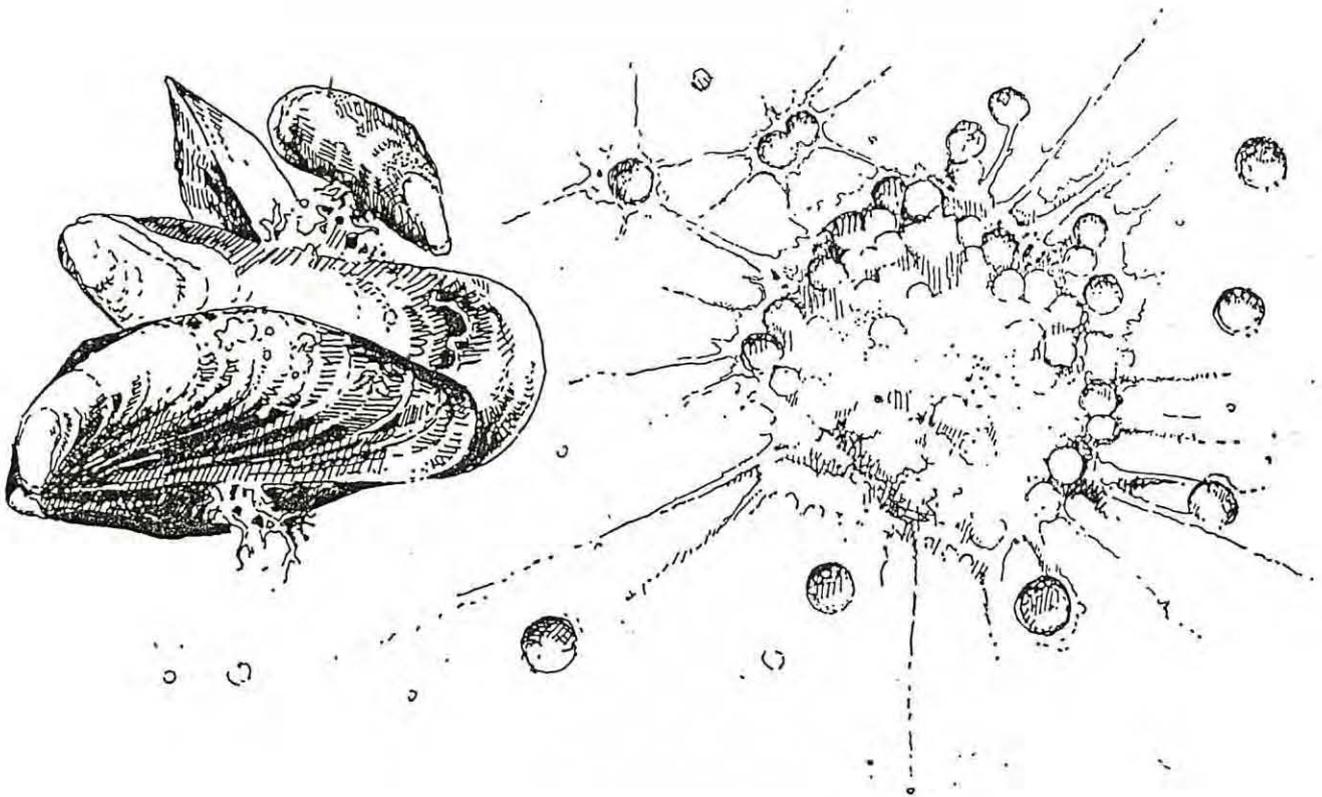


Université de Bordeaux II
U.E.R. de Biochimie et Biologie Cellulaire

D.E.A. de BIOLOGIE-SANTÉ
Option "Pathologie Microbienne et Virale"

ETUDE D'UNE PROLIFÉRATION HÉMOCYTAIRE
CHEZ LA MOULE Mytilus edulis



Danièle NOËL
Septembre 1988



Laboratoire de Pathologie et de Génétique des Invertébrés Marins
B.P. 133 - 17390 LA TREMBLADE

REMERCIEMENTS

Je voudrais, en tout premier lieu, remercier Monsieur Henri Grizel, qui m'a accueillie à la station IFREMER de la Tremblade et qui m'a permis de mener ce travail dans les meilleures conditions.

J'exprime à Monsieur Eric Mialhe toute ma reconnaissance et ma gratitude pour l'aide qu'il m'a apportée par son expérience et sa rigueur scientifique. J'ai été particulièrement sensible à son affection et à son entière disponibilité.

Je souhaite remercier Monsieur Francis Paolucci et son équipe de SANOFI à Montpellier, pour leur accueil et leurs conseils concernant l'hybridation lymphocytaire.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Ralph Elston qui est à l'origine de ce travail.

Je ne saurais oublier toute l'équipe du laboratoire IFREMER pour la chaleur de leur accueil et le plaisir que j'ai eu à travailler avec eux.

Enfin, je remercie infiniment Geneviève Bonhomme qui a assuré la dactylographie et Stein Mortensen pour l'illustration de la couverture de ce rapport.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

RAPPEL DES CONNAISSANCES SUR LES TUMEURS DE MOLLUSQUES.....	2
---	---

MATERIEL ET METHODES

1 - Animaux.....	4
1.1. Animaux néoplasiques.....	4
1.2. Animaux sains.....	4
2 - Description des installations.....	4
3 - Techniques de reproduction de la maladie.....	4
3.1. Prélèvement de l'hémolymphe.....	4
3.2. Inoculation.....	4
3.3. Conditions d'expériences.....	5
4 - Induction de formation de particules virales.....	5
5 - Techniques histologiques.....	6
5.1. Microscopie photonique.....	6
5.2. Microscopie électronique.....	6
6 - Techniques de culture cellulaire.....	6
6.1. Prélèvement aseptique de l'hémolymphe.....	6
6.2. Milieux de culture.....	7
7 - Techniques immunologiques.....	7
7.1. Immunisation.....	7
7.2. Obtention et épuration des anticorps polyclonaux..	7
7.3. Hybridation lymphocytaire.....	8
7.4. Purification et caractérisation des anticorps monoclonaux.....	9
7.5. Techniques d'immunofluorescence indirecte (I.F.I.)	9

RESULTATS

1 - Etude de la nature tumorale des hémocytes.....	10
1.1. Etude anatomopathologique.....	10
1.2. Etude in vitro.....	11
1.3. Transplantation d'hémocytes anormaux.....	11
1.4. Discussion.....	12
2 - Etiologie de la maladie.....	14
2.1. Essais de reproduction de la maladie.....	14
2.2. Essais d'induction de particules virales.....	14
2.3. Discussion.....	15

3 - Préparation d'anticorps spécifiques.....	16
3.1. Obtention des anticorps polyclonaux.....	16
3.2. Obtention des anticorps monoclonaux.....	16
3.3. Purification et caractérisation des anticorps monoclonaux.....	18
3.4. Localisation des épitopes reconnus.....	18
3.5. Discussion.....	18
CONCLUSION - PERSPECTIVES.....	20
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXE	

INTRODUCTION

Suite à différentes épizooties qui se sont développées dans plusieurs régions du monde chez les principales espèces de bivalves élevées, des recherches en pathologie des Mollusques ont été initiées à l'échelle internationale sous l'impulsion d'organismes tel que le CIEM (Comité International d'Exploration de la Mer).

Des progrès, qui portent essentiellement sur des maladies parasitaires dues à des protozoaires du phylum des Asctospora ont été réalisés assez rapidement. Ainsi la bonamiose de l'huître plate a acquis un statut de modèle avec la mise au point de protocoles de purification du parasite, de reproduction in vivo et in vitro de l'infection et l'élaboration d'un immunodosage enzymatique à l'aide d'anticorps monoclonaux. Des résultats similaires ont été obtenus pour une infection rickettsienne de la coquille St Jacques. Par contre, les connaissances sur l'étude des maladies virales et sur les phénomènes de cancérologie chez les Mollusques restent très limitées malgré d'assez nombreux travaux descriptifs dont certains se rapportent à des cas d'épidémie.

Ainsi, une maladie endémique qui se traduit par une prolifération d'hémocytes atypiques provoque actuellement des mortalités chez la moule Mytilus edulis dans l'état de Washington aux Etats-Unis. Du fait des transferts de coquillages, elle représente un risque potentiel pour les activités mytilicoles d'autres régions du monde. En effet, l'histoire de l'ostréiculture révèle que certaines maladies de nature infectieuse se sont rapidement étendues et présentent maintenant un caractère pandémique.

Tenant compte de l'importance économique de la mytiliculture dans le monde (500 000 t) et en raison de l'intérêt fondamental lié à l'étude de cette maladie, un programme de collaboration a été établi entre l'IFREMER, L.P.G.I.M. (laboratoire de pathologie et de génétique des Invertébrés marins) et l'institut de Battelle aux U.S.A. (laboratoire de biologie marine). Au cours du stage de DEA réalisé au L.P.G.I.M., je me suis attachée à la mise au point des modalités expérimentales de reproduction de la maladie pour en préciser la nature et l'étiologie et à l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes atypiques. Ces derniers représentent un outil pouvant être appliqué au diagnostic de la maladie mais aussi à son étude en recherche fondamentale.

RAPPEL DES CONNAISSANCES ACTUELLES
SUR LES TUMEURS DE MOLLUSQUES

Dans différents pays, de nombreux cas de tumeurs ont été décrits chez les Mollusques bivalves d'intérêt économique. Il s'agit essentiellement de "néoplasies" hémocytaires qui ont été mises en évidence le plus souvent fortuitement, lors d'études anatomiques ou lors de contrôles épidémiologiques de maladies parasitaires (tableau 1).

Quelques cas de proliférations hémocytaires ont été signalés en France chez les huîtres Crassostrea gigas et Ostrea edulis (Balouet et al., 1978) alors que la fréquence de ce type de maladie peut atteindre 46 % des animaux chez la coque Cerastoderma edule (Poder et Auffret, 1986). Chez Ostrea edulis, d'autres exemples de néoplasies hémocytaires sont cités en Espagne et en Yougoslavie (Mix, 1986). Aux Etats-Unis, chez Crassostrea virginica, l'importance des néoplasmes semble limitée à quelques individus sur plusieurs milliers examinés de manière systématique (Mix, 1986). Par contre, plusieurs études révèlent l'impact de telles maladies chez Mytilus edulis ainsi que chez Mya arenaria et des suivis épidémiologiques indiquent que la fréquence de diagnostic de la maladie est plus élevée de Janvier à Mars (Mix, 1983 ; Brousseau, 1987).

La prolifération hémocytaire de la moule Mytilus edulis qui a été décrite pour la première fois dans l'Orégon (U.S.A) par Farley (1969), se caractérise par l'infiltration et l'envahissement progressif du tissu conjonctif par des cellules de grande taille dont certaines sont en phase de mitose. Dans les infections précoces, ces cellules se localisent dans les vaisseaux de l'hémolymphe ou dans le tissu conjonctif vésiculaire.

Des études cytologiques révèlent deux types de cellules atypiques (Farley et Sparks, 1969). Le premier type cellulaire qui représente la majorité des hémocytes anormaux, est caractérisé par un diamètre de 10 à 15 µm et par des noyaux lobés renfermant un ou plusieurs nucléoles. Les cellules du second type possédant des noyaux de 4 à 6 µm mesurent de 8 à 10 µm de diamètre. En fait ces cellules correspondraient à deux types morphologiques d'une seule cellule (Mix et al., 1979).

D'un point de vue ultrastructural, Mix et al. (1979) ont étudié ces hémocytes qui présentent certaines caractéristiques décrites chez les cellules malignes de Vertébrés, notamment de grands noyaux polymorphes, de grands et nombreux nucléoles, des appareils de Golgi altérés.

Aux Etats-Unis, aucun agent infectieux n'a pu être mis en évidence en association avec cette maladie. Certains auteurs incriminent divers composés chimiques d'origine industrielle ou agricole. Mix et al. (1979) établissent une corrélation significative entre des concentrations de benzopyrène et l'incidence des néoplasies chez Mytilus edulis. Cependant, l'exposition expérimentale de Mollusques à du pétrole ou à des PAH (Petroleum Aromatic Hydrocarbures) n'induit jamais la formation de néoplasmes.

