été établis avec P. Roch (CNRS) qui est à l'origine d'un projet soumis à la CEE sur les sérine protéases d'invertébrés.

## **2.2 Recherche de gènes et de protéines immunitaires**

En immunologie des vertébrés et des insectes, des progrès gigantesques ont été réalisés au cours des dernières années, d'une part dans la purification et la caractérisation de protéines immunitaires et, d'autre part dans l'isolement et le séquençage des gènes correspondant. Ces résultats

commencent à mettre en évidence de nombreuses homologues moléculaires et fonctionnelles. C'est pourquoi l'unité s'est attachée à un travail bibliographique à caractère exhaustif sur les gènes codant pour des protéines à activité antimicrobienne, telles que les cecropines, attacines, defensines, magainines, et pour des cytokines activatrices des cellules immunitaires, tels que le TNF, IFN. Parallèlement des formations individuelles et collectives ont été organisées sur l'interrogation des banques de séquences nucléiques et protéiques (EMBL, GENBANK) et sur les systèmes d'exploitation (Bisance), notamment ceux concernant les comparaisons de séquences et l'identification de consensus à partir desquels des sondes peuvent être synthétisées. Plusieurs techniques de biologie moléculaire adaptées à la recherche de gènes ont été acquises, en particulier la synthèse d'oligonucléotides et l'amplification par PCR. L'intégration à l'unité d'un spécialiste de biologie moléculaire reste cependant une priorité dans la mesure où de nombreuses techniques de base devront être maîtrisées pour entreprendre efficacement le clonage des gènes immunitaires de mollusques et de crevettes.

### **3. TRANSGÉNOSE**

La transgénèse chez les mollusques et les crevettes est essentiellement orientée vers la sélection de souches résistantes à des agents pathogènes consécutivement à l'expression, soit de gènes immunitaires, soit de séquences antisens inhibant la réplication de virus. Cependant de très nombreuses autres applications pourront être envisagées à l'instar des travaux réalisés chez la drosophile ou la souris transgénique (endocrinologie, oncologie,...). Ce programme a été axé sur la technique de microinjection retenue préférentiellement à l'électroporation en raison de sa fiabilité pour l'introduction de molécules. De nombreuses expérimentations ont été effectuées sur des embryons de moule et d'huître et ont permis d'atteindre une réelle maîtrise de l'ensemble des opérations (préparation des microinstruments, micromanipulation et microinjection des embryons unicellulaires). A ce jour, il est possible de microinjecter en routine plusieurs dizaines d'embryons avec des taux de survie supérieurs à 50 %. Ce savoir-faire a été ensuite appliqué à la microinjection d'embryons de crevettes grâce au soutien du COB (C. Cahu) et du COP (J. Calvas).

Cette technique de microinjection d'embryons, qui pourra être ultérieurement très intéressante pour des essais d'embryoculture d'agents pathogènes intracellulaires, a été ensuite utilisée pour introduire de la  $\beta$ -galactosidase. Cette protéine correspond au produit d'expression d'un des gènes marqueurs les plus fréquemment utilisés en transfert de gène pour étudier l'efficacité et la spécificité tissulaire de promoteurs. Ainsi, la microinjection de  $\beta$ -galactosidase a permis de simuler l'expression de ce gène et de mettre au point une méthode de détection de type immunologique applicable à des embryons et des larves de mollusques.

Sur la base de ces résultats, des expérimentations ont été réalisées pour tester l'efficacité de promoteurs hétérologues en microinjectant un plasmide qui associe le promoteur viral CMV (efficace sur cellules d'insecte) et le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase. Des résultats préliminaires suggèrent qu'il y ait une expression transitoire de ce gène.

Parallèlement à ces expérimentations sur l'embryon, des travaux ont été initiés sur l'ADN des crevettes *Penaeus japonicus* et *P. indicus* et du mollusque *Mytilus edulis* pour rechercher selon la technique PCR des promoteurs homologues (HSP, heat shock protein) et des séquences répétées susceptibles de constituer des cibles d'intégration (histone).

#### **4. ENDOCRINOLOGIE**

Cet axe de travail est réalisé en étroite collaboration avec M. Mathieu (Université de Caen), J.F. Samain et J. Moal (IFREMER, Brest), l'implication de l'unité étant essentiellement d'ordre méthodologique.

Des anticorps monoclonaux spécifiques de cellules et de sécrétions des ganglions cérébroïdes de la moule ont été préparés selon la technique d'hybridation lymphocytaire. Le criblage des hybridomes spécifiques a été réalisé en immunofluorescence indirecte sur des préparations histologiques de cellules cytocentrifugées, chaque préparation étant équivalente à une suspension cellulaire issue de cinq ganglions. Une soixantaine d'hybridomes ont été sélectionnés et ont permis d'entreprendre une cartographie des ganglions sur la base de la spécificité antigénique des anticorps. Plusieurs d'entre eux correspondent à des molécules sécrétées qui ont été identifiées dans l'hémolymphe de la moule par un immunodosage enzymatique. La

caractérisation de ces molécules est en cours, la disponibilité des anticorps permettant d'envisager leur immunopurification.

