

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II
- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC -

THESE

présentée à l'UNIVERSITE MONTPELLIER II - Sciences et techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de: DOCTEUR D'ETAT mention Sciences

PATHOLOGIE DES INVERTEBRES MARINS D'INTERET AQUACOLE.

CONTRIBUTION ET STRATEGIES DE RECHERCHES

par

Eric MIALHE

Soutenu le 22 septembre 1994 devant le jury composé de:

Pr. C. VAGO, Académie des Sciences, France	Président
Pr. M. BERGOIN	Rapporteur
Pr. C. COMBES	Rapporteur
Dr. B. DELAY	Rapporteur
Dr. A. MICHEL	Rapporteur
Dr. R. COLWELL	Examineur
Dr. L. LAUBIER	Examineur
Dr. L. MILLER, National Academy of Sciences, USA	Examineur

Avant-Propos

Le présent document est relatif à un programme qui a été conçu, initié et développé dans le cadre ou avec le soutien de l'IFREMER. Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux responsables de cet Institut auquel j'appartiens et auquel je suis attaché.

Le programme qui est décrit dans ce mémoire de thèse a été développé au travers de plusieurs collaborations (voir page 19) et de nombreuses interactions. Je tiens à dire que je garde en mémoire toutes ces interactions humaines et que je ressens une immense émotion pour beaucoup d'entre elles qui sont devenues des amitiés. Certaines de ces amitiés me sont aujourd'hui essentielles. Je veux saisir l'occasion de cette thèse pour le dire à chacun d'entre vous.

Je veux dire la profonde estime que j'éprouve pour tous les membres du jury qui sont réellement pour moi des Références. Je vous remercie tous très sincèrement.

Mr Vago, c'est grâce à vous que j'ai pu étudier la pathologie des insectes. J'ai toujours été impressionné par votre sens de la stratégie et de l'anticipation. Je me sens toujours votre élève et suis toujours heureux d'être un membre de votre école.

Max Bergoin, tu es mon Ami et je t'aime fraternellement. Que je sois dans ton labo ou ailleurs, je me sens proche de toi.

Claudes Combes, tu as su être chaleureux au moment opportun. Cela a été un plaisir et un réel apprentissage de travailler avec toi dans la mise en place d'un projet de coopération.

Bernard Delay, tu as un sens hors du commun de l'écoute. Tu as été à maintes reprises proche de l'unité et je t'en remercie.

Mr Laubier, je suis totalement admiratif de votre sens de l'analyse et de vos connaissances encyclopédiques, c'est impressionnant de travailler avec vous.

Rita Colwell, you are a "big boss" and a "big heart". I like so much to work with you and Jorge on scientific and non-scientific projects.

Alain Michel, tu es pour moi l'image de la passion scientifique pour la pénéculture. J'espère et je crois vraiment que l'immunologie et la génétique aideront la zootechnie à contrôler la pathologie.

Louis Miller, tu es une "Référence" pour la Science et pour l'Humanisme. Je souhaite rester toujours en contact avec toi.

A ma famille et mes amis,
A Luisa

Sommaire

INTRODUCTION	1
AQUACULTURE DES INVERTEBRES MARINS	1
Conchyliculture et pénéculture	1
Caractéristiques zootechniques	2
Développement et pérennité de l'aquaculture des invertébrés marins	5
MORTALITES D'INVERTEBRES MARINS EN AQUACULTURE	7
Maladies infectieuses et non-infectieuses	7
Quelques cas de mortalités massives	8
EVOLUTION DES RECHERCHES EN PATHOLOGIE DES INVERTEBRES	12
Evolution des recherches en pathologie des insectes	12
Etat des connaissances en pathologie des mollusques et des crevettes au début des années quatre-vingt	14
PROGRAMME DE RECHERCHE ET PRESENTATION DES TRAVAUX 1985-1994	16
Contrôle des maladies en pathologie animale et végétale	16
Diagnostic et contrôles épidémiologiques	16
Traitements	17
Immunisations	17
Sélection génétique de souches résistantes	18
Programme de recherches	19
Collaborations établies en relation avec ce programme	19
A. TRAVAUX AYANT UN CARACTERE APPLIQUE IMMEDIAT POUR LE CONTROLE DES MALADIES DES INVERTEBRES MARINS EN AQUACULTURE	21
1. Identification et description d'agents pathogènes	21
1.1. Infection rickettsienne de <i>Ruditapes decussatus</i>	21
1.2. Infection rickettsienne de <i>Pecten maximus</i>	21
1.3. Infection rickettsienne de <i>Chlamys opercularis</i>	22
1.4. Infection bactérienne de <i>Penaeus vannamei</i>	22
1.5. Infection fongique de <i>Penaeus japonicus</i>	22
2. Isolement et purification d'agents pathogènes	23
2.1. Protozoaires <i>Marteilia</i>	23
2.2. Protozoaire <i>Bonamia</i>	24
2.3. <i>Rickettsiales</i>	24

3. Caractérisation biochimique et préparation de sondes moléculaires	25
3.1. Caractérisations biochimiques	25
3.2. Caractérisations antigéniques	26
3.3. Caractérisations génétiques	31
4. Développement de méthodes de diagnostics	32
4.1. Microplaque de quantification bactérienne	32
4.2. Immunodiagnosics	33
4.3. Diagnostics par sondes nucléiques	35
5. Epidémiologie	36
5.1. Bonamiose	36
5.2. Rickettsiose	37
6. Traitements	38
6.1. Parasitose: <i>Mytilicola intestinalis</i>	38
6.2. Bactériose: <i>Vibrio P1</i>	39
6.3. Mycose	39
B. TRAVAUX AYANT UN CARACTERE APPLIQUE A MOYEN TERME POUR LE CONTROLE DES MALADIES D'INVERTEBRES MARINS EN AQUACULTURE	40
1. Pathologie expérimentale	40
1.1. Reproduction des maladies et modélisation <i>in vivo</i>	40
1.2. Infection de cellules et modélisation <i>in vitro</i>	43
2. Immunologie	45
2.1. Caractérisation antigénique de l'hémolymphe	46
2.2. Phagocytose et chimioluminescence	47
2.3. Effecteurs "immunitaires" moléculaires	50
3. Technologie de transformation génétique	52
3.1. Techniques de transfection d'embryons	52
3.2. Analyse de promoteurs hétérologues	53
CONCLUSIONS ET FUTURES STRATEGIES DE RECHERCHES	54
Stratégie à court terme	54
Identification des étiologies	54
Diagnostic et épidémiologie	56
Traitement	57
Stratégie à moyen terme	57
Pathologie expérimentale <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	57
Immunologie	60
Génétique	61

INTRODUCTION

Afin de pouvoir, d'une part, analyser les résultats des travaux qui seront exposés dans ce document, et d'autre part, de les situer dans leur contexte de recherches et d'applications, il importe en introduction de présenter les caractéristiques de l'aquaculture des invertébrés marins, les problèmes de mortalités qui affectent les élevages et les données qui étaient disponibles sur la pathologie de ces animaux lors de l'initiation du programme de recherches en 1985 (Articles et ouvrages de synthèse, page 15).

AQUACULTURE DES INVERTEBRES MARINS.

Conchyliculture et pénéculture.

Les invertébrés occupent une place primordiale en aquaculture marine, les productions concernant essentiellement deux groupes zoologiques qui sont les mollusques bivalves et les crustacés pénéides. A l'échelle mondiale, la conchyliculture représente une production annuelle voisine de 1,5 million de tonnes et la pénéculture oscille entre 600000 et 700000 tonnes par an.

Les productions conchylicoles se trouvent sous toutes les latitudes et sont relativement diversifiées. Les différentes activités d'élevage se réfèrent aux noms des familles de mollusques: ostréiculture pour les huîtres (*Ostreidae: Ostrea, Crassostrea*); mytiliculture pour les moules (*Mytilidae: Mytilus*); vénériculture pour les palourdes (*Veneridae: Tapes, Mya, Macoma, Mercenaria*); pectiniculture pour les coquilles (*Pectinidae: Pecten, Argopecten, Placopecten, Chlamys*).

Les productions de crevettes marines sont essentiellement localisées dans les zones tropicales et sont peu diversifiées puisqu'elles ne concernent que le genre *Penaeus*, avec trois espèces majeures, *P. monodon*, *P. vannamei* et *P. chinensis*.

Les productions d'invertébrés marins correspondent très généralement à des monocultures à l'échelle locale, mais aussi à l'échelle régionale voire continentale. Ainsi, les productions de crevettes sont presque exclusivement basées sur *P. monodon* en Asie à l'exception du Japon et de la Chine, sur *P. vannamei* en Amérique Centrale et en Amérique du Sud, et sur *P. chinensis* en Chine. L'ostréiculture mondiale repose aujourd'hui largement sur une seule espèce, l'huître japonaise *Crassostrea gigas*.

Le caractère monospécifique à grande échelle des productions d'invertébrés marins est important à souligner car les maladies ont fréquemment de ce fait un caractère épidémique. Les épidémies ont conduit à des pertes souvent fatales pour l'économie locale ou régionale car sans alternative immédiate. C'est pourquoi, des projets visant à diversifier les élevages aquacoles sont mis en place dans de nombreuses régions du monde. Cependant, compte tenu de l'organisation des marchés internationaux et des circuits de commercialisation qui sont de plus en plus compétitifs, les entreprises aquacoles tendent en fait à se spécialiser, ce qui va à l'encontre d'un développement de l'aquaculture de type polyculture.

Caractéristiques zootechniques.

L'aquaculture des invertébrés marins concerne en fait toutes les productions qui ne sont pas strictement du domaine de la pêche. Cette distinction entre activités de pêche et d'aquaculture pour les invertébrés marins s'apparente, par exemple, à celle faite dans le domaine végétal entre l'exploitation de forêts naturelles et la sylviculture, qui concerne les simples opérations de reforestation mais aussi les programmes de cultures de souches sélectionnées.

Quelques exemples permettent d'illustrer l'extrême variété des techniques de production aquacoles d'invertébrés marins, qui sont plus ou moins sophistiquées selon les espèces et les types d'entreprises. Ces caractéristiques zootechniques diverses de l'aquaculture méritent d'être analysées en terme de sensibilité aux problèmes de pathologie.