Espèces	% animaux atteints	Méthodes d'étude	Etiologie	Situation	Références
<u>Mytilus edulis</u>	10 ‰	hémocytologie-histologie	inconnue	USA	Farley (1969)
	1.6 ‰	histologie	inconnue	Gde-Bretagne	Lowe & Moore (1978)
	5 à 10 ‰	micros.électro-histologie	inconnue	USA	Mix (1979)
	0.4 ‰	histologie	inconnue	USA	Mix (1983)
	17.6 à 28.9 ‰ 8 à 19.7 ‰	histologie	inconnue inconnue	Canada USA	Emmett (1984) Cosson-Mannery (1984)
<u>Mya arenaria</u>	10.9 ‰		pétrole ?	USA	Yevisch & Barszcz (1977)
	0 à 64 ‰		inconnue	USA	Brown & al (1979)
	-	micros. électronique	rétrovirus	USA	Oprandy (1981)
	20 à 40 ‰	hémocytologie-histologie	inconnue	USA	Cooper & al (1982)
	10.8 à 27.5 ‰	anticorps monoclonaux	inconnue	USA	Reinisch (1983)
	10 à 90 ‰ 0 à 65 ‰ 6.1 à 12.9 ‰	hémocytologie-histologie hémocytologie-histologie histologie	pollution inconnue inconnue	USA USA USA	Reinisch (1984) Farley (1986) Brousseau (1987)
<u>Cerastoderma edule</u>	39.8 ‰		inconnue	Irlande	Twomey & Mulcahy (1984)
	46 ‰	micros. électronique	inconnue	France	Poder & Auffret (1986)
<u>Crassostrea virginica</u>	8.4 ‰		inconnue	USA	Frierman (1976)
	-		inconnue	USA	Harshbarger & al (1977)
	0.04 à 0.45 ‰		inconnue	USA	Couch (1984)
<u>Ostrea edulis</u>	-		inconnue	Espagne	Alderman & al (1977)
	0.43 ‰	hémocytologie	inconnue	France	Balouet & Poder (1978)

Tableau 1 : Etudes des néoplasmes hémocytaires chez les Mollusques

Au Danemark, chez la même espèce, un virus a été associé à des granulocytomes qui sont différents d'un point de vue anatomopathologique de la néoplasie précédemment citée. Sur la base des critères de forme (icosahédre), de taille (27 nm), de sa localisation (intracytoplasmique) et sur la nature de l'acide nucléique (pas de DNA viral), ce virus a été assimilé par Rasmussen (1986) à un picornavirus. Cependant, aucune infection expérimentale ne permet de l'associer avec le développement des granulocytomes. Par contre, chez Mya arenaria, Oprandy et al. (1981, 1983) ont isolé, avec ou sans induction par la bromodeoxyuridine, un rétrovirus de type B. Ce virus, qui induit la maladie chez des animaux sains, est réisolé de ces clams infectés expérimentalement, satisfaisant ainsi le postulat de Koch. Cependant, il faut noter que ce travail qui n'a pu être reproduit par d'autres auteurs, présente de ce fait un caractère controversé (Elston, comm. pers.).

En ce qui concerne les réactions immunitaires vis à vis des processus tumoraux, quelques cas de rémission ont été supposés chez Mya arenaria, suite à des examens histologiques (Cooper et al., 1982) et semblent démontrés chez Mytilus edulis par Elston (1988) à l'aide de techniques de cytofluorométrie.

D'un point de vue méthodologique, la néoplasie hémocytaire de Cerastoderma edule a été reproduite au laboratoire par transplantation d'hémocytes dans lesquels aucune inclusion virale n'a pu être observée en microscopie électronique (Twomey et Mulcahy, 1988).

Enfin, des anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes néoplasiques de Mya arenaria ont été obtenus (Reinisch et al., 1983) et utilisés pour appliquer une technique d'immunoperoxydase indirecte au diagnostic de la maladie (Smolowitz et Reinisch, 1986).

L'ensemble de ces données ponctuelles et éparses relève essentiellement de la description et de l'épidémiologie et illustre l'absence de programme suivi sur l'étude des phénomènes de néoplasies chez les Mollusques.

M A T E R I E L S E T M E T H O D E S

1 - ANIMAUX

1.1. Animaux néoplasiques

Les moules Mytilus edulis sont originaires de la côte ouest des Etats-Unis, Puget Sound (état de Washington). Le transport est effectué par avion et nécessite 48 heures. Les animaux néoplasiques sont identifiés par l'observation à l'état frais d'un prélèvement de l'hémolymphe.

1.2. Animaux sains

Les moules saines M.edulis proviennent du bassin de Marennes-Oléron.

2 - DESCRIPTION DES INSTALLATIONS

Cette maladie n'étant pas connue sur les côtes françaises, une salle spéciale a été aménagée pour des raisons de prophylaxie sanitaire. Les animaux sont placés dans des bacs de 30 l en circuit fermé avec filtration sur charbon actif. L'eau renouvelée une fois par semaine est traitée par l'hypochlorite de sodium (3 % v/v NaOCl 48°C) pendant 24 à 48 h avant d'être rejetée avec les eaux ménagères vers une station d'épuration. De plus, l'accès de cette salle est rigoureusement contrôlé.

3 - TECHNIQUES DE REPRODUCTION DE LA MALADIE

3.1. Prélèvement d'hémolymphe

Une entaille est pratiquée avec une lime à la jonction des deux valves à proximité du muscle adducteur postérieur. Cinq cents à mille cinq cents ml d'hémolymphe sont ponctionnés à l'aide d'une seringue de 1 ml dans le sinus intramusculaire.

3.2. Inoculation

Des hémolymphe de moules dont le taux d'hémocytes atypiques est supérieur à 90 % des hémocytes totaux, sont utilisées. Différentes techniques d'inoculation sont pratiquées.

- Inoculation d'hémolymphe
Le nombre d'hémocytes est estimé à l'aide d'une cellule de Malassez et la densité cellulaire des suspensions ajustée par dilution dans de l'eau de mer filtrée autoclavée (EMFA). Un volume de 50 µl de suspension d'hémocytes (1 million de cellules) est injecté dans le sinus du muscle adducteur postérieur de chaque moule.
- Inoculation de surnageant de broyats d'hémocytes
Des cellules sont broyées à l'aide d'un homogénéiseur de tissus de type Potter après comptage et dilution éventuelle dans de l'EMFA. Le broyat est ensuite centrifugé (15 000 g, 30 mn, 8°C). Le surnageant est inoculé comme décrit ci-dessus.
- Inoculation de surnageant de broyats d'hémocytes filtrés
Le broyat d'hémocytes obtenu comme précédemment est filtré sur une membrane de porosité 0.45 µm avant d'être injecté.

3.3. Conditions d'expériences

Les expériences ont été réalisées à la température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ qui correspondait à la température de la salle d'expérimentation et à la température de $5 \pm 1^\circ\text{C}$ obtenue à l'aide de cryostats.

4 - INDUCTION DE FORMATION DE PARTICULES VIRALES

Les hémolymphe de moules d'origine américaine sont examinées à l'état frais. Les animaux sont maintenus dans des bacs de 2 l d'eau de mer où les traitements sont effectués par balnéation pendant une durée de 5 jours à la température de $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Trois lots ont été préparés de la manière suivante :

Nombre	Etat des animaux	Traitements	Dose
10	non malades	Eau de mer (témoin)	-
10	non malades	Bromodéoxyuridine	100 µg/ml
5	malades	Bromodéoxyuridine	100 µg/ml

A l'issue de l'expérience, des échantillons d'hémolymphe sont fixés et préparés pour la microscopie électronique.

5 - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

5.1. Microscopie photonique

. Etat frais

Une goutte d'hémolymphe est déposée sur une lame. Après sédimentation (15 mn), les cellules sont observées au microscope inversé équipé d'un dispositif de contraste interférentiel.

. Frottis

Une goutte d'hémolymphe diluée au 1/4 dans de l'eau de mer filtrée est déposée sur une lame prétraitée à la poly-L-lysine. Après 30 mn, un lavage est effectué avec de l'eau de mer stérile et les cellules sont fixées par du méthanol et colorées (kit Hémacolor Merck, modification de la coloration hématologique de May-Grünwald-Giemsa).

. Coupes histologiques

Les animaux entiers sont fixés dans du liquide de Carson, déshydratés et inclus dans la paraffine. Des coupes d'épaisseur 3 µm sont préparées et colorées par l'hématoxyline-éosine.

5.2. Microscopie électronique

Les hémocytes en suspension sont fixés (vol/vol) dans du glutaraldéhyde (1,25 %) tamponné par du cacodylate (HCl 0.1 M, pH 7.4-7.6) dont l'osmolarité a été ajustée à 1000 mosm avec du saccharose. Après postfixation par du tétraoxyde d'osmium à 1 %, les cellules sont incluses dans de l'agarose, puis successivement déshydratées et imprégnées d'épon par passage dans un automate (Ultraprocesseur, LKB). Des coupes d'épaisseur 60 à 90 nm sont contrastées à l'aide d'un automate (Ultrostainer, LKB) par l'acétate d'uranyle aqueux et le citrate de plomb. Les observations sont réalisées au microscope électronique Jeol 1200 CX.

6 - TECHNIQUES DE CULTURE CELLULAIRE

6.1. Prélèvement aseptique de l'hémolymphe

Le muscle adducteur postérieur de la moule est repéré par transparence au travers de la coquille sous l'éclairage d'une fibre optique. La coquille est lavée avec de l'alcool à 70° et légèrement

flambée. Un trou au niveau du muscle est alors pratiqué de manière à permettre l'introduction d'une seringue dans le sinus intramusculaire. Les hémocytes sont ensuite mis en culture dans des boîtes de type Nunc (35 mm).

6.2. Milieux de culture

Les différents milieux testés ont été : le milieu 199/RPMI, le milieu 199 et l'eau de mer filtrée (0.22 μ m) (annexe). Un mélange d'antibiotiques a été ajouté en début de culture : 450 μ g/ml de pénicilline ; 450 μ g/ml de bacitracine et 150 μ g/ml de vancomycine (antibiotiques agissant sur la paroi).

7 - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

7.1. Immunisation

. Immunisation active

Quatre souris Balb/c sont immunisées par des injections intraveineuses de 300 μ l d'hémocytes atypiques (70 millions de cellules/ml) dilués au tiers dans de l'eau distillée de manière à obtenir une solution isoosmotique du sérum de souris. Quatre rappels sont effectués à 15 jours d'intervalle.

Six autres souris sont immunisées initialement de la même manière mais reçoivent un seul rappel.

. Immunisation passive

Une série de quatre injections de 300 μ l d'hémocytes normaux a été réalisée sur une souris Balb/c à intervalles réguliers de 3 jours. Une semaine plus tard, l'animal est saigné afin de récupérer le sérum qui est incubé pendant 2 h à 37°C avec 1 ml (70 millions de cellules) d'hémocytes anormaux. Après centrifugation, les cellules sont récupérées dans un tampon NaCl 0.2 M. Cette suspension cellulaire est injectée à une souris Balb/c sous 300 μ l à 4 reprises, par intervalles de 3 jours.

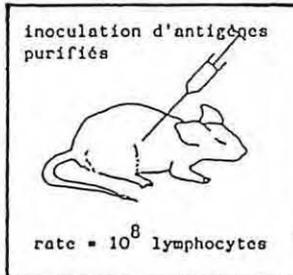
7.2. Obtention et épuration des anticorps polyclonaux

Le sang est prélevé au niveau du sinus rétroorbital de la souris puis centrifugé (900 g, 20 mn, 8°C).

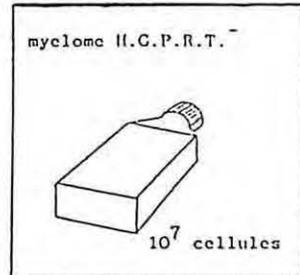
L'épuration de sérum est effectuée avec des broyats d'hémocytes normaux, traités par l'acétone. Après centrifugation (3500 g, 30 mn, 8°C) le culot est séché et réduit en poudre.