L'immunodétection de molécule de type insuline dans les cellules ganglionnaires de la moule et l'identification chez plusieurs groupes d'invertébrés de gènes codant pour des protéines de type insuline et récepteur à l'insuline ont conduit à rechercher ces gènes chez la moule. Ce travail est également fortement motivé par les activités de l'insuline et des molécules apparentées sur la croissance et la différenciation. Sur la base des homologues de séquences entre les gènes, des amorces ont été préparées pour des essais d'amplification par PCR, les séquençages des fragments amplifiés et clonés n'ayant pas à ce jour permis d'identifier de façon fiable des séquences de type insuline.

## 5. PUBLICATIONS D'URPIGM (1990)

### 5.1. Revues avec comité de lecture:

BACHERE E., D.HERVIO and E. MIALHE, 1990. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalve species, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. Soumis à *Dis. Aquat. Org.*.

BACHERE E., D. HERVIO, E. MIALHE and H. GRIZEL, 1990. Evidence for neutralising activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Develop. Comp. Immunol.* Vol. 14 : 261-268.

CHAGOT D.,V. BOULO, D. HERVIO, E. MIALHE, C. MOURTON and H GRIZEL, 1990. Interactions between *bonamia ostreae* (protozoa : ascetospora) and hemocytes of *ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (mollusca : bivalvia) : entry mechanism. *J. of Invert. Pathol.* : in press.

GENDREAU S. and H. GRIZEL, 1990. Induced triploidy and tetraploidy in the european flat oyster, *Ostrea edulis* (L.). *Aquaculture* Vol. 90 : 229-238.

HERVIO D., V. VUILLEMIN, E. BACHERE, V. BOULO, N. COCHENNEC, and E. MIALHE, 1990. Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *ostrea edulis* with *bonamia ostreae* parasites : application to parasite resistant oyster selection. Soumis à *Aquaculture*.

- JOUSSET F.X., M. JOURDAN, B. COMPAGNON, E. MIALHE, J.C. VEYRUNES and M. BERGOIN, 1990. Restriction maps and sequence homologies of two densovirus genomes. *J. gen. Virol.*, 71 : 2463-2466.
- LE GALL G. et al., 1990. Purification of Rickettsiales-like procaryotes associated with *Pecten maximus* (Mollusca : Bivalvia). Serological and biochemical characterization. Soumis à *Dis. Aquatic. Org.*.
- LE GALL G., E. BACHERE, D. CHAGOT and E. MIALHE, 1990. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes with zymosan and specific Rickettsiales-like organisms stimulation. Soumis à *Dis. Aquat. Org.*
- LE GALL G., C. MOURTON, V. BOULO, E. MIALHE, F. PAOLUCCI and B. PAU, 1990. Monoclonal antibody against gill Rickettsiales-like organism (RLO) of *Pecten maximus* (Bivalvia) : application to indirect immunofluorescence (IIF) diagnostic. Soumis *Dis. Aquat. Org.*
- LE GALL G., E. MIALHE and H. GRIZEL, 1990. Epidemiological study of the Rickettsiales-like disease of the St Jacques scallop *P. maximus*. *Dis. Aquat. Org.* : in press.
- MOURTON C., BOULO V., D. CHAGOT, D. HERVIO, E. MIALHE and H. GRIZEL, 1990. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa : Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca : Bivalvia) : *In vitro* model establishment. Soumis à *J. Invert. Pathol.*
- NOEL D., V. BOULO, D. CHAGOT, E. MIALHE, F. PAOLUCCI, C. CLAVIES, E. HERVAUD and R. ELSTON, 1991. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against neoplastic hemocytes of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Dis. aquat. Org.* 10: 51-58.

### **5.2.Revues sans comité de lecture:**

GRIZEL H., 1990. Pathologie des palourdes. in :

GRIZEL H. and M. HERAL, 1990. Introduction in France of the japanese oyster *Crassostrea gigas*. *J. du Conseil Internat. Explo...*