Techniques traditionnelles

Traditionnellement, des activités conchylicoles telles que l'ostréiculture et la mytiliculture reposent sur l'exploitation de gisements naturels qui sont annuellement repeuplés par captage de larves dans le milieu. De façon similaire, les élevages de crevettes ont traditionnellement consisté à capturer des larves dans les eaux côtières et à les mettre en croissance dans des lagunes et étangs.

Pour ces élevages traditionnels, la dépendance vis-à-vis du milieu est donc maximale, que ce soit pour les caractéristiques physico-chimiques de l'eau, qualitatives et quantitatives du plancton, génétiques et physiologiques des invertébrés eux-mêmes, mais aussi pour les caractéristiques biologiques des prédateurs et des parasites.

Modernisation des techniques

L'évolution de l'aquaculture a été pendant longtemps basée sur des améliorations des procédés d'élevage correspondant à des progrès zootechniques relativement simples et plus ou moins empiriques.

Des adaptations ont été faites pour améliorer la croissance des animaux, comme par exemple le système de culture en claires des huîtres. Afin de favoriser la croissance des animaux et d'augmenter les densités d'élevage, de nombreux travaux ont porté sur des essais et des optimisations d'aliments, en particulier pour les élevages de crevettes qui se font dans des systèmes clos, alors que les mollusques sont généralement élevés en mer. La protection des animaux vis-à-vis des prédateurs a été recherchée en les élevant dans des poches, sur des supports ou en utilisant des dispositifs d'enclos et de filets.

Ces progrès zootechniques, focalisés sur l'accroissement des productions, ont eu aussi pour conséquence de créer des conditions favorables à l'apparition et à la propagation de maladies. En effet, l'augmentation, parfois excessive, des densités d'élevage peut affecter l'état physiologique et immunologique des animaux qui, consécutivement, sont davantage sensibles à des agents pathogènes ou opportunistes. La promiscuité des animaux dans les élevages intensifs est évidemment favorable à la transmission des agents infectieux.

Écloseries

Une étape importante dans l'évolution de l'aquaculture des invertébrés marins a été de se dégager de la dépendance vis-à-vis du milieu marin pour l'approvisionnement en larves, ce qui a été pendant longtemps un facteur limitant majeur pour le développement des productions aquacoles.

Des recherches ont été entreprises sur la physiologie de la reproduction et sur la biologie larvaire. Elles ont abouti à la conception du système des écloseries pouvant fournir des larves aux producteurs, ceci de façon plus ou moins régulière et contrôlée selon les espèces et selon les niveaux respectifs de maîtrise zootechnique.

Généralement, des géniteurs ayant atteint le stade de maturation sexuelle sont collectés dans le milieu, ce qui contribue à l'introduction dans les écloseries d'animaux malades ou infectés. Il faut rappeler que chez les insectes, les stades larvaires sont les plus sensibles aux viroses et rickettsioses, et les survivants deviennent au stade adulte des porteurs sains. Ces animaux sont susceptibles de transmettre verticalement l'agent pathogène, soit par contamination externe des oeufs, soit par transmission ovarienne. Très peu de données fiables sur ce point sont disponibles en ce qui concerne les mollusques et les crevettes.

Dans certains cas, le processus de maturation sexuelle est contrôlé de façon reproductible en écloserie et il devient ainsi possible de conserver un stock de géniteurs. Dans le futur, ceci devrait permettre de conserver des souches avec des caractères phénotypiques et génétiques déterminés, comme l'absence d'agent pathogène ou la résistance à une infection.

Les productions de larves en écloseries ont d'ores et déjà profondément modifié l'aquaculture des invertébrés marins. L'organisation et la planification des élevages ont été améliorés et leur développement dans des zones éloignées des sites naturels de reproduction a été facilité. A leur stade actuel de développement technique, les écloseries ne sont cependant pas encore une panacée. En effet, il persiste des impératifs techniques susceptibles d'engendrer divers types de problèmes, notamment d'ordre pathologique. L'approvisionnement en eau de mer par pompage n'est pas totalement fiable du point de vue des procédés actuels d'élimination ou de destruction des micro-organismes, en particulier pour les virus. L'utilisation systématique d'antibiotiques présente le risque d'engendrer, aux abords directs des écloseries, des phénomènes de résistance chez des bactéries associées aux invertébrés ainsi qu'à des bactéries associées à l'homme. Des mortalités massives, en majorité causées par des bactérioses ou des viroses, sont favorisées par les hautes densités des élevages larvaires en écloseries. De plus, les écloseries contribuent à la propagation rapide et à grande échelle de maladies infectieuses compte tenu de leur activité commerciale de distribution qui est pratiquée sans contrôle zoosanitaire des larves.

Recherches actuelles en zootechnie

De nouveaux axes de recherches pourraient contribuer à accroître l'intérêt des écloseries, en particulier du point de vue du contrôle des problèmes de pathologie.

Souches exemptes de pathogènes

En utilisant des stocks de géniteurs sains, la production dans des zones indemnes de maladies, voire en milieu terrestre avec de l'eau de mer artificielle, pourrait permettre d'obtenir des larves exemptes de germes. Ce concept a déjà été développé par l'Institut Océanique d'Hawaii pour la crevette *P. vannamei*. Les applications semblent cependant limitées car des premiers essais effectués en Equateur dans des zones d'endémies ont montré que ces larves étaient extrêmement sensibles aux agents pathogènes.

Cryopréservation

La cryopréservation d'embryons ou de larves de mollusques et de crevettes est un axe majeur de recherche étroitement lié à la technologie d'écloserie. Avec la cryopréservation, il deviendrait possible de stocker les larves et de les commercialiser selon les besoins. Des analyses et des élevages préalables à la commercialisation pourraient être réalisés pour vérifier l'absence d'agents pathogènes dans chaque lot. De plus, la commercialisation serait facilitée du point de vue du transport. Il semble que des protocoles de cryopréservation de larves de mollusques aient été établis par une compagnie privée en Angleterre (Cell Systems) mais n'ont pas encore été appliqués en écloserie de production. En ce qui concerne les crevettes, les recherches en sont dans les étapes préliminaires de perméabilisation des oeufs pour introduire des cryoprotectants. La cryopréservation d'embryons serait éminemment intéressante pour produire et commercialiser des souches préalablement sélectionnées pour leur résistance à un agent pathogène.

Polypléidisation

Depuis plusieurs années, la technologie d'écloserie a permis de produire des mollusques triploïdes. La polypléidisation résulte de traitements chimiques ou électriques qui perturbent les processus méiotiques ou mitotiques des oeufs immédiatement après la fécondation. Les travaux visent maintenant, d'une part, à extrapoler ces protocoles de polypléidisation aux crustacés et, d'autre part, à établir des souches tétraploïdes permettant de produire des animaux triploïdes par simple croisement avec des individus diploïdes. La polypléidisation des invertébrés marins a pour objectif majeur de pouvoir élever des souches stériles qui, de ce fait, sont plus performantes du point de vue de leur croissance. Dans le cas particulier des mollusques, la stérilité des animaux doit permettre aussi leur commercialisation tout au long de l'année, puisqu'il n'y aurait plus le problème de modification organoleptique liée à l'accumulation massive des gamètes. La polypléidisation ne présente a priori pas d'avantage du point de vue de la résistance à des agents pathogènes.

La technologie d'écloserie est aujourd'hui un élément clé pour développer les recherches de génétique des mollusques et des crevettes qui sont initiées dans la perspective de sélectionner des souches résistantes aux maladies. Ces travaux, qui seront exposés ultérieurement, ont été abordés simultanément par le biais de la sélection génétique quantitative et de la transformation génétique.

Zootchnie et pathologie

Pour toutes les phases d'élevage et de grossissement des larves, des juvéniles et des stades adultes, l'aquaculture des invertébrés marins se caractérise par la proximité plus ou moins étroite entre des populations élevées, de façon de plus en plus intensive, et des populations naturelles qui sont associées à leurs agents pathogènes. L'eau de mer étant un milieu très stable du point de vue physico-chimique, la propagation des micro-organismes y est extrêmement facile.

Dans le cas où les populations élevées et naturelles sont de la même espèce, il est évident que les premières puissent être infectées par des agents issus des secondes. Dans de nombreux cas, les élevages concernent des espèces non locales, ce qui peut conduire néanmoins à des mortalités par des agents qui proviennent d'espèces indigènes chez lesquelles ils peuvent d'ailleurs ne pas être pathogènes. Les aspects de spécificité parasitaire et de transmissions intra- ou interspécifiques sont bien connus en médecine et en agriculture. Quelques données relatives aux mollusques et aux crevettes sont aussi disponibles et seront exposées ultérieurement lors de rappels sur les maladies. Ces rappels montrent que, quelque soit le pays et quelque soit l'espèce, des épidémies et des endémies d'étiologies variées affectent les élevages aquacoles à toutes les phases de grossissement.

L'aquaculture des invertébrés se caractérise aussi par de nombreux transferts d'animaux entre différentes zones d'élevage, ceci notamment en fonction des phases de croissance. Ces transferts interviennent de façon prépondérante dans l'expansion des maladies. De plus, lors du déclenchement de mortalités dans une zone, les éleveurs ont souvent le réflexe de transférer leur cheptel pour essayer de limiter leurs pertes, ce qui conduit en fait à une accélération de la propagation de l'épidémie.

Développement et pérennité de l'aquaculture des invertébrés marins

Schémas de développement de l'aquaculture

Le développement mondial de l'aquaculture des invertébrés marins et la croissance des productions ont résulté de deux processus. D'une part, les procédés zootchniques mis au point pour une espèce ont été extrapolés à d'autres espèces. D'autre part les procédés mis au point pour une espèce dans une région ont été extrapolés à d'autres zones géographiques a priori adéquates en raison de leurs caractéristiques écologiques et climatiques.

Ainsi, avec le soutien de diverses agences nationales et internationales de financement, des élevages de crevettes ont été développés de façon explosive dans de nombreux pays à partir de 1960. Des plans de développement, parfois gigantesques, sont toujours mis en place. Dans la quasi-totalité des projets, les risques liés aux problèmes de pathologie sont totalement occultés.