TECHNOLOGIE DE L'HYBRIDATION LYMPHOCYTAIRE

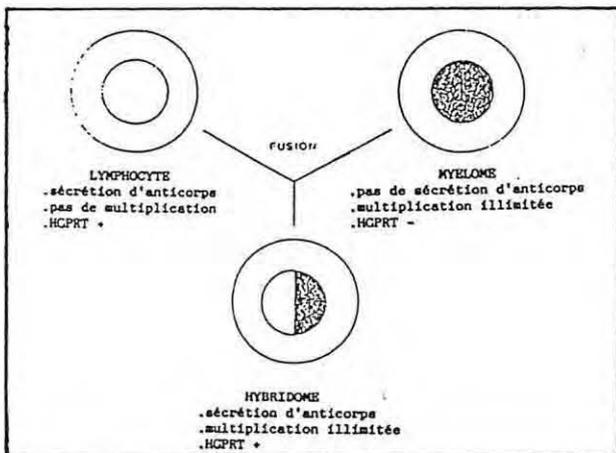
Immunisation



Préparation des cellules

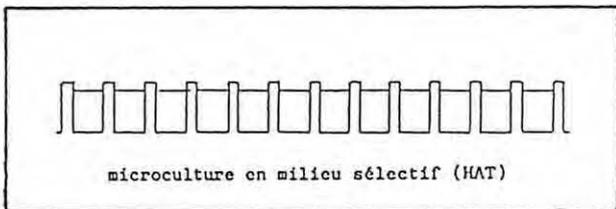


Principe de préparation d'hybridomes

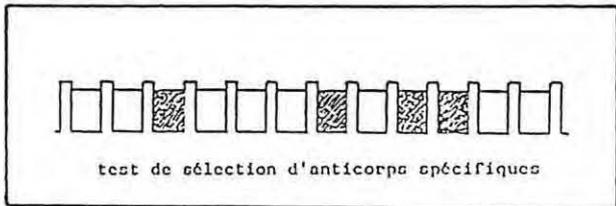


Fusion par traitement chimique (PEG)

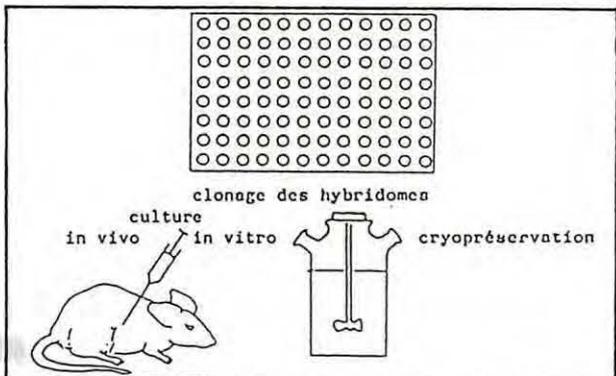
Sélection des hybridomes



Sélection d'hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques



Clonage des hybridomes



Production des hybridomes

Schéma 1

7.3. Hybridation lymphocytaire

Le protocole utilisé est une variante de la méthode de Kohler et Milstein (1975) et est résumé dans le schéma 1. L'hybridation entre les lymphocytes B spléniques de la souris immunisée et les cellules de la lignée myéломateuse P3-X63-Ag8-653 (5 lymphocytes pour 1 myérome) est assurée par la fusion des membranes de ces cellules sous l'effet du polyéthylène glycol. Les cellules sont ensuite distribuées dans des puits de culture (plaque à 96 puits, Falcon) à raison de 150 000 cellules par puits. Le rendement de la fusion étant de l'ordre de 1.5×10^{-5} , il va donc se développer en moyenne un hybridome par puits correspondant ainsi à un préclonage. L'addition d'un milieu de culture sélectif HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine) un jour après la fusion permet de conserver uniquement les hybridomes.

. Criblage des hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques des hémocytes atypiques.

La méthode de sélection des hybridomes est basée sur une double analyse de l'activité anticorps des surnageants d'hybridomes, d'une part vis à vis des hémocytes atypiques, et d'autre part vis à vis d'hémocytes normaux. Pour ce faire, ceux-ci sont adsorbés à raison de 50 000 cellules par puits, par aspiration sur la membrane durapore (0.22 μ m) d'une plaque de microtitration de type GV (Millipore). La fixation d'anticorps spécifiques sur ces antigènes est révélée à l'aide d'une technique radioimmunologique indirecte. Le protocole de cette technique est résumé dans le schéma 2.

. Clonage

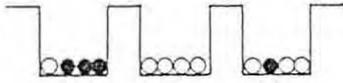
Le clonage des hybridomes retenus pour leur spécificité est effectué pour s'assurer de leur caractère monoclonal. Après dilution limite, les cellules sont réparties en microplaque de manière à obtenir 0.5 cellule par puits. La présence d'anticorps spécifiques est contrôlée selon un test immunoenzymatique de type ELISA indirect (Schéma 2).

. Production d'anticorps

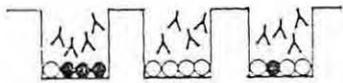
Les hybridomes clonés sont inoculés (3 à 5 millions dans 1 ml de milieu RPMI 1640) dans le péritoine de souris immunologiquement compatibles avec les lignées parentales. Les souris ont reçu 10 à 15 jours auparavant une injection de 0.5 ml de pristane pour favoriser la formation d'une tumeur liquide. Le développement ascitique des cellules permet d'obtenir une concentration importante des anticorps (de l'ordre de quelques mg/ml).

PRINCIPE DES IMMUNODOSAGES
DE TYPE INDIRECT

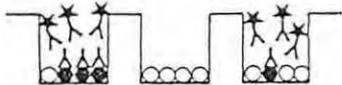
R.I.A.



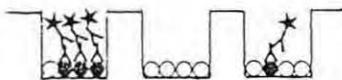
- 1) Dépôt de l'antigène
- 2) Lavage NaCl 0,5 M et filtration sous vide
- 3) Séchage à 37°C



- 4) Dépôt de l'anticorps 1
- 5) Lavage PBS

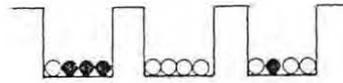


- 6) Dépôt de l'anticorps 2 couplé à de l'iode 125
- 7) Lavage PBS Tween 20 0,5%

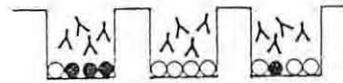


- 8) Séchage
- 9) Comptage au compteur à scintillation

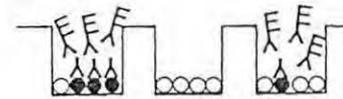
E.L.I.S.A.



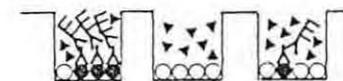
- 1) Dépôt de l'antigène
- 2) Lavage NaCl 0,5 M et filtration sous vide
- 3) Séchage à 37°C



- 4) Dépôt de l'anticorps 1
- 5) Lavage NaCl Tween 20 0,05%



- 6) Dépôt de l'anticorps 2 couplé à la phosphatase alcaline
- 7) Lavage NaCl Tween 20 0,05%



- 8) Addition du substrat de l'enzyme (Nitrophényl phosphate)
- 9) Lecture à 405 nm au lecteur de plaques

. Congélation des hybridomes

Deux à trois millions de cellules d'hybridomes clonés sont concentrés par centrifugation (350 g, 10 mn, 4°C). Le culot est mis en suspension dans 1 ml d'un mélange sérum de veau foetal/DMSO (92.5 % - 7.5 %) maintenu à 0°C. La suspension cellulaire est ensuite placée dans une ampoule qui sera refroidie progressivement jusqu'à -80°C pendant 48 heures avant d'être plongée et conservée dans de l'azote liquide.

7.4. Purification et caractérisation des anticorps monoclonaux

. Chromatographie d'affinité sur protéine A-sépharose

La protéine A-sépharose adsorbe spécifiquement les IgG des sérums, les autres protéines sont éliminées par simple lavage à différents pH. Les ascites sont préalablement filtrées sur toile puis sur filtre 8 µm afin d'éviter l'obstruction de la colonne. Un volume de gel correspondant à la quantité de l'anticorps à purifier est utilisé (22 ml pour 20 ml d'ascite). Les anticorps sont élués après passage de l'ascite grâce à un tampon citrate de sodium 0.1 M, à différents pH : IgG1 (pH 5.5), IgG2a (pH 4.5), IgG3 (pH 4), IgG2b (pH 3.5).

. Caractérisation isotypique des anticorps

Les solutions d'anticorps purifiés sont testées selon la méthode d'Ouchterlony contre les différentes immunoglobulines anti IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3.

7.5. Techniques d'immunofluorescence indirecte (I.F.I.)

Une goutte d'hémolymphe est déposée sur une lame histologique de type "microprint". Après fixation à l'acétone (10 mn) et séchage à l'air, les lames sont incubées en chambre humide (15 mn, température du laboratoire) avec les suspensions d'anticorps dilués dans du tampon phosphate pour I.F.I.. Après lavage, les lames sont incubées (30 mn) avec une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de souris, couplés à de l'isothiocyanate de fluorescéine et dilués au 1/100ème. Les lames sont enfin lavées et montées dans du tampon glycérolé et examinées au microscope à épifluorescence.

R E S U L T A T S

1 - ETUDE DE LA NATURE Tumorale DES HEMOCYTES

Cette étude repose sur trois thèmes de recherche élaborés à partir des critères de référence qui ont été établis chez les Vertébrés :

- caractéristiques morphologiques et ultrastructurales
- comportement en culture in vitro
- prolifération dans un hôte syngénique

1.1. Etude anatomopathologique

Chez les moules françaises saines, deux types cellulaires sont identifiés : des granulocytes riches en granules avec un rapport nucléocytoplasmique faible et des hyalinocytes peu différenciés avec un gros noyau. Chez certains individus d'origine américaine, des cellules atypiques, rondes, plus grandes, à fort rapport nucléocytoplasmique et ayant perdu leur capacité d'agrégation et d'adhésion à un support de verre sont visualisées (fig. 1). Ce type de cellules peut être majoritaire voire exclusivement représenté. Sur coupes histologiques, des figures de mitose sont fréquemment observées dans les hémocytes atypiques mais très rarement dans les cellules normales (fig. 2). Des infiltrations et parfois des lésions tissulaires sont rencontrées (fig. 3 et 4).

Les grandes cellules atypiques présentent un diamètre cellulaire de 11 à 14 μm et nucléaire de 8 à 9 μm . Les hyalinocytes (fig. 5) et les granulocytes (fig. 6) normaux mesurent respectivement de 6 à 8 μm et de 8 à 11 μm de diamètre cellulaire et de 3 à 5 μm et de 1.5 à 4 μm de diamètre nucléaire.

L'étude ultrastructurale des cellules anormales révèle des noyaux très polymorphes, lobés, avec d'importantes invaginations qui renferment des organites cytoplasmiques. De très nombreux noyaux contiennent un ou plusieurs gros nucléoles de type compact, avec des cas de margination. L'hétérochromatine se localise à la limite de la membrane nucléaire (fig. 7 et 8).

Le cytoplasme ne contient pas d'appareil de Golgi. Les mitochondries sont peu nombreuses et présentent un aspect normal. Les ribosomes sont rarement associés à du réticulum endoplasmique. En outre, des granules de structure amorphe, de taille variable, faiblement denses aux électrons et non limités par une membrane sont fréquemment rencontrés.

Lors de ces examens, aucune image assimilable à des particules virales n'a été observée.