**5.3. Communications à des colloques:**

- GRIZEL H., 1990. Prophylactic strategies and zootechnic measures. Recent advances. *Aquacop, actes colloques n° 9*: 227-231.
- MIALHE E., 1990. Infectious pathology in molluscs and schrimp hatcheries. *Aquacop, Actes colloques n° 9*: 223-226.
- NOEL TH., E.AUBREE, D.BLATEAU, E.MIALHE and H.GRIZEL. Treatment against the vibrio P1 suspected to be responsible for mortalities in *Ruditapes philippinarum*. Abstracts p. 22-23. PAMAQ 4, Vigo (Espagne) 17-21 sept.
- COUSIN K., B. DESPREZ, D.SHIRE, M.KHAGAD, E.MIALHE and H.GRIZEL. Polymerase Chain Reaction, a new method for diagnostics of *Pecten maximum* gill rickettsia. Abstracts p. 17. PAMAQ 4, Vigo (Espagne) 17-21 sept.
- HERVIO D., V.LUBAT, E.MIALHE and H.GRIZEL. Nucleic acid probes in the diagnostics and study of *Bonamia ostrea* (Asctospora) intrahemocytic parasite of the flat oyster *Ostrea edulis*. Abstracts p. 71. PAMAQ 4, Vigo (Espagne) 17-21 sept.
- LUBAT V., D.HERVIO, E.MIAHLE, H.GRIZEL and T.BALTZ Characterisation of a potential DNA probe for *Marteilia refringens*, a parasite of the flat oyster *Ostrea edulis*. Abstracts p. 78. PAMAQ 4, Vigo (Espagne) 17-21 sept.
- BLATEAU D.,Y.LE COGUIC, E.MIALHE et H.GRIZEL Traitement des moules (*Mytilus Edulis*) contre le copepode *Mytilicola intestinalis*. Abstracts p. 97-98. PAMAQ 4, Vigo (Espagne) 17-21 sept.
- ELSTON R., D.BONAR, K.BROOKS, A.GEE, E.MIALHE, J.MOORE, D.NOEL, and L.STEPHENS. Studies on pathogenesis and etiology of circulating sarcomas in *Mytilus*. PAMAQ 4, Vigo (Espagne) 17-21 sept.
- MATHIEU M., J.Y.TOULLEC, I.ROBBINS et K.COUSIN Recherche de substances hormonales actives sur la croissance et sur les métabolismes associés chez les mollusques bivalves. Bases Biologiques de l'Aquaculture, Guidel 5-7 sept.

MIALHE E., V. BOULO, E. BACHERE, D. HERVIO et K. COUSIN Nouveaux outils de diagnostic en pathology des molluscs. E.A.F.P., CNEVA, Maisons Alfort, 20 Nov.

MIALHE E. Dépistage des maladies des coquillages. 2ème Colloque Biotechnologie et Développement, Rochefort 19-20 avril.

HERVIO D., E. BACHERE, V. BOULO, D. CHAGOT, E. MIALHE and H. GRIZEL. Interactions between *Bonamia ostrea* (Protozoa : Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca : Bivalvia) : *In vitro* model establishment and study of recognition, entry and survival mechanisms. 7 Inter. Cong. of Parasi., Paris 20-24 août 1990.

CADORET J.P.. Electric-field mediated polyploidy induction in commercially important farmed species in Aquaculture. Intern. Conf. on electroporation and electrofusion, Mar. Biol. Lab. Woods Hole, Massachusetts, 28-31 Octobre 1990.

## 6. ENSEIGNEMENTS

MIALHE E. : Pathologie, immunologie et génétique des mollusques et des crustacés. DEA d'Océanologie, option Biotechnologies, Université de Marseille.

MIALHE E. : Pathologie des mollusques. Ecole des Administrateurs des Affaires Maritimes, Bordeaux.

MIALHE E. : Pathologie et génétique des mollusques et des crevettes. Institut technique de la Mer, Cherbourg.

MIALHE E. : Diagnostic des maladies de mollusques. Direction des services vétérinaires, Nantes.

## 7. MISSIONS A L'ETRANGER

MIALHE E. : Groupe pathologie et maladies des organismes marins, CIEM, Vigo (Espagne), mars.

MIALHE E.: Coopération franco-équatorienne en pathologie, immunologie et génétique des crevettes et des mollusques, (Equateur) décembre.

## **8. MANIFESTATIONS ORGANISEES PAR L'UNITE**

Journées portes ouvertes 21 au 23 avril

Participation à l'organisation du Colloque national de Biotechnologies marines, Martigues, 31 mai au 2 juin.

MIALHE E. : animateur atelier sondes moléculaires :

- Kristell COUSIN : endocrinologie
- Dominique HERVIO : diagnostic
- Evelyne BACHERE : Immunologie

BOULO V.: Co-animation cultures cellulaires

GENDREAU S. : Transfert de gènes chez crustacés.

CADORET J.P. : Transfert de gènes chez mollusques.

Réunion inter-équipes DRV-RA: Présentation des compétences techniques et réflexion sur les collaborations au sein du département. 15-16 mai.

## **9. EXPERTISES**

MIALHE E. : membre du groupe "Pathology and diseases of marine organisms", CIEM

## **10. FORMATIONS**

CADORET J.P. : Stage statistiques niveau 1, 4 jours, décembre 1990.

NOEL T. : Stage statistiques niveau 1, 4 jours, décembre 1990.

NOEL T. : Stage Anglais au CAREL Royan, 15 jours, Décembre 1990.

## **11. PRINCIPALES VISITES DE L'UNITE PAR DES VISITEURS ETRANGERS**

30 mai : 25 étudiants + professeurs, International Institute for Hydraulic and Environmental Engineering, Hollande.

Juillet : S. Mortensen, Institut des Pêches de Bergen, Norvège.

16 octobre : Carlos Fwurmann, coquilles St-Jacques, Chili.

Kenji Kawamaya, coquilles St-Jacques, Japon.