Pour la conchyliculture, le développement est actuellement moindre, bien que des pays en voie de développement qui sont producteurs de crevettes s'engagent dans la production de mollusques pour entrer de façon compétitive dans les marchés occidentaux et pour diversifier leurs productions.

Le développement de l'aquaculture des invertébrés marins au cours des dernières décennies s'apparente en "accélééré" au développement de l'agriculture. Celui-ci a été aussi basé à l'origine sur l'élevage et la culture de quelques espèces domestiquées et à leur propagation dans presque toutes les régions du monde, simultanément à des processus empiriques de sélection. Plus récemment, le développement et la pérennité de l'agriculture ont reposé sur des acquis issus des recherches menées dans de nombreuses disciplines scientifiques et techniques, ceci afin d'optimiser les souches cultivées, les sites de culture et le contrôle des maladies.

L'aquaculture est un domaine récent d'activité qui reste à ce jour très empirique, les processus de domestication et de sélection de souches étant tout juste abordés. En dépit de son importance économique, l'aquaculture des invertébrés marins ne dispose que de moyens très limités pour entreprendre les recherches nécessaires à son développement. Or, d'ores et déjà, l'aquaculture d'invertébrés marins semble être dans une phase critique qui pourrait remettre en cause, non seulement son développement, mais aussi sa pérennité.

Pérennité ou déclin de l'aquaculture

Les programmes d'aquaculture ont généralement été développés dans une perspective de profits à court terme plutôt que d'établissement d'activités économiques durables et stables. Les installations des élevages ont souvent provoqué des perturbations profondes de l'environnement côtier. Ces perturbations se sont avérées parfois néfastes pour les activités aquacoles, notamment lorsqu'elles ont conduit à la disparition des sites de reproduction et d'approvisionnement en larves. Ceci est particulièrement bien illustré par la destruction massive de mangroves liée à l'installation des fermes de crevettes.

L'intensification excessive des élevages a conduit, en ce qui concerne les gisements de mollusques, à des problèmes de surcharges par rapport aux capacités trophiques du milieu, et en ce qui concerne les crevettes, à des problèmes de gestion de bassins. L'influence de stress et de conditions défavorables d'élevage sur la physiologie et le métabolisme des animaux n'est pratiquement pas connue, en particulier sur le système immunitaire. Il faut rappeler que l'immunologie des mollusques et des crustacés est un domaine d'étude pratiquement vierge, ce qui explique le manque de méthodologies pour évaluer l'état immunitaire des animaux.

Outre les modifications du milieu qui sont liées aux élevages et à leur intensification, les sites aquacoles sont aussi de plus en plus perturbés par des rejets, des pollutions et divers types de bouleversements qui résultent des activités urbaines, agricoles et industrielles.

Dans ce contexte, il apparaît que la pérennité et le développement de l'aquaculture des invertébrés marins imposent de prendre en compte les interactions entre les invertébrés marins, leurs agents pathogènes et le milieu, ceci de façon urgente et selon une approche multidisciplinaire. Face à la multitude, la multiplication et l'amplification des problèmes de mortalités, la pathologie, l'immunologie et la génétique sont des axes majeurs de recherches en complément de travaux en physiologie, écologie et écotoxicologie.

MORTALITES D'INVERTEBRES MARINS EN AQUACULTURE.

Maladies infectieuses et non-infectieuses

Comme tous les organismes vivants, les invertébrés marins sont associés et sensibles à des parasites et des micro-organismes qui, avec des prédateurs, interviennent dans la régulation des populations. Ils sont aussi sensibles aux modifications des caractéristiques physico-chimiques de leur environnement, que ces modifications soient naturelles ou liées à des activités humaines.

Les problèmes de mortalités dans les élevages d'invertébrés marins peuvent donc théoriquement correspondre à des maladies strictement infectieuses, à des maladies strictement non-infectieuses, ou à des infections résultant d'un état préalable d'affaiblissement physiologique et d'immunodéficience dû à des conditions défavorables de milieu ou d'élevage.

Les données relatives aux cas de mortalités massives de mollusques et de crevettes sont en fait généralement insuffisantes pour pouvoir distinguer de façon évidente les trois types de maladies.

Fréquemment, l'étiologie de mortalités reste totalement indéterminée en raison de l'inadéquation des moyens d'investigation. En effet, il existe très peu de laboratoires impliqués dans l'étude des maladies et dans le diagnostic des agents pathogènes de mollusques, et encore moins de crevettes.

La plupart des mortalités à caractère bref et occasionnel ne sont pas étudiées. Dans le cas de mortalités massives et/ou persistantes, des investigations sont plus ou moins rapidement et sérieusement effectuées dans un laboratoire spécialisé. Il peut s'agir d'un laboratoire national, ce qui est le cas dans la majorité des pays développés qui produisent des mollusques. Il s'agit le plus souvent d'un laboratoire étranger dans le cas des pays producteurs de crevettes, qui sont des pays en voie de développement dépourvus de structure et d'équipement adaptés et de scientifiques spécialisés en pathologie.

Etiologies parasitaires et microbiennes

Les investigations mises en oeuvre pour identifier l'étiologie des mortalités sont le plus souvent limitées à des analyses bactériologiques et à des examens histologiques en microscopie photonique. Dans ces conditions, il est seulement possible d'identifier des infections par des parasites métazoaires ou protozoaires et par des procaryotes bactériens, rickettsiens ou chlamydiens. Dans le cas où un de ces types d'agent est régulièrement observé chez les animaux malades, il est alors souvent directement considéré comme l'agent étiologique. Parfois, des essais de reproduction de la maladie sont entrepris pour essayer de confirmer le rôle de cet agent.

Etiologies virales

Les techniques d'investigations précédemment citées sont inadéquates pour identifier des étiologies virales ou non-infectieuses. Des analyses histologiques complémentaires en microscopie électronique sont de plus en plus fréquemment réalisées dans les cas où une étiologie infectieuse et virale est fortement suspectée, par exemple si les mortalités ont un caractère épidémique et qu'aucun parasite ou procaryote n'a été observé. Il faut rappeler qu'il n'existe pas de lignée cellulaire de mollusques bivalves ni de crustacés qui serait susceptible de faciliter la détection de virus. De ce fait, l'identification d'une étiologie virale repose sur la visualisation de particules, soit à partir de coupes contrastées, soit à partir d'homogénéisats après contraste négatif. En pratique, il s'avère souvent difficile de confirmer ou d'infirmer la nature virale de mortalités, ce qui nécessiterait en plus de réaliser des essais de reproduction expérimentale du syndrome. Cette inadéquation des moyens actuels de détection des viroses souligne l'intérêt et l'urgence qu'il y a à développer des méthodes alternatives de diagnostic basées sur des sondes moléculaires.

Etiologies non infectieuses

Les maladies non-infectieuses de mollusques et de crevettes sont extrêmement difficiles à appréhender en raison du manque de méthodologies adéquates, que ce soit pour révéler des anomalies anatomopathologiques, physiologiques et immunologiques, ou pour détecter des produits toxiques dans les tissus. De ce fait, l'importance réelle des maladies non-infectieuses est largement sous-estimée. Par ailleurs, en raison même de leur caractère non-infectieux, ces maladies ont été pendant longtemps négligées par rapport aux maladies infectieuses responsables d'épidémies et d'endémies. Actuellement, les maladies non-infectieuses et les stress sont l'objet d'un regain d'intérêt. L'objectif est, d'une part, d'analyser en amont les causes de ces maladies, en particulier les pollutions du milieu, d'autre part, d'analyser en aval les conséquences physiologiques et immunologiques ainsi que le déclenchement secondaire d'infections.

Quelques cas de mortalités massives.

Ces éléments relatifs à l'étiologie des maladies, ainsi qu'à leur épidémiologie et leur impact économique sur les productions de mollusques et de crevettes, sont illustrés par les quelques exemples de mortalités cités ci-dessous. Il faut retenir que, quelque soit le pays et quelque soit l'espèce, des mortalités d'étiologies diverses sont susceptibles d'affecter de façon dramatique les élevages aquacoles. La pratique des transferts d'animaux et l'absence de contrôle zoosanitaire apparaissent comme des facteurs prépondérants dans le déclenchement et la propagation des épidémies qui évoluent souvent en endémies. Des informations exhaustives sur la description des agents pathogènes et des maladies infectieuses de mollusques et de crustacés sont disponibles dans des ouvrages de synthèse (O. Kinne, Diseases of marine animals, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg). Les données relatives aux problèmes de toxicologie chez les mollusques et les crevettes sont encore peu nombreuses.

Iridovirose de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*.

Jusqu'en 1969, la culture de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, correspondait à la principale activité conchylicole en France, avec une production annuelle de plusieurs dizaines de milliers de tonnes. A cette époque, des ostréiculteurs ont envisagé de diversifier leur production et ont commencé à introduire du naissain d'huître japonaise, *C. gigas*, et ce, sans précaution particulière en dépit des mortalités inexplicables qui avaient été épisodiquement signalées au Japon.

C'est à partir de cette date que des mortalités massives ont été observées à divers endroits du littoral français, ce qui n'a pas empêché les producteurs d'effectuer des transferts d'animaux. L'épidémie s'est propagée rapidement et, en 1973, cette espèce a disparu de l'ensemble du littoral. L'ostréiculture repose depuis cette époque sur l'huître japonaise, *C. gigas*, dont l'introduction a peut être été à l'origine de la disparition de *C. angulata*.

En raison de l'absence de moyens techniques et humains, l'étiologie de la maladie n'avait pu être déterminée à l'époque des mortalités massives. Il a fallu attendre 1976 pour que soient publiées des premières données acquises en microscopie électronique à partir d'échantillons d'huîtres malades fixées au moment de l'épidémie. Des particules virales icosaédriques et cytoplasmiques ont été alors mises en évidence et assimilées à un *Iridovirus* qui serait de type *Lymphocystis*.

Baculovirose de la crevette *Penaeus monodon*.

Les baculovirus sont des agents qui sont très étudiés chez les insectes et qui, en raison de leur extrême pathogénicité et résistance dans le milieu, sont largement utilisés en agriculture pour le contrôle biologique des ravageurs de cultures. De plus, ces virus peuvent être transmis verticalement à la descendance.