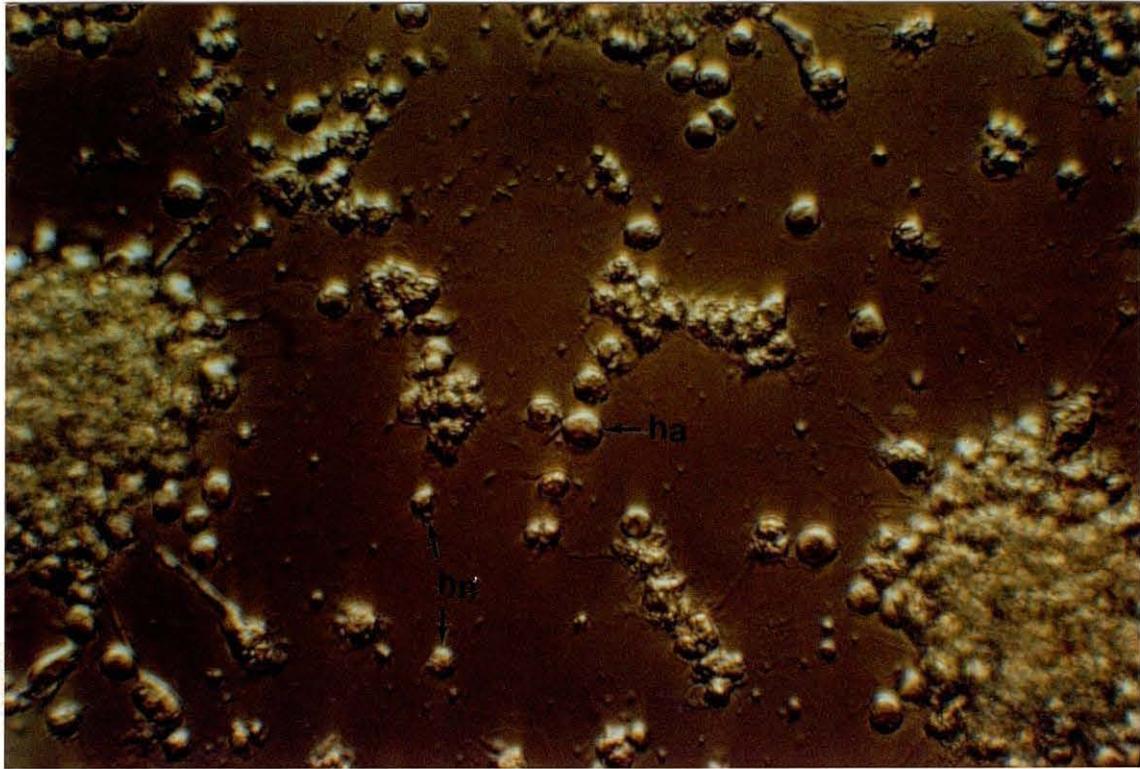


Fig. 1 : Examen à l'état frais d'hémocytes anormaux (ha) et normaux (hn), contraste de phase (X 250)

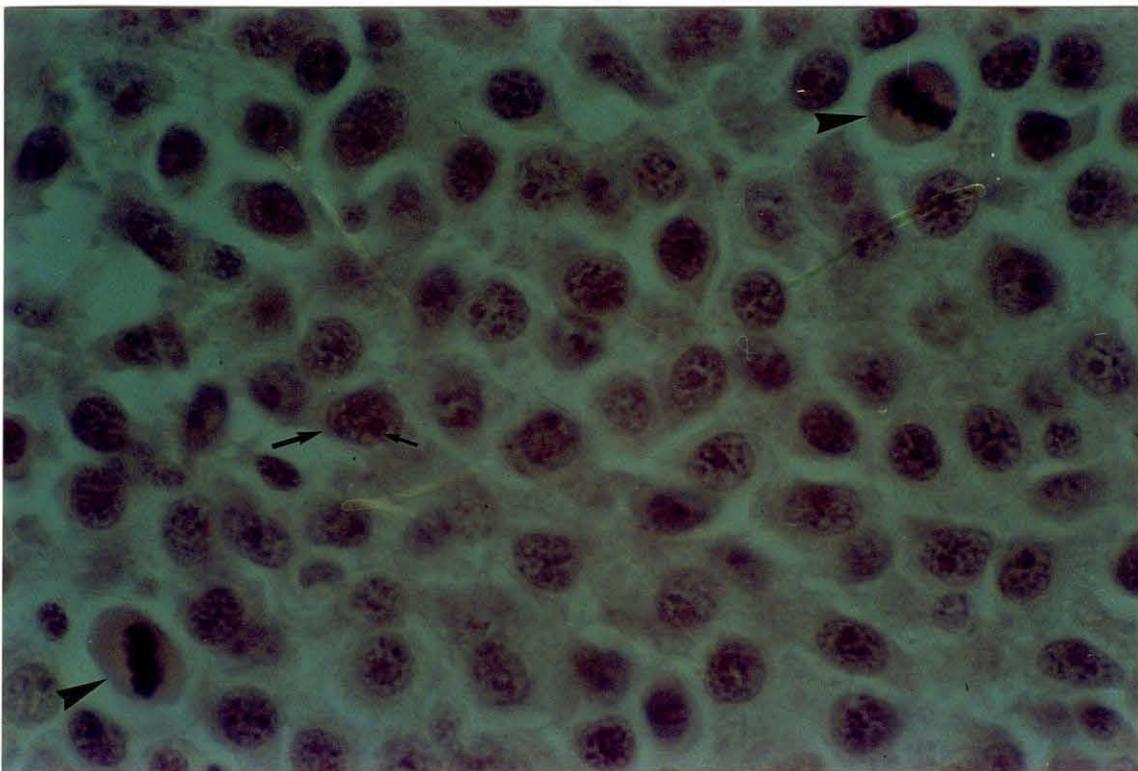


Fig. 2 : Hémocytes anormaux (X 500)
Noyau (←), nucléole (←), figures de mitose (◄)

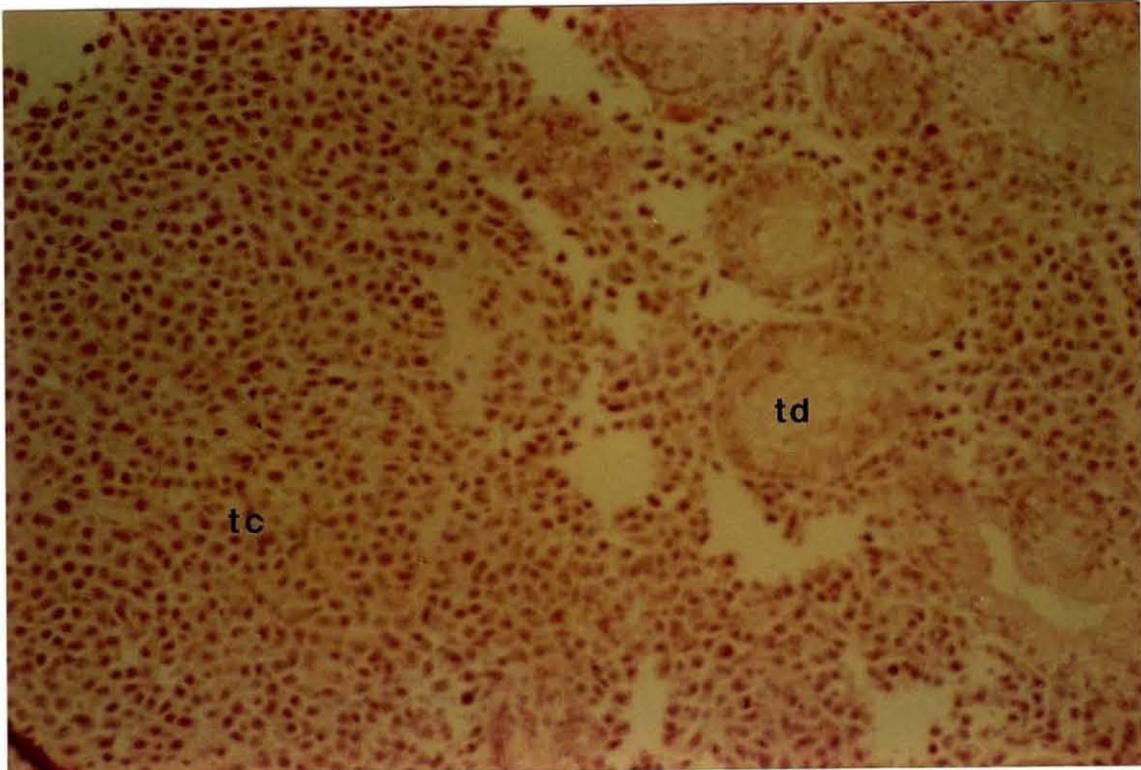


Fig. 3 : Infiltration des cellules anormales au niveau du tissu conjonctif vésiculaire (tc)
(X 125)

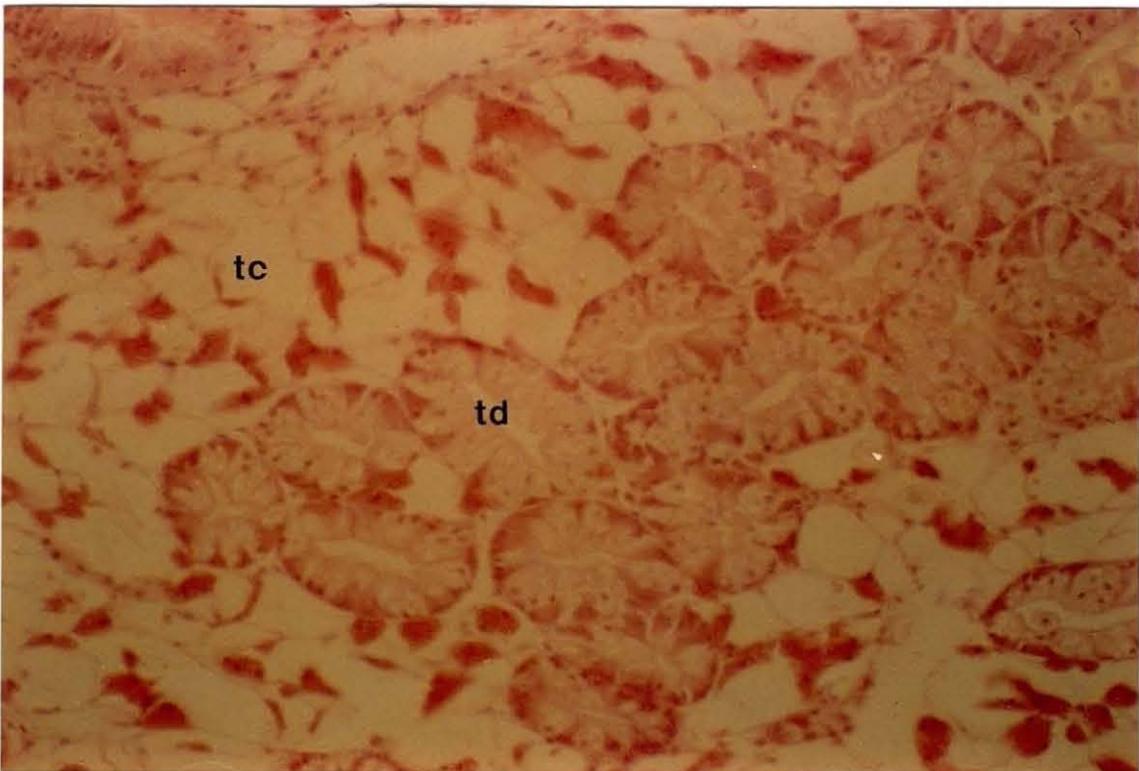
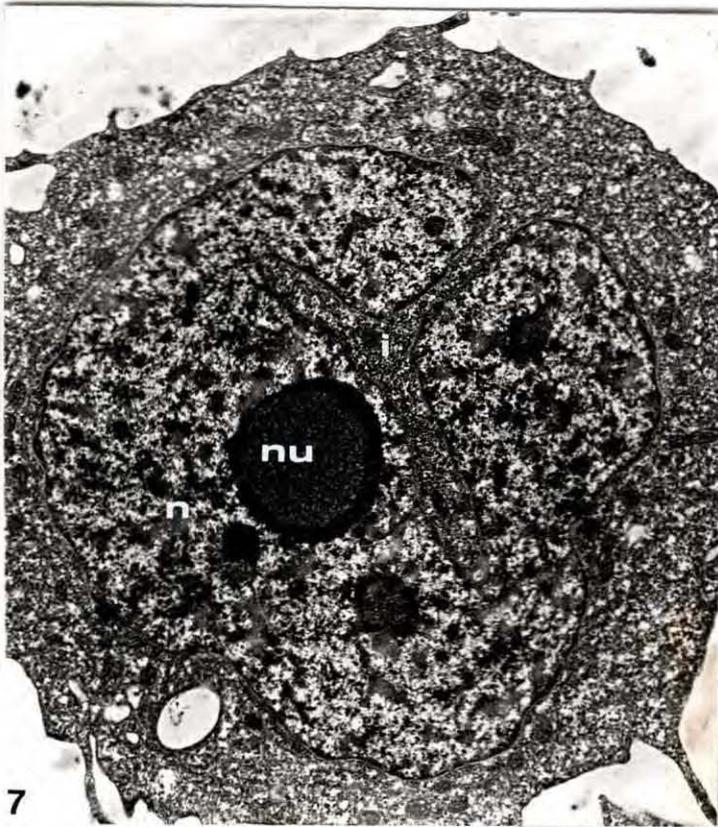
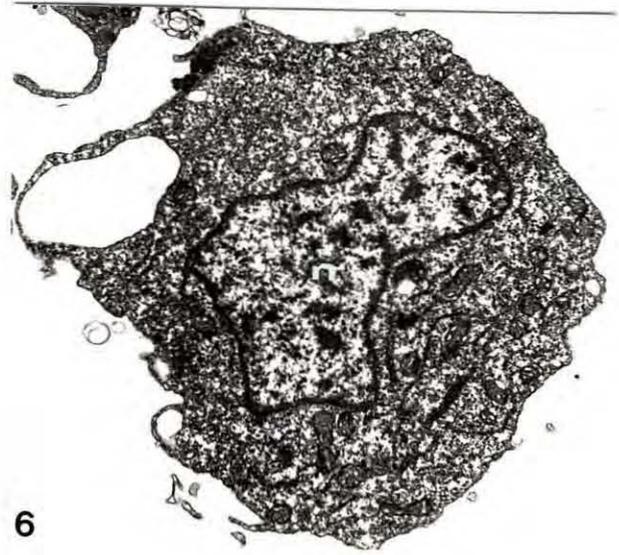
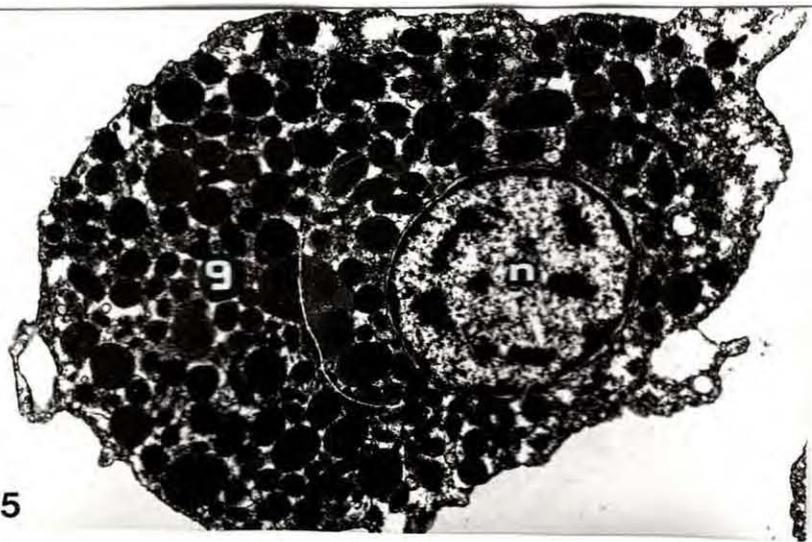


Fig. 4 : Tissu conjonctif vésiculaire (tc) et tubules digestifs (td)
d'une moule saine
(X 125)



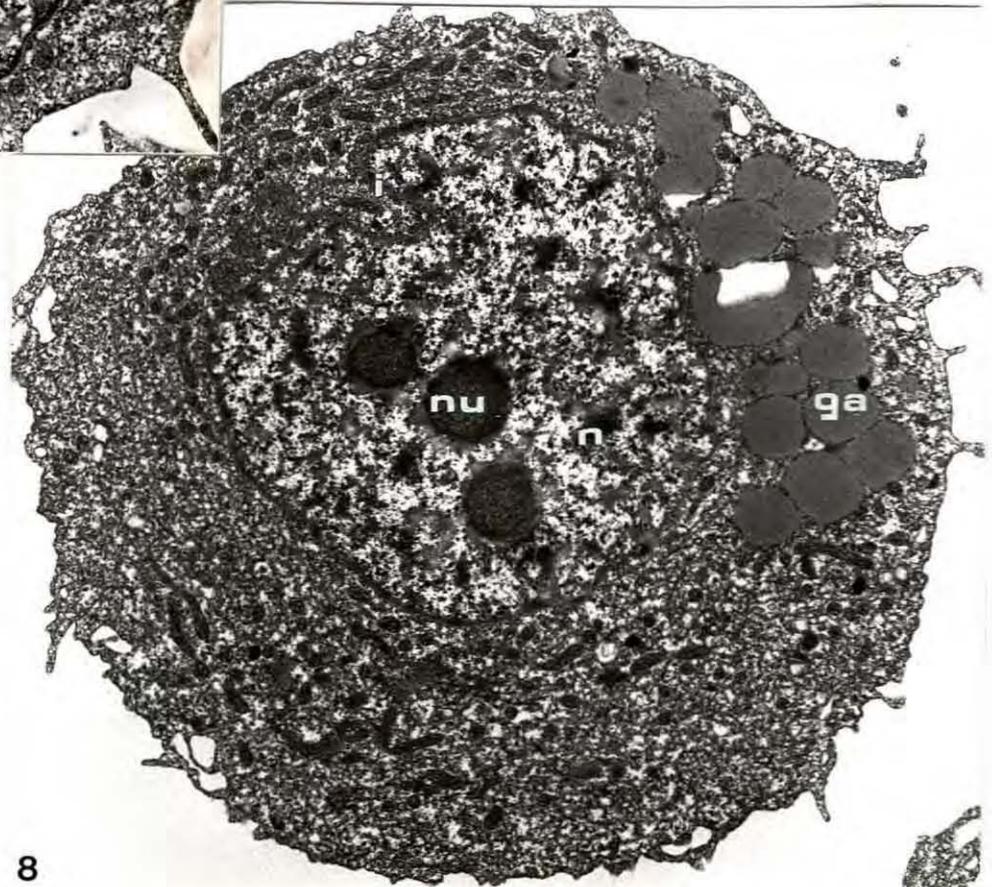
Figures

5. Granulocyte normal

6. Hyalinocyte normal

7 & 8. Hémocytes normaux

7



Légende

g. Granule

ga. Granule amorphe

i. Invagination de la membrane nucléaire

n. Noyau

nu. Nucléole

1 μm

8

1.2. Etude in vitro

La mise en culture d'hémocytes normaux et atypiques a été réalisée dans de l'eau de mer filtrée (0.22 µm) et dans différents milieux (199 ; RPMI 1640/199, 50 % v/v), (Annexe). Dans l'eau de mer, la survie moyenne des hémocytes normaux est environ de 21 jours. Au bout de ce délai, des altérations commencent à être observées : apparition de granulations ; diminution de la réfringence ; mise en suspension des cellules. Aucune différence notable dans la survie cellulaire n'a pu être appréciée entre les hémocytes normaux et atypiques (fig. 9). Les résultats sont très proches voire inférieurs avec les différents milieux testés. De plus, dans aucun cas, notamment pour les cellules atypiques n'a été mise en évidence de multiplication cellulaire.

L'incorporation de thymidine tritiée par les hémocytes atypiques et normaux a été mesurée 3 h et 6 jours après la mise en culture (tableau 2)

Incorporation	3 heures de culture	6 jours de culture
hémocytes normaux BC 1	5 600	1 600
BC 2	6 400	5 000
hémocytes anormaux BC 1	11 000	-
BC 2	33 000	5 000

Tableau 2 : Taux d'incorporation de thymidine tritiée (cpm/10⁶cellules) - BC : boîte de culture

Ces résultats suggèrent une multiplication active des cellules anormales en début de culture mais au bout de 6 jours, aucune différence n'est remarquée entre les deux types de cellules.

1.3. Transplantation d'hémocytes anormaux

La transplantation d'hémocytes anormaux chez des animaux sains a été effectuée à 2 températures différentes pouvant être assimilées aux valeurs extrêmes notées dans le milieu naturel. Les résultats de ces expériences sont regroupés dans le tableau 3 :

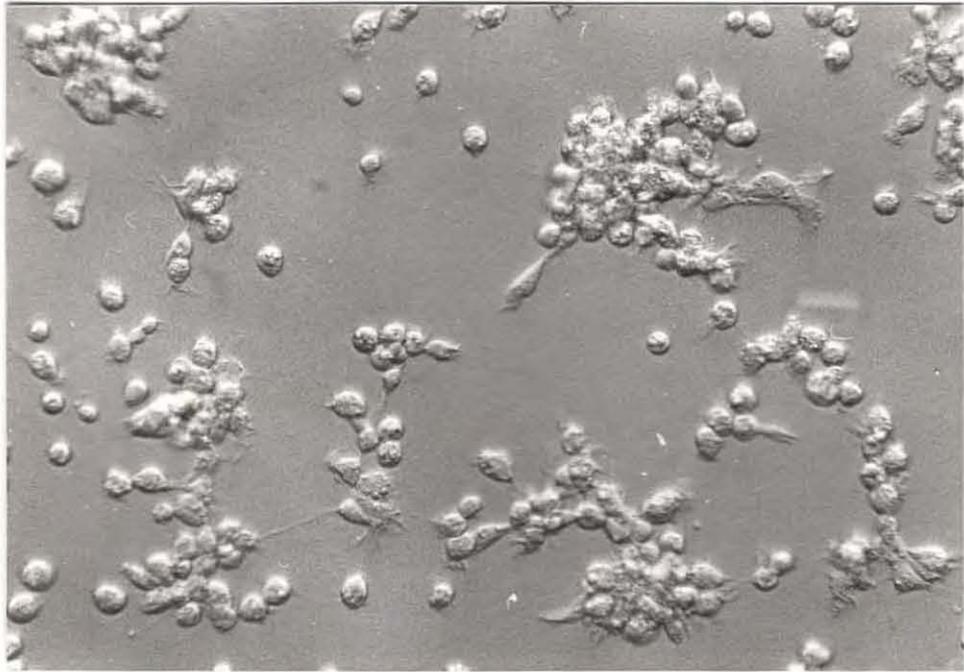


Fig. 9 : Primoculture d'hémocytes anormaux, J + 14,
contraste de phase
(X 250)

Température	Durée de l'expérience	Nb animaux début exp.	Nb animaux fin exp.	Mortalités %	Nb animaux malades %
5 ± 1°C	2 mois	100	73	27 %	55 %
21 ± 1°C	4 mois	35	20	43 %	5 %

Tableau 3 : Résultats des expériences de transplantation d'hémocytes anormaux

Il apparaît que la maladie peut être transmise à des individus sains par cette technique. Toutefois, le pourcentage d'animaux malades est supérieur lorsque la température de l'eau de mer est très faible. De plus, le développement de la maladie est plus rapide.

1.4. Discussion

La nature tumorale des hémocytes atypiques a été étudiée sous 3 aspects : anatomopathologie, culture *in vitro*, transplantation cellulaire.

L'étude anatomopathologique révèle les caractéristiques morphologiques et comportementales de ces hémocytes anormaux. Une de leurs propriétés essentielles est l'importante prolifération cellulaire sans localisation préférentielle. Il faut souligner que l'observation de figures de mitose dans les hémocytes est normalement très rare chez les Mollusques.

L'hypothèse d'un caractère tumoral de ces cellules suggérée par les études précédentes, est renforcée par l'examen ultrastructural comparé. En effet, la grande taille de ces cellules peu différenciées, leur rapport nucléocytoplasmique élevé, les irrégularités de forme du noyau ainsi que la présence et le nombre des nucléoles sont des critères parmi les plus importants de diagnostic d'un état tumoral chez différents types cellulaires de Vertébrés (Ghadially, 1985). Ces caractéristiques sont également observées chez des tumeurs de monocytes humaines (Kim et al., 1982). La densité élevée des ribosomes libres reflète probablement une synthèse active de protéines endogènes nécessaires pour la croissance et la division cellulaire.

Un aspect complémentaire a été abordé par les expériences de culture *in vitro*. La survie des hémocytes atypiques n'est pas supérieure à celle des cellules normales quelque soit le milieu testé. La présence de thymidine tritiée dans le milieu a montré que les hémocytes anormaux ont une capacité d'incorporation supérieure à celle des cellules normales au moment de la mise en culture, ce qui doit être rapproché de multiplication cellulaire. Il est probable que les conditions de culture puissent être inadaptées pour un développement

ultérieur de ces cellules. En effet, il faut rappeler qu'en dépit de nombreux travaux, aucune lignée cellulaire de Mollusque bivalve n'a pu être établie à ce jour (Mialhe et al., 1988). Ceci souligne le besoin de recherches concertées notamment en physiologie et en endocrinologie. Dans ce contexte, il apparaît que ces hémocytes atypiques pourraient constituer un test biologique particulièrement favorable à une analyse précise du rôle de différents additifs aux milieux de culture : précurseurs, facteurs mitotiques.

Chez les Vertébrés, la disponibilité de lignées cellulaires a permis d'établir un certain nombre de critères de référence pour définir les cellules tumorales : perte de l'inhibition de contact, croissance indéfinie, perte de la capacité d'adhésion sur un support solide, faibles exigences en facteurs de croissance sériques. L'absence de critères concernant la croissance in vitro de cellules de Mollusques rend difficile une extrapolation directe de cette définition et donc l'assimilation des hémocytes atypiques à des cellules tumorales.