Les baculovirus sont spécifiques des arthropodes et ont été identifiés chez de nombreuses espèces de crevettes d'intérêt aquacole. Ce sont des virus qui se répliquent dans le noyau des cellules et qui se caractérisent par la formation de polyèdres protéiques dans lesquels sont incluses les particules virales. Cette caractéristique contribue à la persistance des virus dans le milieu et permet d'effectuer le diagnostic de l'infection virale en microscopie photonique sur la base de l'observation de polyèdres. Il faut noter cependant que les polyèdres ne sont visibles que tardivement puisqu'ils correspondent au stade final de la réplication.

En 1984, une étude épidémiologique était réalisée à Taïwan et révélait la présence du baculovirus dans plusieurs zones d'élevage. En 1985 et 1986, les taux d'infection dans les populations de post-larves et de juvéniles étaient inférieurs à 20%, alors qu'ils étaient supérieurs à 80% en 1988. La production chutait de 110000 tonnes en 1988 à 43000 en 1989, puis 20 000 tonnes en 1990. La production taiwanaise, qui a occupé longtemps le premier rang mondial, n'a pas pu retrouver son niveau initial d'activité.

Bonamiose de l'huître plate, *Ostrea edulis*

Les cheptels bretons d'huîtres plates, *Ostrea edulis*, ont été dans les années soixante-dix affectés par la marteiliose, qui est une maladie parasitaire due à un protozoaire qui se multiplie dans la glande digestive.

En 1979, des mortalités massives se sont déclenchées de façon épidémique à partir d'un foyer infectieux, l'île Tudy. Un protozoaire a été alors détecté dans les hémocytes et identifié initialement comme un nouveau parasite, *Bonamia ostreae*, avant d'être assimilé à l'agent responsable aux USA d'une maladie appelée "micro-cell disease".

En raison de transferts effectués sans contrôle zoosanitaire, la maladie, appelée bonamiose, s'est ensuite propagée rapidement à la majorité des bassins européens qu'elle affecte maintenant de façon endémique. La chute de production a été estimée en France à environ 90 % et persiste depuis plusieurs années. L'origine de cette parasitose pourrait correspondre à l'introduction d'individus infectés dans une population indemne de la même espèce et plus sensible. En effet, des informations officieuses ont stipulé que des ostréiculteurs avaient en 1979 introduit à l'île Tudy du naissain d'huître plate en provenance de la côte ouest des USA où la "micro-cell disease" est endémique.

Haplosporidiose de l'huître australienne, *Ostrea angasi*

Cette parasitose est intéressante à considérer car elle montre que, consécutivement à son implantation dans une nouvelle zone d'élevage, une espèce non indigène peut rapidement être infectée massivement par des parasites associés à d'autres espèces autochtones. Dans le cadre du programme de relance de l'huître plate en Bretagne, des essais d'acclimatation de l'huître plate australienne, *O. angasi*, ont été effectués selon les recommandations du Conseil International pour l'Exploitation de la Mer (CIEM). Celles-ci préconisent d'importer initialement des géniteurs dans une écloserie pourvue d'un système de traitement des eaux rejetées afin de produire du naissain qui sera testé dans le milieu, après avoir vérifié au préalable en histologie photonique l'absence d'agent pathogène. Il faut noter que ces recommandations sont relativement utiles pour des pathogènes pouvant être détectés en microscopie photonique, mais qu'elles ne permettent pas de prévenir les risques liés à des virus transmissibles verticalement.

Quelques mois après leur mise en élevage, il s'est avéré que les jeunes huîtres *O. angasi* étaient massivement infectées par une haplosporidie très peu fréquente chez l'huître indigène, *O. edulis*. De plus, de très nombreuses formes sporulées ont été observées chez *O. angasi* alors qu'elles le sont très rarement chez *O. edulis*. Les huîtres australiennes ont alors été très rapidement détruites afin d'éviter le déclenchement d'une infection dont les conséquences étaient imprévisibles, notamment pour le cheptel d'huîtres indigènes. Cet exemple révèle les risques liés aux transmissions interspécifiques d'agents pathogènes lors de l'acclimatation d'espèces de crevettes ou de mollusques dans de nouvelles zones géographiques, ce qui est fréquemment pratiqué dans les projets d'aquaculture.

Syndrome de Taura de la crevette *P. vannamei*.

Des mortalités massives de crevettes, en particulier des juvéniles, ont été observées à partir de septembre 1992 dans des fermes situées à proximité du delta de la rivière Taura dans le golfe de Guayaquil en Equateur. Les animaux atteints par le syndrome de Taura se caractérisent par leur léthargie, l'opacité des muscles et la mollesse de la carapace après la mue. Les données histopathologiques et des travaux de toxicologie expérimentale ont conduit à incriminer deux fongicides qui sont utilisés massivement à proximité des sites d'élevage pour traiter une maladie fongique des bananiers.

EVOLUTION DES RECHERCHES EN PATHOLOGIE DES INVERTEBRES

La pathologie des mollusques et des crevettes est un domaine de recherches qui a émané de la pathologie des insectes dans les années soixante-dix, alors que l'aquaculture se développait dans de nombreuses régions du monde, mais simultanément subissait des épidémies dont il fallait déterminer les étiologies. Les recherches en pathologie des invertébrés marins ont été alors initiées en prenant en référence les connaissances et les méthodologies déjà acquises chez les insectes, ainsi que les stratégies développées pour contrôler leurs maladies. C'est pourquoi, il est utile de présenter l'évolution des recherches en pathologie des insectes préalablement aux rappels sur l'état des connaissances relatives aux mollusques et aux crevettes lors de l'initiation en 1985 du programme de recherches présenté dans ce document.

Evolution des recherches en pathologie des insectes.

La pathologie des insectes est une discipline relativement jeune qui a pris son essor dans les années cinquante sous l'égide de quelques scientifiques, en particulier Steinhaus et Maramorosch aux USA et C. Vago en France. Cet essor a été lié au concept de lutte biologique en tant qu'alternative à l'utilisation d'insecticides pour lesquels commençaient à être observés des phénomènes de résistance. L'objectif initial était donc d'identifier des agents pathogènes susceptibles d'être utilisés pour contrôler les populations de ravageurs de cultures et de vecteurs de maladies. L'étude des agents pathogènes d'insectes était aussi motivée par la perspective de contrôle des maladies des espèces utiles, tels que le ver à soie, les abeilles et les parasitoïdes.

L'extrême importance économique et médicale des insectes a permis, depuis les années cinquante jusqu'à aujourd'hui, une importante mobilisation de moyens humains, techniques et financiers dans un très grand nombre de pays, ce qui explique les résultats et les progrès constants réalisés en pathologie des insectes. L'évolution des recherches en pathologie des insectes mérite d'être résumée succinctement car elle a inspiré les premiers travaux en pathologie des mollusques et des crevettes.

Identification et description des agents pathogènes

Initialement, la pathologie des insectes a consisté à mettre en évidence des agents pathogènes sur la base de techniques de bactériologie et de mycologie associées à des analyses en microscopie photonique. Avec l'avènement de la microscopie électronique et en prenant référence sur la virologie des vertébrés, les premiers virus d'insectes ont été décrits.

Purification et caractérisation biochimique

De nombreux travaux ont été focalisés sur la caractérisation biochimique des agents, ceux-ci étant préalablement isolés et purifiés selon des techniques de microbiologie pour les bactéries et les champignons, et selon des techniques de centrifugation pour les virus. Parallèlement, des essais de lutte biologique ont été réalisés, notamment avec des bactéries et des virus.

Cultures de cellules et lignées cellulaires

Une étape cruciale a été franchie avec la préparation de cultures *in vitro* de cellules et d'organes puis l'établissement de lignées cellulaires. En effet, celles-ci ont permis la culture *in vitro* d'agents intracellulaires et, subséquemment, des études *in vitro* des interactions hôte-pathogènes, notamment des virus.

Biologie moléculaire

La pathologie des insectes s'est engagée de façon extrêmement dynamique dans les nouvelles techniques de biologie moléculaires pour étudier les bases génétiques et moléculaires de la pathogénicité. Ces recherches à caractère fondamental ont débouché sur des applications en biotechnologie avec l'utilisation de baculovirus en tant que vecteur d'expression. Simultanément, les recherches sur les mécanismes immunitaires des insectes ont été développées et ont ouvert la voie à la caractérisation de protéines antimicrobiennes.

Domaines actuels de recherches

Aujourd'hui, les recherches qui sont réalisées en pathologie des insectes concernent tous les différents domaines qui ont été progressivement développés et précédemment explicités. Par ailleurs, les équipes se sont généralement spécialisées dans des domaines limités, par exemple sur l'étude d'un groupe particulier d'agents pathogènes, parfois même d'un seul agent.

Depuis quelques années, les recherches en pathologie ont convergé avec celles menées en immunologie et en génétique des insectes pour s'engager dans une nouvelle voie orientée vers la transformation génétique. La pathologie des insectes est impliquée à plusieurs titres dans ces recherches sur la transformation génétique, d'une part, au niveau du développement des systèmes d'expression et de transformation qui pourraient être dérivés de virus d'insectes, d'autre part, au niveau des applications qui sont essentiellement orientées vers la création de souches résistantes à des agents pathogènes spécifiques ou transmis. Ces recherches se réfèrent à la transformation génétique des plantes et des vertébrés pour lesquels des souches transgéniques résistantes à des microorganismes ont été produites en exprimant des gènes viraux, des séquences anti-sens ou des gènes immunitaires.

Etat des connaissances en pathologie des mollusques et des crevettes au début des années quatre-vingt.

Pathologie des mollusques

Les épidémies qui ont décimé les élevages d'huîtres en France et aux USA entre les années soixante et quatre-vingt ont conduit les responsables scientifiques et politiques concernés par la conchyliculture à établir des contacts avec des pathologistes, en particulier ceux impliqués dans l'étude des agents pathogènes d'insectes ou de poissons. Ainsi, les techniques de microscopie photonique et ensuite électronique ont commencé à être appliquées de plus en plus régulièrement pour identifier les agents responsables des mortalités. C'est à cette époque que le "catalogue" des agents pathogènes s'est étoffé. Après avoir été mises en évidence chez les insectes, des infections rickettsiennes, chlamydiennes et virales ont été identifiées chez les mollusques, notamment par M. Comps de l'ISTPM/IFREMER.