Par contre, le succès des transplantations des hémocytes anormaux chez un hôte syngénique étaye l'hypothèse de leur caractère tumoral sans pouvoir préciser si la nature est génétique, physiologique (carcinogènes de l'environnement) ou infectieuse.

2 - ETIOLOGIE DE LA MALADIE

Des essais de reproduction expérimentale de la maladie et d'induction de particules virales ont été entrepris en vue de préciser l'étiologie de ce syndrome.

2.1. Essais de reproduction de la maladie

Ces expériences ont été effectuées par inoculation de cellules entières et de broyats d'hémocytes, filtrés (0.45 μ m) ou non, comparativement avec un lot témoin inoculé avec de l'eau de mer filtrée.

Le tableau 4 reproduit les résultats obtenus, établis d'après l'examen de préparations d'hémolymphe à l'état frais et de coupes histologiques. Ces essais ont été réalisés également à deux températures différentes.

Le premier élément qui ressort de ces résultats s'avère être l'importance de la température. En effet à 20°C, peu ou pas d'animaux malades sont recensés, même 5 mois après inoculation. Cette température apparaît nettement défavorable au déroulement correct de l'expérience car de nombreuses mortalités sont observées toujours liées à une pollution microbienne très rapide des bacs après la mort d'une moule.

Par contre, à 5°C, ces difficultés expérimentales sont limitées et les taux de survie des animaux sont meilleurs. Dans ces conditions, la maladie peut être transmise aisément et assez rapidement (2 mois). Au bout de ce délai, un certain nombre d'individus présente un stade avancé, selon la classification utilisée par Mix (1983).

L'inoculation du surnageant d'un broyat d'hémocytes atypiques, à 5°C, permet d'obtenir une proportion élevée (80 %) de moules malades. Enfin, il faut noter la présence d'un pourcentage important (71 %) d'individus atteints parmi les animaux du lot témoin placé à côté des bacs correspondant aux moules infectées.

2.2. Essais d'induction de particules virales

Des essais d'induction de particules virales ont été effectués avec de la 5-bromo 2-déoxyuridine dont l'activité inductrice est bien établie pour les rétrovirus.

Les hémolymphe des animaux sont observées en microscopie électronique, 5 jours après le traitement. Des images de bourgeonnement ont été détectées au niveau de la membrane plasmique des hémocytes atypiques (fig. 10). Il s'agit de particules subsphériques de 100 nm de diamètre moyen dont le nucléoïde dense aux électrons est bordé par une membrane unitaire. L'ensemble est entouré par une enveloppe apparemment lisse constituée également d'une membrane unitaire.

	Durée de l'expérience	Nombre animaux début expérience	Nombre animaux fin expérience	Mortalités %	Nombre animaux malades
Expérience 1 (20°C)					
Cellules entières	3 mois	207	7	97 %	0 %
Broyat cellules	3 mois	134	2	98 %	100 %
Broyat filtré à 0.45 µm	3 mois	164	4	99 %	0 %
Expérience 2 (20°C)					
Broyat cellules	5 mois	147	8	95 %	0 %
Broyat filtré à 0.45 µm	5 mois	134	32	76 %	3 %
EMFA	5 mois	109	8	93 %	0 %
Expérience 3 (5°C)					
Cellules entières	2 mois	100	73	27 %	55 %
Broyat cellules	2 mois	100	76	24 %	80 %
EMFA	2 mois	100	51	49 %	71 %

Tableau 4 : Résultats des expériences de reproduction de la maladie à 2 températures différentes



Fig. 10: Bourgeoisements de particules de type rétroviral au niveau de la membrane plasmique d'un hémocyte anormal

50 nm



Fig. 11: Inclusion cristalline à l'intérieur d'une mitochondrie d'un hémocyte anormal

100 nm

Au niveau des mitochondries, des anomalies ultrastructurales ont parfois été visualisées. Ce sont des inclusions cristallines de taille variable (fig. 11).

2.3. Discussion

L'étiologie infectieuse de cette prolifération hémocytaire est fortement suspectée au vu des essais d'infections expérimentales avec des broyats de cellules anormales. Les quelques cas d'animaux qui ont développé la maladie avec des suspensions filtrées (0.45 µm) suggèrent que l'agent causal puisse être un virus. En outre, il faut noter le fort pourcentage de contaminations spontanées des individus témoins. Ceci peut s'expliquer par la propagation entre bacs, de virus ou de cellules dans les aérosols produits par le bullage. Il apparaît donc nécessaire de reproduire la maladie dans des conditions plus drastiques d'isolement.

Les données acquises à la température de 5°C sont particulièrement importantes à considérer d'un point de vue épidémiologique, cette faible température pouvant constituer un élément prépondérant pour la transmission de la maladie dans le milieu. Cela doit être rapproché des observations de Mix (1983) qui montrent qu'en Orégon, U.S.A., la prévalence de cette prolifération est plus forte en fin d'hiver.

L'hypothèse d'une étiologie virale est confortée par les essais d'induction avec la 5-bromo 2-déoxyuridine. En effet, les images de bourgeonnement obtenues en microscopie électronique permettent de soupçonner la présence d'un rétrovirus. Cependant, des essais in vitro accompagnés d'une recherche systématique de réverse transcriptase après purification sur gradient de saccharose seront entrepris pour confirmer la nature de l'agent. La thèse d'une étiologie infectieuse élimine donc les autres possibilités quant à la nature de la maladie.

Enfin, les anomalies mises en évidence dans les mitochondries doivent être rapprochées de celles observées par Rasmussen (1986) chez la même espèce, pour un cas de granulocytome associé à une infection par un picornavirus. Cet auteur n'établit en fait aucune relation entre la présence de ces anomalies et celle du virus. La signification de ces particularités consécutives au traitement par la 5-bromo 2-déoxyuridine reste à analyser.

3 - PREPARATION D'ANTICORPS SPECIFIQUES

La préparation de réactifs spécifiques des cellules anormales a été entreprise par simple immunisation (anticorps polyclonaux) et selon la technique d'hybridation lymphocytaire (anticorps monoclonaux). L'intérêt de tels réactifs est d'acquérir des outils fiables d'identification et de quantification des hémocytes anormaux dans un but de diagnostic mais aussi d'étude des phénomènes immunologiques chez les Mollusques.

3.1. Obtention des anticorps polyclonaux

Des sérums polyclonaux ont été obtenus après immunisation active de souris avec des suspensions pratiquement pures d'hémocytes anormaux. La spécificité antigénique de ces anticorps a été testée parallèlement sur les cellules normales et atypiques par une méthode ELISA et par immunofluorescence indirecte. Dans ces conditions, le signal obtenu est aussi important sur les deux types de cellules, ce qui indique qu'un grand nombre d'épitopes sont communs aux cellules normales et atypiques.

Dans le but d'amender la spécificité de ces immunosérums, des essais d'épuration ont alors été mis en oeuvre en les incubant avec des préparations acétoniques d'hémocytes normaux. Théoriquement, un tel traitement doit permettre d'éliminer les anticorps spécifiques d'antigènes communs aux deux types de cellules et de conserver dans le sérum les anticorps dirigés contre les antigènes caractéristiques d'hémocytes anormaux. Cependant, les résultats obtenus par la technique ELISA et par immunofluorescence indirecte prouvent qu'il n'est pas possible de rendre spécifiques de tels immunosérums.

3.2. Obtention des anticorps monoclonaux

Des anticorps monoclonaux ont été préparés selon le protocole décrit en détail dans le chapitre matériel et méthodes. L'état d'immunisation des souris a été évalué par dosage des sérums selon une méthode radioimmunologique indirecte. Parmi les souris ayant reçu une immunisation active, seule une souris (A) présente une activité immunologique spécifique des hémocytes atypiques supérieure à celle des cellules normales. La souris immunisée de manière passive (B) et la souris A ont été retenues pour deux fusions (fig. 12).

. Bilan de la fusion et du criblage

Les lymphocytes B spléniques des souris A et B ($113. 10^6$ et $156. 10^6$ cellules, respectivement) ont été fusionnés avec des cellules de la lignée myélomateuse. Les cellules sont ensuite distribuées à raison d'une cellule par puits dans les plaques 1 à 9 pour la souris A et 10 à 21 pour la souris B. Par ce moyen, un préclonage est effectué. Le bilan des deux fusions est reporté dans le tableau 5. En fait, il n'apparaît pas de différences significatives entre les deux protocoles d'immunisation.

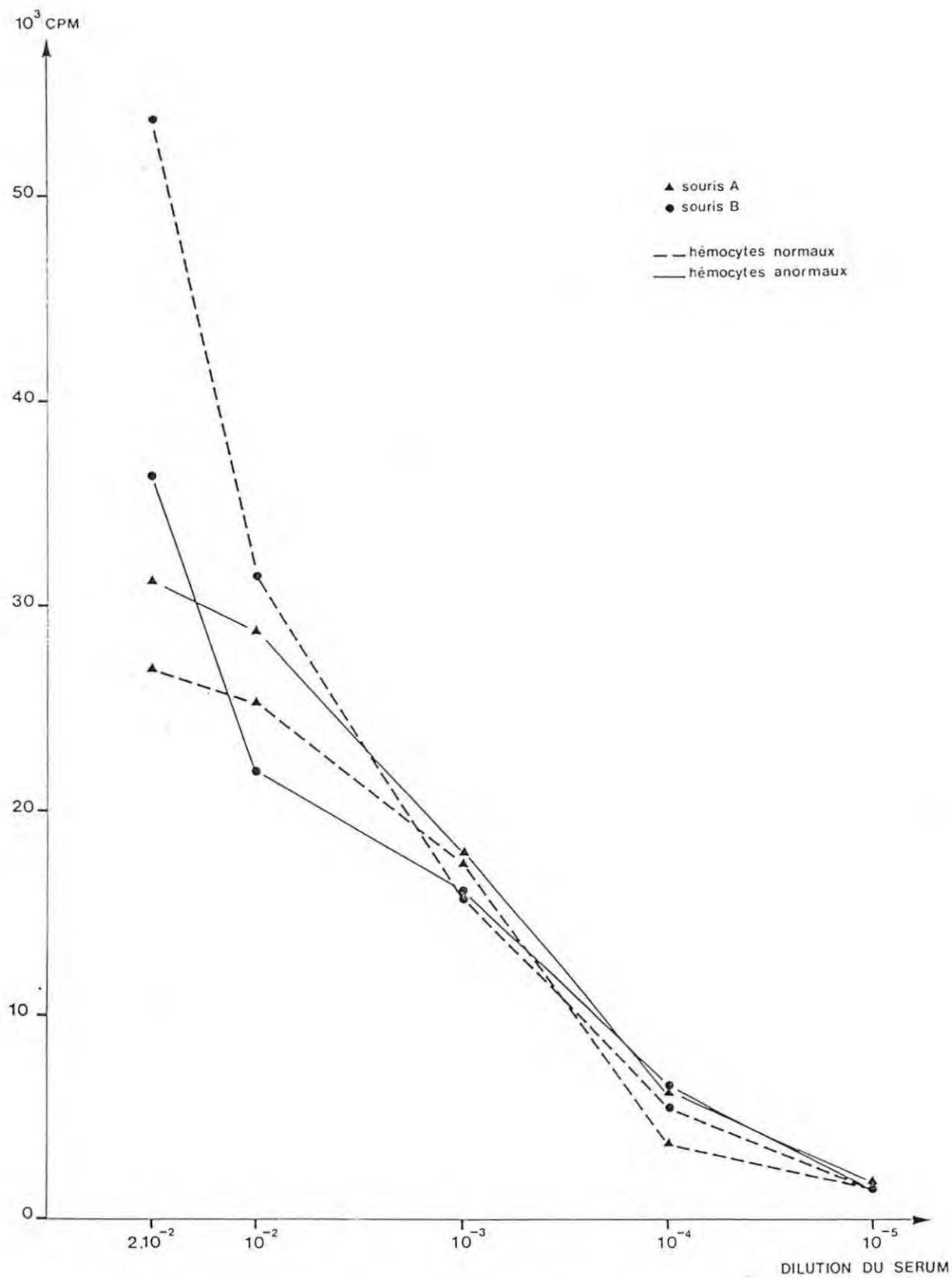


Fig. 12 : Etat d'immunisation des deux souris A et B vis à vis des hémocytes anormaux

N° plaque	Date du screening	Nombre puits poussés et testés	Nombre puits SN (spécifiques & anormales)	Nombre puits SS (spécifiques & saines)	Nombre puits NS (non spécifiques = communs)
1 à 9 (Immunisat. active)	J 13	250/864 (29 %)	Spécifiques 8 Transférés 7 Confirmés 4	2 2 1	3 2 2
	J 17	674/1140 (67 %)	Spécifiques 26 Transférés 17 Confirmés 7	3 0 0	2 0 0
		Moyenne = 48 %	Total des puits confirmés après transfert 11/24	1/2	2/2
10 à 21 (Immunisat. passive)	J 13	575/864 (59 %)	Spécifiques 24 Transférés 20 Confirmés 12	7 7 6	9 1 1
	J 17	906/1140 (79 %)	Spécifiques 10 Transférés 9 Confirmés 4	6 2 1	3 1 0
		Moyenne = 69 %	Total des puits confirmés après transfert 16/29	7/9	1/2
			Total hybridomes confirmés 27	8	3

Tableau 5 : Bilan de la fusion

La méthode de criblage des hybridomes qui a été conçue consiste à comparer l'activité des surnageants de culture vis à vis des hémocytes atypiques d'une part et des cellules normales d'autre part. Ceci était nécessaire suite aux observations des profils d'immunofluorescence réalisés avec des anticorps polyclonaux qui révélaient la présence d'une majorité d'antigènes communs aux deux types cellulaires. Il était donc important d'identifier les hybridomes spécifiques, éventuellement peu sécréteurs parmi ceux qui auraient une forte activité sécrétrice d'anticorps dirigés contre des antigènes communs aux deux types cellulaires. Une différence de signal de 3000 cpm entre les réactivités des hybridomes sur hémocytes normaux et atypiques a été retenue comme critère de spécificité. Ainsi, trois catégories d'hybridomes sécréteurs d'anticorps ont été caractérisées. Ceux-ci sont dirigés soit spécifiquement contre les cellules atypiques ou contre les cellules normales, soit non spécifiquement contre les deux types cellulaires. Les hybridomes peuvent être classés en 2 groupes, ceux qui possèdent une activité de l'ordre de 6 000 cpm et ceux qui ont une activité d'environ 15 000 cpm.

. Clonage

Seuls les deux hybridomes (14F1 et 16G10) présentant la plus forte activité spécifique des hémocytes anormaux et l'hybridome (11F3) possédant une activité dirigée non spécifiquement contre les cellules normales et atypiques ont été clonés. Les résultats du clonage sont répertoriés dans le tableau 6.

Hybridomes clonés	Activités spécifiques (en D.O.)	
	sur cellules néoplasiques	sur cellules normales
16G10 - 2B9	1396	390
16G10 - 5B9	1308	320
16G10 - 2F6	691	250
16G10 - 4F8	1005	345
14F1 - 1C9	781	297
14F1 - 5E9	1077	356
14F1 - 3D11	813	302
11F3 - 4H3	451	644
11F3 - 5E11	345	682

Tableau 6 : Activités spécifiques des hybridomes clonés

Les sept clones spécifiquement dirigés contre les hémocytes anormaux ont conservé une activité importante. Par contre, il semble que les deux clones 11F3-4H3 et 11F3-5E11 aient une activité plus faible, après clonage.

3.3. Purification et caractérisation des anticorps monoclonaux

Deux solutions d'anticorps monoclonaux (14F1-5E9 et 16G10-5B9) produits en ascite ont été soumises à une électrophorèse sur gel homogène de polyacrylamide (7.5 %). Après migration et par comparaison avec une série de marqueurs de poids moléculaire, ces anticorps ont été identifiés comme étant de classe G. Ceux-ci ont été ensuite purifiés par chromatographie d'affinité et 150 mg de chacun ont été recueillis.

Les isotypes des anticorps purifiés ont été déterminés par le profil d'éluion, lors de la purification et confirmés par la technique d'Ouchterlony :

Anticorps	pH d'éluion	Isotype
14F1 - 5E9	5.5	IgG1
16G10 - 5B9	3	IgG2b

3.4. Localisation des épitopes reconnus

La spécificité de ces 2 anticorps a été confirmée par la technique d'immunofluorescence indirecte après purification. Comme le montrent les figures 13 et 14, ces anticorps reconnaissent exclusivement les hémocytes anormaux et semblent spécifiques d'épitopes membranaires.

3.5. Discussion

La recherche de réactifs spécifiques de ces cellules a débuté par la préparation de sérums polyclonaux. En dépit d'une étape d'épuration qui nécessite des quantités importantes de préparations acétoniques d'hémocytes normaux, les solutions d'anticorps polyclonaux n'ont pas été rendues spécifiques. L'obtention d'anticorps monoclonaux a alors été envisagée. Le protocole utilisé consistait en un préclonage de manière à ne pas masquer l'activité de certains hybridomes. De plus, le double criblage a permis de retenir les hybridomes selon leur spécificité relative vis à vis soit d'hémocytes atypiques, soit de cellules normales.

Après clonage, deux anticorps monoclonaux présentant une forte activité contre les hémocytes anormaux ont été purifiés. L'étude en immunofluorescence montre qu'ils reconnaissent des épitopes bien représentés sur ces cellules. Grâce à ces anticorps spécifiques, deux types d'immunodosage vont pouvoir être mis en oeuvre :

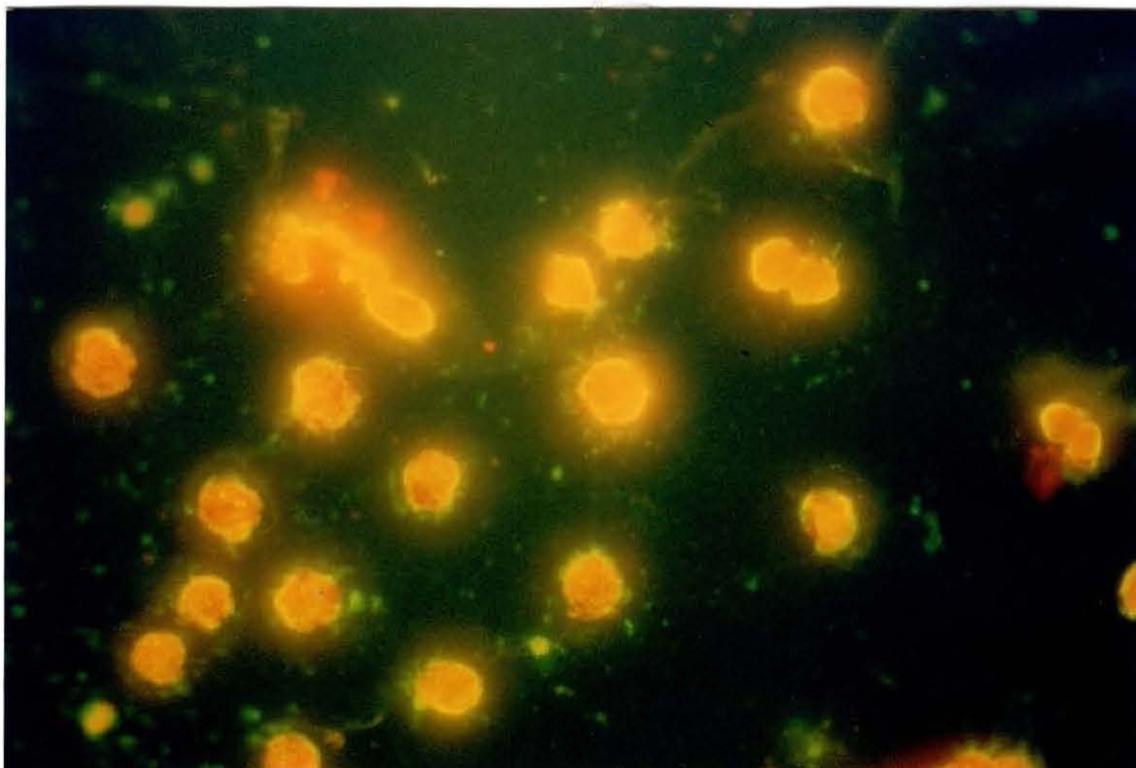


Fig. 13 : Immunofluorescence indirecte - Image obtenue sur les cellules anormales avec l'anticorps 16 G 10-5 B 9 (X 500)

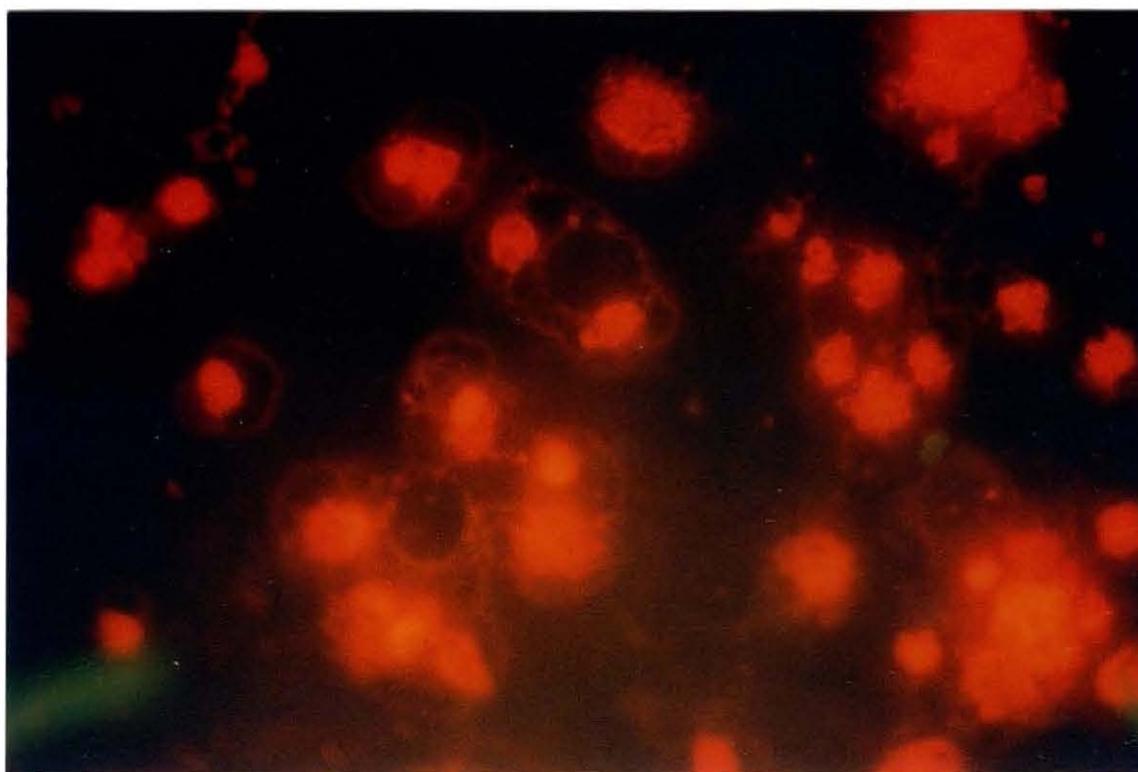


Fig. 14 : Immunofluorescence indirecte - Image obtenue sur les cellules normales avec l'anticorps 16 G 10-5 B 9 (X 500)

- la technique d'immunofluorescence indirecte comme outil de diagnostic précoce.
- la technique ELISA dont un protocole sur membrane GV est d'ores et déjà mis au point mais dont l'application à des études cliniques reste à vérifier pour déterminer sa spécificité et sa sensibilité par rapport aux méthodes histologiques de référence. Ce travail doit être entrepris selon un protocole ELISA direct, après couplage de l'anticorps à la phosphatase alcaline, la peroxydase ne pouvant être utilisée du fait de la forte activité intrinsèque des hémocytes.

Les anticorps spécifiques des hémocytes normaux vont être utiles dans la compréhension des phénomènes de différenciation des cellules circulantes et dans l'étude de leurs fonctions.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

De nombreux cas de prolifération hémocytaire ont été signalés chez les Mollusques mais aucun modèle expérimental n'a été établi et n'a donné lieu à un programme de recherche suivi.

La reproduction au laboratoire de cette maladie de la moule Mytilus edulis fournit l'occasion de disposer d'un tel modèle. En effet, les transplantations effectuées chez des animaux maintenus à basse température garantissent des résultats dans des délais relativement brefs. Dans ces conditions, des investigations de type anatomopathologique peuvent être entreprises aisément. Un aspect particulièrement intéressant concerne l'immunité antitumorale, les infections expérimentales montrant une variabilité individuelle et des cas de rémission étant signalés par Elston (1988). Ces observations suggèrent que les cellules atypiques puissent être reconnues et phagocytées ou encapsulées. Ainsi, les cellules tumorales seraient phénotypiquement assimilées à des éléments étrangers. Les épitopes membranaires de ces cellules, qui sont reconnus spécifiquement par des anticorps monoclonaux, pourraient donc avoir valeur de "déterminants antigéniques".