Des laboratoires ont commencé à être organisés dans quelques pays, mais avec des moyens extrêmement limités par comparaison à ceux spécialisés dans la pathologie des insectes. Dans la majorité des cas, le laboratoire reposait sur un seul pathologiste, équipé en tout et pour tout d'un microscope photonique, et en charge des contrôles zoosanitaires pour l'ensemble des productions nationales. Le dynamisme de ces pathologistes et leurs liens avec les laboratoires de pathologie d'insectes ont été déterminants pour réussir à identifier les étiologies des épidémies. Cependant, les recherches n'ont pas franchi le stade de la description des agents et de l'épidémiologie des maladies. Quelques travaux ont été effectués pour établir des cultures de cellules de mollusques.

En France, les responsables scientifiques et politiques en charge de la conchyliculture ont alors projeté de créer un laboratoire de recherches spécialisé sur les maladies de mollusques, en s'inspirant de l'organisation du laboratoire de pathologie comparée de Saint-Christol-les-Alès. L'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM), relayé ensuite par l'IFREMER, s'est engagé dans la construction à La Tremblade d'un laboratoire qui est devenu opérationnel en 1985. Depuis cette date, des laboratoires de diagnostic et de recherches pour les maladies de mollusques ont été organisés au Canada (Pêches et Océan) et en Australie (Université du Queensland).

Pathologie des crevettes

L'aquaculture intensive des crevettes étant une activité très récente, les premières mortalités massives n'ont été subies que dans les années soixante-dix. Les premiers diagnostics d'infection baculovirale ont été alors établis en prenant avantage de la possibilité de détecter les polyèdres en microscopie photonique. Les écloséries se sont aussi avérées sensibles à des maladies fongiques et bactériennes qui ont pu être prévenues par l'utilisation routinière d'antibiotiques à de faibles concentrations, sans suffisamment s'attacher aux risques de sélection de souches résistantes.

A cette époque, deux approches des problèmes de pathologie ont été faites. L'une, qui correspond aux biologistes du CNEXO puis de l'IFREMER, a consisté à considérer que les problèmes de pathologie infectieuse correspondaient essentiellement à des infections résultant de mauvaises conditions zootechniques. Cette conception a contribué efficacement à l'innovation zootechnique mais a limité le développement de recherches sur les agents pathogènes. L'autre approche, suivie notamment par les biologistes américains et japonais, a pris en compte l'importance potentielle des agents pathogènes. Grâce à quelques pathologistes, notamment D. Lightner aux USA, plusieurs virus ont été décrits et se sont révélés très similaires à ceux connus chez les insectes pour leur extrême virulence et utilisés de ce fait en lutte biologique. La parenté des crevettes avec les insectes au sein du groupe des arthropodes explique la similitude de leurs virus, en particulier des baculovirus, densovirus et picornavirus. Ces recherches étant développées par des histologistes, le stade de description des agents pathogènes n'a pu alors être franchi, notamment pour développer des techniques de préparation de sondes moléculaires utilisables pour le diagnostic des viroses.

Articles et ouvrages de synthèse:

Barnabé, G., 1986. Aquaculture. Lavoisier, Vol 1 et 2, Paris.

Lauckner G., 1983. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In "Diseases of marine animals", vol 2, Kinne O. (Ed). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, 477-961.

Brock J.A., Lightner D.V., 1990. Diseases of Crustacea: Diseases caused by microorganisms. In "Diseases of marine animals", vol 3, Kinne O. (Ed). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, 245-349.

Meyers T.R., 1990. Diseases of Crustacea: Diseases caused by protozoans and metazoans. In "Diseases of marine animals", vol 3, Kinne O. (Ed). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, 245-349.

Vago C., 1972. Invertebrate tissue culture. Vol 1 et 2. Academic Press.

Beckage N.E., Thompson S.N., Federici B.A., 1993. Parasites and pathogens of insects. Vol 1 et 2. Academic Press.

PROGRAMME DE RECHERCHE ET PRESENTATION DES TRAVAUX 1985-1994

En 1985, au moment de l'initiation au sein de l'IFREMER du programme de recherches présenté dans ce document, les épidémies et les endémies sont considérées par les responsables de cet Institut comme un aléa majeur pour l'aquaculture de mollusques, et moindre pour celle des crevettes. Le laboratoire de La Tremblade est alors en phase d'achèvement et les crédits prévus sont très suffisants pour l'équiper de façon à pouvoir pratiquer tous les types de techniques classiquement utilisées en pathologie humaine ou animale. A cette époque, les travaux en pathologie des invertébrés marins sont toujours dans la phase d'identification et de description d'agents pathogènes, alors que pour les insectes les recherches en pathologie sont pratiquement au même niveau de sophistication que celles développées en médecine humaine et vétérinaire ou en agriculture. Les recherches en pathologie des insectes commencent à être connectées à l'immunologie et la génétique.

En se référant aux différents domaines fondamentaux et appliqués de la pathologie animale et végétale, et en tenant compte des spécificités biologiques des mollusques et des crevettes, il a été alors nécessaire de définir les axes de recherche susceptibles de conduire à des solutions, à plus ou moins long terme, pour contrôler les maladies, et ainsi assurer la pérennité et le développement de l'aquaculture des invertébrés marins.

Contrôle des maladies en pathologie animale et végétale

Le contrôle des maladies chez les animaux ou les plantes repose sur quatre types d'interventions, à savoir:

Diagnosics et contrôles épidémiologiques.

Lors du déclenchement de nouveaux cas de mortalités, il importe de pouvoir rapidement mettre en place l'ensemble des techniques et méthodologies nécessaires à l'identification de n'importe quel type d'agent pathogène, ceci afin de pouvoir déterminer exactement l'étiologie de la maladie. Dans le cas des maladies infectieuses qui sont connues, qu'elles soient à caractère épidémique ou endémique, la prévention des mortalités repose sur l'organisation de contrôles épidémiologiques basés sur des méthodes de diagnostic sensibles, spécifiques et si possible automatisables. Ce type de stratégie de contrôle et de prévention des maladies est parfaitement concevable pour les maladies d'invertébrés marins. Cette stratégie impose la préparation de sondes moléculaires spécifiques des agents pathogènes, ceci préalablement au développement de techniques de diagnostic adaptées aux caractéristiques et besoins particuliers de l'aquaculture.

Traitements.

Des molécules antibiotiques sont disponibles contre pratiquement tous les types de parasites et d'agents pathogènes à l'exception des virus. Cependant ces molécules sont plus ou moins efficaces, onéreuses et faciles à administrer, ce qui peut rendre des traitements difficilement applicables en santé animale et végétale. En pratique, seules des molécules antibactériennes, antifongiques ou insecticides ont des caractéristiques potentiellement convenables pour des utilisations en aquaculture marine. Celles-ci imposent en outre que les molécules soient solubles ou disponibles sous des formulations adéquates avec leur utilisation en eau de mer. Pour des antibiotiques qui répondent à ces exigences, et lorsque les caractéristiques d'un élevage aquacole semblent adaptées à une intervention thérapeutique, il est possible d'envisager le traitement de maladies d'invertébrés marins.

Immunisations.

Chez les vertébrés, la réponse immunitaire vis-à-vis des agents infectieux se caractérise notamment par la production d'anticorps qui peuvent conférer à l'individu vacciné une protection durable et efficace contre un agent particulier. De ce fait, la vaccination est une approche primordiale et largement pratiquée pour prévenir et contrôler certaines maladies infectieuses en médecine humaine et vétérinaire. Le facteur limitant majeur est la disponibilité en antigènes purifiés, synthétiques ou recombinants, pour pratiquer les immunisations.

Chez les invertébrés et les plantes il n'y a pas de réponse immunitaire médiée par des immunoglobulines et, de ce fait, il n'est pas possible de prévenir les infections selon le concept classique de vaccination. D'autres approches ont été explorées et méritent d'être mieux analysées, en particulier l'immunostimulation non-spécifique par mise en contact des animaux avec des produits de type glycan.

Depuis une dizaine d'années, des protéines antimicrobiennes ont été isolées chez des vertébrés, des insectes et la limule. Pour plusieurs de ces protéines, les gènes ont été clonés et caractérisés. Les protéines recombinantes ou synthétiques ont été testées *in vitro* et *in vivo*, notamment chez le moustique, et ce sont avérées efficaces contre des parasites tels que *Plasmodium*. Quelques promoteurs ont été caractérisés et leur mode d'induction a été étudié chez la drosophile par transformation génétique. Certains de ces gènes, tel que celui de cecropine, ont été ensuite utilisés pour transformer des plantes et les rendre résistantes, ce qui conduit au concept d'immunisation génétique.

Des recherches sur les mécanismes immunitaires antimicrobiens et la caractérisation des gènes impliqués pourraient être entreprises chez les mollusques et les crevettes. Des travaux appliqués à court terme en aquaculture pourraient être focalisés sur la mise au point de tests pour évaluer l'état immunitaire des animaux et analyser l'effet d'immunostimulations non-spécifiques. A moyen terme, des travaux en immunologie pourraient ouvrir la voie à des recherches pour sélectionner des souches résistantes, soit par génétique quantitative, soit par transformation génétique.

Sélection génétique de souches résistantes

Au delà de la prévention des maladies par le biais de contrôles épidémiologiques ou de traitements, la sélection de souches résistantes représente la solution optimale pour éviter chez une espèce donnée d'intérêt aquacole les problèmes de mortalités liées à un agent infectieux.

Chez les plantes, les animaux domestiques, et à un moindre degré chez les insectes, des souches résistantes à un agent pathogène ont été sélectionnées, soit par génétique classique, soit par transformation génétique.

Selon l'approche dite classique, la sélection est réalisée en utilisant des individus présentant un phénotype résistant et en exerçant constamment une pression de sélection, par exemple basée sur des infections expérimentales. Plusieurs inconvénients sont liés à ce type de sélection d'une résistance dont les bases génétiques sont souvent inconnues et parfois polygéniques, ce qui fait que la sélection peut être longue et difficile et peut éventuellement s'accompagner de la perte de caractères intéressants. Par ailleurs, ce type de sélection nécessite l'élevage ou la culture de nombreux individus sur plusieurs générations, ce qui fait que les plans de croisements et de sélection sont longs et fastidieux. Il faut noter cependant que des cas spontanés de résistance totale à un virus ont été décrits dans des élevages d'insectes et ont conduit quelques fois à pouvoir sélectionner rapidement et simplement des souches résistantes. Par référence à ces données, et compte tenu de la maîtrise des techniques de productions larvaires en écloséries pour la majorité des espèces de mollusques et de crevettes, il devient possible d'envisager la sélection de souches résistantes à partir d'individus survivants à des infections naturelles ou expérimentales. Dans les deux cas, il convient de contrôler la reproduction de la maladie afin de pouvoir exercer continuellement une forte pression de sélection. La maîtrise des protocoles d'infection expérimentale apparaît donc constituer un axe de travail essentiel en pathologie des invertébrés marins pour aborder des recherches sur la sélection génétique de souches résistantes à des agents pathogènes.

La seconde approche de sélection de souches résistantes est plus récente et repose sur la transformation génétique. Chez des organismes transgéniques, la résistance à un agent pathogène peut résulter de l'expression de gènes viraux qui perturbent le cycle de réplication viral, de la transcription de séquences anti-sens qui inhibent la réplication de virus ou la synthèse d'un récepteur essentiel au pathogène, ou enfin de l'expression de gènes immunitaires homologues ou hétérologues. Cette approche est largement étudiée et exploitée chez les plantes et à un degré moindre chez les vertébrés. Depuis quelques années, la transformation génétique est considérée en entomologie médicale pour contrôler la transmission de maladies parasitaires ou virales, ceci en produisant des souches transgéniques d'arthropodes vecteurs qui soient réfractaires au pathogène, et de ce fait incapables de le transmettre. Cette stratégie de sélection par le biais de la transformation génétique peut évidemment être envisagée pour les mollusques et les crevettes. Il faut souligner que des éléments génétiques hétérologues peuvent a priori être utilisés, que ce soit des promoteurs, des séquences régulatrices, des systèmes d'intégration ou de réplication, des séquences anti-sens ou des gènes. Pour aborder la transformation génétique des invertébrés marins, il convient en fait d'adapter les stratégies établies pour les insectes, les vertébrés et les plantes, ceci en tenant compte des caractéristiques biologiques des mollusques et des crevettes, en particulier des oeufs et des embryons qui sont préférentiellement manipulés.

Programme de recherches

Le programme initié en 1985 se devait prioritairement appliqué à l'aquaculture pour apporter dans les meilleurs délais des solutions concrètes permettant de contrôler au mieux les maladies de mollusques et de crevettes. D'un point de vue stratégique, il convenait donc de développer en parallèle deux types de travaux: d'une part, les travaux ayant un caractère appliqué à court terme, c'est à dire ceux relatifs à l'identification des agents pathogènes, le diagnostic, et de façon annexe, le traitement; d'autre part, les travaux ayant un caractère appliqué à moyen terme et visant à la sélection de souches résistantes. Ces travaux relatifs à la sélection nécessitaient au préalable d'acquérir des informations et d'établir des méthodes en pathologie expérimentale *in vivo* et *in vitro*, en immunologie et en génétique.

Cette double stratégie de travail a conduit à exposer les résultats selon leur caractère appliqué à court ou à moyen terme pour le contrôle des maladies d'invertébrés marins d'intérêt aquacole.

A. Travaux ayant un caractère appliqué immédiat pour le contrôle des maladies

1. Identification et description d'agents pathogènes
2. Isolement et purification d'agents pathogènes
3. Caractérisation biochimique et préparation de sondes
4. Diagnostics
5. Epidémiologie
6. Traitements

B. Travaux ayant un caractère appliqué à moyen terme pour le contrôle des maladies

1. Pathologie expérimentale *in vivo* et *in vitro*
2. Immunologie
3. Technologie de transformation génétique

Collaborations établies en relation avec ce programme

Ce programme de recherches a été développé entre 1985 et 1991 dans le cadre de mon activité d'animation scientifique de l'Unité de Recherches en Pathologie, Immunologie et Génétique (URPIGM) située à La Tremblade. La stratégie des recherches a été conçue en étroite collaboration avec mes collègues et amis, Evelyne Bachère, Viviane Boulo, Jean-Paul Cadoret et Thierry Noël, qui étaient membres permanents de l'équipe. De nombreuses expérimentations ont été réalisées avec Nathalie Cochenec, Dominique Blatteau et Marie-José Le Coguic du laboratoire IFREMER de La Trinité.

Des étudiants de diverses formations ont été pris en stages et ont participé à des degrés divers à l'acquisition des données, notamment ceux de l'Intechmer (Cherbourg), Béatrice Desprès, Jean-Michel Delecheneau et Christophe Rousseau.

Plusieurs étudiants ont été pris en charge pour leur formation doctorale en collaboration avec les responsables de DEA de diverses Universités: Ghislaine Le Gall (Pr P. Nival, Paris), Dominique Hervio (Pr J.P. Mignot, Clermont-Ferrand), Danièle Noël (Pr J. Bové, Bordeaux), Sylvain Gendreau (Pr M. Le Pennec, Brest), Kristell Cousin (Pr. M. Mathieu, Caen) et Jenny Rodriguez (Pr J.P. Mignot, Clermont-Ferrand). Tous ces étudiants, par leur extrême

motivation, leur capacité à prendre des risques et leur intense activité ont joué un rôle primordial dans cette phase pionnière de recherche en pathologie, immunologie et génétique des invertébrés marins.

Les recherches relatives à la préparation de sondes moléculaires et au développement de nouvelles méthodes de diagnostic ont été possibles grâce à l'établissement de relations scientifiques et amicales avec plusieurs collègues de Sanofi et Elf-BioRecherches: Marc Puygrenier, Jean-Pierre Gérard, Gilles Flamion, Bernard Pau, Christine Clavies, Eliane Hervaud, Hervé Rogier, Bernard Panatier, David Shire, Yan Lubkins, Paul Maldonado et Francis Paolucci qui a été un partenaire et un conseiller permanent pour l'URPIGM. Le soutien de Sanofi-France Aquaculture, dirigé par Phillippe Ferlin, Alain Michel et Laurent Combaz, a été essentiel pour initier les travaux sur la technologie de transformation génétique des crevettes, grâce notamment à l'attribution d'une bourse.

Les collaborations avec les pathologistes canadiens (Sharon McGladdery et Susan Bower), américain (Ralph Elston), espagnols (Antonio Figueras et Jose-Antonio Robledo) et australiens (Bob Lester et Louise Goggin) ont été, d'une part, fructueuses en termes de résultats scientifiques, et d'autre part, chaleureuses et constructives en terme d'établissement d'un réseau d'échanges et de contacts.

Le séjour sabbatique, à partir de 1992, dans le Laboratoire de Recherches sur la Malaria au National Institutes of Health (Bethesda, USA), est une fantastique opportunité. Cela m'a permis de travailler sur le thème de la transformation génétique, que j'aime tout particulièrement, avec Louis Miller, que j'aime aussi tout particulièrement et que je ressens comme une "Référence Scientifique et Humaine". Depuis une première rencontre en 1987, à la suite de sa publication sur l'obtention d'une lignée de moustique transgénique, les relations se sont tissées et ont permis d'associer la transformation génétique des invertébrés marins à celle des insectes. Ainsi, des acquis méthodologiques ont pu être transférés à mes jeunes collègues, Viviane Boulo et Jean-Paul Cadoret à la DRIM en ce qui concerne les mollusques, Christophe Rousseau au CENAIM en ce qui concerne les crevettes. Par ailleurs, parce que parfois "l'Univers conspire", selon une formule de l'auteur brésilien Paulo Coelho, j'ai aussi la chance au NIH d'être associé à Elvira Saraiva. Elvira est devenue mon Amie, pour travailler au quotidien sur ce projet pionnier de transformation génétique du moustique et pour bâtir un autre projet qui a pour nom générique "Luisa". Grâce au soutien de Michèle Durand, attachée scientifique du Ministère des Affaires étrangères aux USA, un réseau USA-France a pu commencer à s'organiser sur le thème de la transformation génétique des invertébrés.

Enfin, la coopération scientifique avec l'Equateur a été possible grâce à un merveilleux esprit d'équipe avec Béatrice Duchemin et Gérard Faroux du Ministère des Affaires Etrangères, nos collègues et amis équatoriens du CENAIM, en particulier Jorge Calderon qui en est le directeur, Iliana Morales de l'écloserie Ebisa, Jenny Rodriguez, Elizabeth Baquerizo et Virna Cedeno qui sont les étudiants boursiers du Gouvernement français, Christophe Rousseau et Philippe Audiot qui travaillent au CENAIM et Lucia Carrera qui intervient avec dynamisme et efficacité dans la coordination du projet. Avec le soutien de Rita Colwell, Présidente du Marine Biotechnology Institute (Baltimore), de Philippe Combescot de la délégation CEE (Bogota) et d'Eduardo Loyaza de la Banque mondiale (Washington), la coopération internationale sur la recherche en pathologie, immunologie et génétique des crevettes devrait pouvoir se développer considérablement.

A. TRAVAUX AYANT UN CARACTERE APPLIQUE IMMEDIAT POUR LE CONTROLE DES MALADIES DES INVERTEBRES MARINS EN AQUACULTURE

1. Identification et description d'agents pathogènes

Dans plusieurs pays développés, des laboratoires d'histologie ont été établis et pratiquent en routine les techniques de microscopie photonique et électronique. Pour l'identification des agents pathogènes de crevettes, il faut citer le rôle primordial du laboratoire animé par Donald Lightner aux USA et l'activité croissante des scientifiques australiens. Concernant les agents pathogènes de mollusques, l'IFREMER a contribué avec d'autres pays, notamment le Canada et l'Australie, à l'identification de nouveaux agents pathogènes. Il convient de rappeler l'intense activité de Michel Comps dans l'identification de nombreuses étiologies virales, rickettsiennes, chlamydiennes et parasitaires.