L'utilisation de cultures in vitro d'hémocytes doit permettre, en appliquant des techniques d'histologie et de chimioluminescence, de préciser les interactions hémocyte normal - hémocyte atypique. La faisabilité de telles expériences est étayée par les résultats récemment obtenus sur les mécanismes de reconnaissance de phagocytose et de survie intracellulaire qui sont établis entre le protozoaire Bonamia ostreae et les hémocytes d'Ostrea edulis (Chagot, 1988).

Dans le domaine plus général de l'immunologie des Mollusques, les anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes anormaux constituent des outils de choix pour détecter les sites d'hématopoïèse qui sont inconnus à ce jour. En effet, il peut être supposé que pour des phases précoces de la maladie, les hémocytes atypiques se trouvent préférentiellement dans ces sites. Par ailleurs, il faut noter que des hybridomes préclonés sont sécrétteurs d'anticorps spécifiques de différents types d'hémocytes normaux comme l'attestent les examens en immunofluorescence indirecte. Il devrait être possible d'établir, à l'instar des données acquises en hématologie chez les Vertébrés, une classification et une filiation de ces types hémocytaires. Cette approche histogénésique, qui serait originale chez les Mollusques bivalves pourrait être couplée à une étude fonctionnelle, ces cellules marquées par un anticorps monoclonal pouvant être aisément purifiées à l'aide d'un cytofluorimètre équipé d'un trieur cellulaire.

La nature infectieuse de cette maladie est évidemment à considérer en relation avec son impact sur la production locale et le risque potentiel qu'elle représente à l'échelle internationale. C'est pourquoi, la mise au point d'un immunodosage enzymatique, à l'aide d'anticorps monoclonaux est envisagée. Le test développé pour le diagnostic de la

bonamiose sera une référence utile car il est appliqué à des échantillons d'hémolymphe (Cochennec, 1988).

L'implication d'un rétrovirus dans l'étiologie de cette prolifération hémocytaire devra bien sûr être confirmée par des examens complémentaires en microscopie électronique et par la mise en évidence de transcriptase réverse. Néanmoins, les premières observations doivent être rapprochées de celles faites par Oprandy (1981) qui, en dépit de preuves expérimentales, restent très controversées car non répétées.

La découverte et le contrôle en laboratoire d'un rétrovirus oncogène de bivalves présenteraient un intérêt majeur pour la rétrovirologie et l'oncologie comparées. Dans ce contexte, il sera indispensable de caractériser les protéines contre lesquelles sont dirigés les anticorps monoclonaux et ce, comparativement avec les différentes oncoprotéines connues.

D'autre part, l'étude des oncogènes et notamment la préparation d'ADN complémentaire constituent une voie nouvelle en vue de l'obtention de lignées cellulaires de bivalves. En effet, tous les efforts entrepris depuis plus de vingt ans pour établir des cultures de cellules stables se sont soldés par des échecs. Les très faibles taux de mitoses observés dans les tissus de ces animaux sont généralement incriminés. Les hémocytes atypiques pour lesquels les index mitotiques sont nettement plus élevés semblent néanmoins inaptes à être cultivés in vitro car ils dégèrent assez rapidement. C'est pourquoi, des essais de transfection avec des oncogènes pourraient être réalisés sur d'autres types cellulaires, peu différenciés et facilement mis en culture, tels que des cellules conjonctives.

B I B L I O G R A P H I E

BALOUET, G., CAHOUR, A. and PODER, M., 1978. Hyperplasie hémocytaire chez Ostrea edulis L. *Haliotis*, 9 : 99-102.

BROUSSEAU, D.J., 1987. Seasonal aspects of sarcomatous neoplasia in Mya arenaria (soft-shell clam) from Long Island Sound. *J. Invertebr. Pathol.*, 50 : 269-276.

CHAGOT, D., HERVIO, D., MOURTON, C., BOULO, V., MIALHE, E. and GRIZEL, H., 1988. Interactions between Bonamia ostreae (Ascetospora) and hemocytes of the flat oyster Ostrea edulis and of the cup shaped oyster Crassostrea gigas : in vitro analysis of entry mechanisms. Fourth ISOCI Congress, 24-29 July, Nottingham, England.

COCHENNEC, N., BOULO, V., MIALHE, E., GRIZEL, H., PANATIER, B. and PAOLUCCI, F., 1988. Monoclonal antibody based ELISA for detecting Bonamia ostreae in flat oysters Ostrea edulis. P.A.M.A.Q., 2-6 October, Gloucester Point, Virginia, USA.

COOPER, K.R., BROWN, R.S. and CHANG, P.W., 1982. The course and mortality of a hematopoietic neoplasm in the soft-shell clam, Mya arenaria. *J. Invertebr. Pathol.*, 39 : 149-157.

ELSTON, R.A., KENT, M.L. and DRUM, A.S., 1988. Progression, lethality and remission of hemic neoplasia in the bay mussel, Mytilus edulis. *Disease Aquatic Organisms*, in press.

FARLEY, C.A., 1969. Sarcomatoid proliferative diseases in a wild population of blue mussels (Mytilus edulis). *J. Natl. Cancer.*, 43 : 509-516.

FARLEY, C.A. and SPARKS, A.K., 1969. Proliferative diseases of hemocytes, endothelial cells and connective tissue cells in mollusks. *Comparative Leukemia Research*, 36 : 610-617.

GHADIALLY, F.N., 1985. Diagnostic electron microscopy of tumours. 2d edition Butterworths, 497 pp.

KIM, H., PANGALIS, G.A., PAYNE, B.C., KADIN, M.E. and RAPPAPORT, H., 1982. Ultrastructural identification of neoplastic histiocytes - monocytes. Application of a Newly Developed Cytochemical Technique. *Am. J. Pathol.*, 106 : 204-223

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

MIALHE, E., BOULO, V. and GRIZEL, H., 1988. Bivalvia cell culture. In "American Fisheries Society Special Publication ; Diseases Processes in Marine Bivalve Molluscs". In press.

MIX, M.C., HAWKES, J.W. and SPARKS, A.K., 1979. Observation on the ultrastructure of large cells associated with putative neoplastic disorders of mussels, Mytilus edulis from Yaquina Bay, Oregon. *J. Invertebr. Pathol.*, 34 : 41-56.

MIX, M.C., 1983. Haemic neoplasms of bay mussels, Mytilus edulis L., from Oregon : occurrence, prevalence, seasonality and histopathological progression. *J. Fish Dis.*, 6 : 239-248.

MIX, M.C., 1986. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants : a Critical Literature Review - *Marine Environmental Research*, 20 : 1-141.

OPRANDY, J.J., CHANG, P.W., PRONOUST, A.D., COOPER, K.R., BROWN, R.S. and YATES, U.J., 1981. Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, Mya arenaria. *J. Invertebr. Pathol.*, 38 : 45-51.

OPRANDY, J.J. and CHANG, P.W., 1983. 5-Bromodeoxyuridine induction of hematopoietic neoplasia and retrovirus activation in the soft-shell clam, Mya arenaria. *J. Invertebr. Pathol.*, 42 : 196-206.

PODER, M. and AUFFRET, M., 1986. Sarcomatous lesion in the cockle Cerastoderma edule. I. Morphology and population survey in Brittany, France. *Aquaculture*, 58 : 1-8.

RASMUSSEN, L.P.D., 1986. Virus associated granulocytomas in the marine mussel, Mytilus edulis, from three sites in Denmark. *J. Invertebr. Pathol.*, 48 : 117-123.

REINISCH, C.L., CHARLES, A.M. and TROUTNER, J., 1983. Unique Antigens on neoplastic cells of the soft-shell clam Mya arenaria. *Dev. Comp. Immunol.*, 7 : 33-39.

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

TWOMEY, E. and MULCAHY, M.F., 1988. Transmission of a sarcoma in the cockle Cerastoderma edule (bivalvia ; mollusca) using cell transplants. *Dev. Comp. Immunol.*, 12 : 195-200.

ANNEXE

MILIEUX DE CULTURE

Milieu RPM1 1640

Composant	mg/L
SELS INORGANIQUES:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	100.00
KCl	400.00
MgSO ₄ (anhyd.)	48.84
MgSO ₄ · 7H ₂ O	-
MnSO ₄ · H ₂ O	-
NaCl	5500.00
NaHCO ₃	-
Na ₂ HPO ₄ (anhyd.)	802.00
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	-
AUTRES COMPOSANTS:	
D-Glucose	2000.00
Glutathion (réduit)	1.00
HEPES	5958.00
Rouge de Phénol	5.00
ACIDES AMINÉS:	
L-Arginine (base libre)	200.00
L-Asparagine	50.00
Acide L-Aspartique	20.00
L-Cystine	-
L-Cystine · 2HCl	65.15
Acide L-Glutamique	20.00
L-Glutamine	300.00
Glycine	10.00
L-Histidine (base libre)	15.00
L-Hydroxyproline	20.00
L-Isoleucine (sans allo)	50.00
L-Leucine (sans méthionine)	50.00
L-Lysine · HCl	40.00
L-Méthionine	15.00
L-Phénylalanine	15.00
L-Proline (sans Hydroxy L-proline)	20.00
L-Sérine	30.00
L-Thréonine (sans allo)	20.00
L-Tryptophane	5.00
L-Tyrosine	-
L-Tyrosine (sel disodique)	28.83
L-Valine	20.00
VITAMINES:	
Biotine	0.20
Pantothénate de Calcium D	0.25
Chlorure de Choline	3.00
Acide Folique	1.00
i-Inositol	35.00
Nicotinamide	1.00
Acide Para-aminobenzoïque	1.00
Pyridoxine HCl	1.00
Riboflavine	0.20
Thiamine HCl	1.00
Vitamine B ₁₂	0.005

Pression osmotique:

1000 mOsm

pH : 7,8

Milieu 199

Composant	mg/L
SELS INORGANIQUES:	
CaCl ₂ (anhyd.)	200.00
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0.72
KCl	400.00
MgSO ₄ (anhyd.)	97.67
MgSO ₄ · 7H ₂ O	-
NaCl	6100.00
NaHCO ₃	-
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	140.00
AUTRES COMPOSANTS:	
Sulphate d'Adénine	10.00
Adénosinetriphosphate (sel disodique)	1.00
Acide Adénylique	0.20
Cholestérol	0.20
Déoxyribose	0.50
D-Glucose	1000.00
Glutathion (réduit)	0.05
Guanine HCl	0.30
HEPES	5958.00
Hypoxanthine	-
Hypoxanthine (sel de Na)	0.354
Rouge de Phénol	20.00
Ribose	0.50
Acétate de Sodium	50.00
Thymine	0.30
Tween 80 [®]	20.00
Uracil	0.30
Xanthine	-
Xanthine (sel sodique)	0.344
ACIDES AMINÉS:	
DL-Alanine	50.00
L-Arginine · HCl	70.00
Acide DL-Aspartique	60.00
L-Cystéine HCl · H ₂ O	0.11
L-Cystine	-
L-Cystine · 2HCl	26.00
Acide DL-Glutamique · H ₂ O	150.00
L-Glutamine	100.00
Glycine	50.00
L-Histidine HCl · H ₂ O	21.88
L-Hydroxyproline	10.00
DL-Isoleucine	40.00
DL-Leucine	120.00
L-Lysine · HCl	70.00
DL-Méthionine	30.00
DL-Phénylalanine	50.00
L-Proline	40.00
DL-Sérine	50.00
DL-Thréonine	60.00
DL-Tryptophane	20.00
L-Tyrosine	-
L-Tyrosine (sel disodique)	57.66
DL-Valine	50.00
VITAMINES:	
Acide Ascorbique	0.05
Phosphate d'α-Tocopherol (sel disodique)	0.01
Biotine	0.01
Calciférol	0.10
Pantothénate de Calcium D	0.01
Chlorure de Choline	0.50
Acide Folique	0.01
i-Inositol	0.05
Ménadione	0.01
Niacine	0.025
Niacinamide	0.025
Acide Para-aminobenzoïque	0.05
Pyridoxal HCl	0.025
Pyridoxine HCl	0.025
Riboflavine	0.01
Thiamine HCl	0.01
Vitamine A (acétate) ¹	0.14