Dans le cadre de l'URPIGM, l'identification et la description de nouveaux agents pathogènes a été une activité limitée. Des infections rickettsiennes ont été décrites chez la palourde *Ruditapes decussatus*, la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* et le pétoncle *Chlamys opercularis*. Des mortalités massives en Equateur dans des écloséries de crevette *Penaeus vannamei* ont été associées à la présence de bactéries de type *Vibrio*.

1.1. Infection rickettsienne de *Ruditapes decussatus* (Publication 1)

Des mortalités de palourdes de l'espèce *Ruditapes decussatus* ont été notées sur les côtes du Portugal en 1985. Les collègues portugais ont sollicité alors l'URPIGM pour effectuer des examens histologiques et identifier d'éventuels agents pathogènes. Un procaryote intracellulaire a été observé et apparenté au groupe des Rickettsiales sur la base de critères ultrastructuraux.

1.2. Infection rickettsienne de *Pecten maximus* (2)

En France, la production de coquilles Saint-Jacques provient majoritairement de la Baie de Saint-Brieuc en Bretagne Nord. Cette production a évolué dans les années quatre-vingt d'une activité halieutique vers une activité aquacole lors de l'initiation du programme de repeuplement à partir de naissain produit en éclosérie. Au début de l'année 1986, des mortalités massives ont été observées et à nouveau au début des années 1987 et 1988. Les pertes de productions ont été estimées à environ 10000 tonnes avec des taux de mortalité compris entre 20 et 40%. Les premières hypothèses, avancées par les professionnels et les scientifiques concernés par la pectiniculture, impliquaient, soit les conditions climatiques relativement dures pendant les hivers 1985-86 et 1986-87, soit des pollutions par des rejets agricoles.

En mars 1987, des examens histologiques ont été entrepris et ont rapidement révélé de très fortes infections par des procaryotes intracellulaires dans les branchies de la majorité des animaux. Les études en microscopie électronique n'ont pas conduit à mettre en évidence d'infection virale et ont montré que les procaryotes préalablement détectés se localisaient

dans des vacuoles parasitophores des cellules endothéliales sous-jacentes des filaments branchiaux. Le bimorphisme des procaryotes a été assimilé à deux stades de maturation, antérieur et postérieur à la division cellulaire par scissiparité. Les caractéristiques ultrastructurales ont permis de classer le procaryote de *P. maximus* dans le groupe des Rickettsiales. La description de cette nouvelle rickettsiose affectant massivement les branchies correspondait à un nouvel élément d'information relatif à la pathogénicité potentielle des rickettsies chez les pectinidés, et les mollusques en général, ces types d'agents ayant été longtemps considérés comme des microorganismes commensaux. L'étude épidémiologique de cette rickettsiose sera décrite ultérieurement.

1.3. Infection rickettsienne de *Chlamys opercularis* (3)

Suite à la mise en évidence de la rickettsiose de *P. maximus*, des analyses histologiques en microscopie photonique et électronique ont été entreprises chez des espèces sympatriques dans l'optique d'identifier d'éventuelles espèces réservoirs. Tous les échantillons de *Chlamys opercularis* collectés en 1988 dans la Baie de Saint-Brieuc se sont avérés infectés par une rickettsie au niveau des cellules épithéliales des branchies. Sur la base de critères de taille et de localisation, mais surtout d'analyses antigéniques, il a été établi que cette rickettsie était différente de celle de *P. maximus*. En dépit de l'importance des taux et degrés d'infection, aucun problème de mortalités n'a été noté par les pêcheurs, ce qui va à l'encontre d'une nature pathogène de cette rickettsie.

1.4. Infection bactérienne de *Penaeus vannamei* (4)

A partir de 1987, des mortalités massives ont affecté les productions de nombreuses écloséries de crevette *Penaeus vannamei* en Equateur. Les biologistes ont observé, par transparence au travers du corps des larves, une accumulation de "boules" dans le tube digestif, d'où le nom du syndrome "Bolitas". Des prélèvements et des premières investigations ont été effectués à l'éclosérie d'Inbiossa. Les analyses en microscopie photonique et électronique n'ont pas conduit à l'observation de virus. Par contre, le tube digestif s'est révélé rempli de cellules globuleuses, à différents stades de lyse, qui proviennent de la desquamation de l'épithélium et qui correspondent aux boules visualisées lors des examens. Ces cellules sont associées à une prolifération de bactéries. Sur la base d'isolements et d'identifications biochimiques, la flore bactérienne s'est révélée être essentiellement constituée de vibrios.

Ultérieurement, ce syndrome a été étudié en Equateur par Iliana Morales qui a réussi à le reproduire à partir de quelques souches bactériennes fréquemment isolées lors des mortalités. Par ailleurs, elle a étudié les conditions de culture qui favorisent la prolifération des bactéries pathogènes et elle a isolé des bactéries compétitives qui permettent de contrôler la maladie dans les bacs d'élevage larvaire (comm. pers.).

1.5. Infection fongique de *Penaeus japonicus* (5)

Sur la base de critères biochimiques, le champignon associé à des mortalités de géniteurs de la crevette *Penaeus japonicus* dans des écloséries françaises a été identifié comme étant *Fusarium solani*.

2. Isolement et purification d'agents pathogènes

La majorité des agents pathogènes de mollusques et de crevettes sont intracellulaires. Pendant longtemps, il n'a pas été possible d'isoler ces agents en raison de l'absence de lignée cellulaire ou de protocoles de purification. A la fin des années soixante-dix et au début des années quatre-vingt, plusieurs virus de crevettes et un rétrovirus de mollusques ont été isolés et purifiés selon des protocoles dérivés de ceux établis pour des virus d'insectes ou de vertébrés. Des caractérisations biochimiques sommaires s'en étaient suivies. Par contre, aucune rickettsie ou protozoaire n'avaient pu être isolé et purifié, ce qui empêchait le développement d'étude et d'expérimentation. A partir de 1985, des protocoles d'isolement et de purification ont été établis pour des protozoaires intracellulaires des genres *Marteilia* et *Bonamia*, puis des rickettsies de pectinidés. Ces techniques et protocoles ont été ensuite transférés à d'autres équipes qui les ont appliqués à d'autres parasites.

2.1. Protozoaires *Marteilia* (5,6)

Les protozoaires du genre *Marteilia* (Phylum des Ascetospora) sont des parasites de la glande digestive qui ont été fréquemment impliqués dans des mortalités de mollusques, notamment d'huîtres et de moules. Le cycle des parasites du genre *Marteilia* se caractérise par des stades végétatifs complexes, avec des divisions cellulaires résultant en des cellules emboîtées les unes dans les autres. Le stade de sporulation est également complexe, avec un pansporoblaste contenant plusieurs spores multicellulaires.

En France, la marteiliose de l'huître plate, *Ostrea edulis*, est une endémie due à *M. refringens* qui a contribué au déclin des productions, en particulier dans les zones intertidales. L'étude de la maladie, en termes de modes de transmission et de spécificité d'hôte, avait été constamment entravée par l'absence de parasites purifiés pour réaliser des essais d'infection et pour préparer des réactifs spécifiques.

Initialement, la purification de *Marteilia refringens*, isolé de l'huître *Ostrea edulis*, et celle de *M. sp.*, isolé de la moule *Mytilus edulis*, ont été focalisées sur les pansporoblastes, qui sont supposés correspondre au stade de dissémination du parasite et d'infection de l'hôte. De ce fait, ces stades étaient intéressants à isoler pour des expériences d'infection et pour préparer des réactifs de diagnostic. Un protocole a été assez facilement établi en associant des centrifugations sur gradient discontinu de sucrose et une séparation isopycnique sur gradient discontinu de Percoll. La pureté des suspensions et l'intégrité des parasites ont été vérifiées en microscopie photonique et électronique. Ces suspensions ont été utilisées pour préparer des immunosérums qui se sont avérés spécifiques des pansporoblastes. Des essais préliminaires d'infection d'huîtres par ingestion forcée de pansporoblastes ont été réalisés sans succès, mais les animaux n'avaient pu être pas été gardés assez longtemps avant d'être sacrifiés pour les examens histologiques.

En sélectionnant par examens de frottis de glande digestive des animaux très fortement infectés par des formes végétatives, et en portant une attention extrême aux étapes initiales d'homogénéisation des glandes digestives, il a été ensuite possible de purifier en masse les formes végétatives de *Marteilia refringens*. Les suspensions purifiées de pansporoblastes et de formes végétatives ont été ultérieurement utilisées pour préparer des anticorps monoclonaux et des sondes nucléiques.

2.2. Protozoaire *Bonamia* (7)

Comme cela a été dit lors de la présentation de cas de mortalités, la bonamiose de l'huître plate, *Ostrea edulis*, qui est due au protozoaire intrahémocytaire *Bonamia ostreae*, a pratiquement anéanti les élevages de cette huître dans plusieurs pays d'Europe. Des travaux avaient été entrepris sur la reproduction de la maladie à partir de broyat d'huîtres ou d'hémocytes infectés. En pratique l'étude de cette maladie était bloquée par l'impossibilité de préparer des suspensions purifiées de parasites, leur culture *in vitro* ayant été par ailleurs annoncée de façon prématurée et non reproductible.

L'établissement d'un protocole de purification s'est avéré relativement fastidieux car les protocoles devaient être testés sans qu'il y ait eu d'interruption et dans les meilleurs délais. En effet, il fallait éviter la prolifération des bactéries présentes dans les homogénéisats initiaux, qui étaient préparés à partir de la totalité des huîtres puisque les hémocytes sont dispersés dans l'ensemble du système circulatoire ouvert et dans les organes. Divers types d'homogénéiseurs ont été testés avant de retenir l'Ultra-turrax qui s'est avéré efficace pour dissocier les tissus et les cellules des huîtres sans altérer les parasites. Sur la base d'une succession de centrifugations différentielles, en eau de mer ou sur gradient discontinu de sucrose, et ensuite d'une centrifugation isopycnique sur gradient discontinu de Percoll, il a été régulièrement possible de purifier en masse *Bonamia ostreae*, en obtenant jusqu'à 675 millions de parasites à partir de cinq huîtres fortement infectées. Un élément primordial pour réussir à purifier ce protozoaire a été d'utiliser du détergent Tween 80 à une concentration relativement forte (1%) dans les solutions d'homogénéisation et dans les gradients. Ce produit a permis de limiter les phénomènes d'agrégation et n'a pas affecté l'intégrité et la viabilité du parasite.

Lors d'une mission à l'URPIGM de Mike Hine (Nouvelle-Zélande), qui a apporté des huîtres *Tiostrea lutaria*, ce protocole a été appliqué avec succès au *Bonamia* associé à cette espèce d'huître. Au cours d'un stage post-doctoral à l'URPIGM, Louise Goggin (Australie) a adapté ce protocole à la purification des stades trophozoïtes et schizontes de *Perkinsus atlanticus*, parasite de la palourde *Tapes decussatus* (publication 8). Ce protocole a été adapté par Dominique Hervio et Suzanne Bower pour la purification du protozoaire *Mikrocytos mackini* parasite de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas*, au Canada. A partir de la disponibilité de suspensions purifiées de *B. ostreae* et des autres protozoaires, de nombreux travaux ont été entrepris qui seront décrits dans différentes parties de ce document.

2.3. Rickettsiales (9)

L'importance croissante des cas de mortalités associées à des rickettsies chez les mollusques, et plus récemment chez les crevettes, a conduit à envisager de développer des recherches sur les rickettsioses. En s'inspirant des quelques méthodes disponibles pour purifier des rickettsies de vertébrés à partir de cultures *in vitro*, un protocole a été mis au point pour la rickettsie de *Pecten maximus*, puis validé pour la rickettsie de *Chlamys opercularis*. La pureté des suspensions a été vérifiée en microscopie électronique, et a été confirmée en immunofluorescence par la stricte spécificité des immunosérums préparés à partir de ces suspensions. L'intégrité ultrastructurale des parasites a été contrôlée, ainsi que leur infectiosité lors d'essais d'infection de larves de *P. maximus*.

Les diverses études basées sur la disponibilité de ces suspensions purifiées seront décrites dans différentes parties de ce document.

3. Caractérisation biochimique et préparation de sondes moléculaires

La disponibilité de protocoles d'isolement et de purification pour les différents types d'agents pathogènes, virus, bactéries, rickettsies et protozoaires, a créé un contexte favorable à l'initiation de travaux focalisés sur leur caractérisation biochimique, antigénique et génétique. Ces critères devaient compléter les seules descriptions morphologiques qui étaient pratiquées jusqu'alors sur la base des techniques de microscopie photonique et électronique. Il convenait d'aborder la caractérisation biochimique à l'aide de techniques d'analyses électrophorétiques et enzymologiques des protéines. Il fallait surtout développer les techniques d'hybridation lymphocytaire et les techniques de biologie moléculaire afin de préparer des anticorps monoclonaux et des sondes nucléiques. Ces réactifs devaient être utilisables pour les caractérisations antigéniques et génétiques des agents pathogènes et pour développer de nouvelles méthodes de diagnostic.

3.1. Caractérisations biochimiques

La caractérisation biochimique d'un agent pathogène apporte des critères taxonomiques en complément de la description morphologique. Ces critères biochimiques ne sont pas très utiles en termes de techniques de détection et de diagnostic des agents pathogènes, si ce n'est pour l'identification de champignons ou de bactéries préalablement isolés sur des milieux plus ou moins sélectifs. Les techniques de caractérisation biochimique sont très simples à mettre en oeuvre ou à développer car de nombreux tests ont été décrits et souvent commercialisés sous forme de kits plus ou moins standardisés et miniaturisés. De tels tests sont déjà fréquemment utilisés en aquaculture, comme cela a été fait par exemple à l'URPIGM pour identifier et caractériser une souche du champignon *Fusarium solani* pathogène de *Penaeus japonicus* (9) et des souches de *Vibrio* associées au syndrome de "bolitas" chez la crevette *P. vannamei* (4).

En médecine humaine et vétérinaire et en agriculture, les études sur le métabolisme et la biochimie des agents pathogènes sont essentiellement motivées par la recherche de cibles spécifiques pour des traitements. Il n'est évidemment pas envisageable d'entreprendre des recherches de pharmacologie spécifiques aux mollusques ou aux crevettes, d'une part en raison du coût de ce type de travaux, d'autre part, en raison des possibilités limitées de traitements dans les élevages aquacoles.

Des travaux sur la caractérisation biochimique d'agents pathogènes d'invertébrés marins peuvent cependant être intéressants pour rechercher des activités enzymatiques impliquées dans les mécanismes de pathogénicité ou de résistance au système immunitaire de l'hôte. Des analyses biochimiques ont été entreprises pour *Bonamia ostreae* et pour la rickettsie de *Pecten maximus*, notamment afin de caractériser des enzymes telles que des phosphatases acides ou des catalases. En effet, ces enzymes sont connues chez des agents pathogènes de vertébrés pour leur implication dans la résistance aux mécanismes cytotoxiques des cellules immunitaires.

Caractérisation d'activités enzymatiques de Bonamia ostreae (10)

A partir de suspensions purifiées de parasites, 9 activités enzymatiques ont été caractérisées parmi les 19 identifiables avec le système miniaturisé Api-Zym. Outre les phosphatases acide et alcaline qui se sont avérées correspondre aux activités quantitativement les plus importantes, il a été mis en évidence une estérase (C4), une estérase lipase (C8), une leucine arylamidase, une naphthol phosphohydrolase, une beta-galactosidase, une alpha-glucosidase et une N-acetyl-beta-glucosaminidase (données non publiées).

La phosphatase acide a été localisée en microscopie électronique. Elle est accumulée dans un organite appelé "corps dense" dont la nature et la fonction était jusqu'alors totalement inconnu. Il n'est pas certain que le parasite puisse procéder à l'exocytose de cet organite pour libérer cette activité enzymatique, bien que des parasites dépourvus de corps denses aient été observés à la suite de traitement par une magainine (46). La mise en évidence d'une activité métabolique respiratoire dans les hémocytes d'huître, qui sont les cellules hôtes de *B. ostreae*, amène l'hypothèse sur le rôle éventuel de la phosphatase parasitaire pour survivre et se développer dans ces cellules immunitaires. Comme pour la majorité des phosphatases acides de leishmanies, celle de *B. ostreae* est sensible au L-tartrate.

Caractérisation biochimique de la rickettsie de P. maximus (8)

Compte tenu de la limite des critères morphologiques ultrastructuraux pour décrire et reconnaître des rickettsies, leur identification doit être basée sur des critères complémentaires, tel que le profil électrophorétique des protéines qui a mis en évidence 15 protéines majeures. Par ailleurs, plusieurs activités enzymatiques ont été caractérisées, notamment une activité phosphatase acide sensible au L-tartrate et une activité catalase. Cette enzyme est classiquement impliquée dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au cours du processus de phagocytose. Ces activités enzymatiques pourraient être impliquées dans les mécanismes d'adaptation des rickettsies de mollusques pour résister aux produits microbicides des hémocytes.

3.2. Caractérisations antigéniques (11,12)

La caractérisation antigénique des agents pathogènes dépasse le cadre taxonomique et ouvre la voie aux techniques de détection et de diagnostic. Celles-ci sont essentielles, d'une part, pour tous les travaux d'épidémiologie analytique sur les modalités de transmission et les processus de maturation des agents pathogènes, d'autre part, pour les travaux d'épidémiologie descriptive et les contrôles zoosanitaires. Compte tenu de l'extrême importance à court terme de mesures prophylactiques pour limiter l'impact des maladies endémiques et épidémiques sur les productions d'invertébrés marins, la caractérisation antigénique des agents pathogènes a été un domaine primordial du programme de l'URPIGM.

Outre la possibilité de préparation d'anticorps polyclonaux spécifiques à partir de suspensions purifiées d'agents pathogènes, la technologie d'hybridation lymphocytaire a été prise en compte pour préparer des anticorps monoclonaux. Les avantages et limites respectivement liés aux deux types d'anticorps ont été considérés en termes de modalités de préparation et d'utilisation.

La préparation d'anticorps polyclonaux spécifiques impose en pratique de disposer au préalable de préparations purifiées de l'agent pathogène. Dans ces conditions, des anticorps polyclonaux sont très faciles à préparer en immunisant des animaux de laboratoire, et sont faciles à utiliser en tant que réactifs de diagnostic pour des tests d'immunofluorescence indirecte. Ils sont aussi utiles pour mettre en évidence des parentés antigéniques entre des agents pathogènes.

L'hybridation lymphocytaire est une méthodologie relativement lourde à mettre en oeuvre, en particulier pour l'étape de sélection des hybridomes spécifiques. Selon la conception du test de cette sélection, il est possible d'identifier des hybridomes sécrétant d'anticorps monoclonaux spécifiques d'un agent pathogène, même si celui-ci n'a pu être isolé et purifié. Les anticorps monoclonaux sont des réactifs fantastiques en raison de leur homogénéité, de leur stricte spécificité et de leur disponibilité "illimitée". Ils permettent de développer n'importe quel type de test pour le diagnostic qualitatif et quantitatif des agents pathogènes, et ce, même dans des échantillons biologiques complexes en utilisant par exemple des techniques dites "sandwich".

Grâce initialement à une étroite collaboration avec l'équipe de Bernard Pau et Francis Paolucci de Sanofi à Montpellier, l'équipe de l'IFREMER a acquis un savoir-faire de l'hybridation lymphocytaire. La maîtrise de la technologie d'hybridation lymphocytaire par l'URPIGM a été montrée par les nombreux anticorps qui ont été produits avec les spécificités escomptées. L'acquisition de ce savoir-faire a été initialement basée sur un stage de Viviane Boulo à Sanofi et ensuite sur l'organisation de réunions techniques avec F. Paolucci. Cette technologie a été ensuite transférée à d'autres équipes de pathologistes par le biais de collaborations avec des collègues d'autres équipes de l'IFREMER, notamment Jean-Louis Nicolas de Brest, Michel Comps et Gilles Breuil de Palavas, et d'équipes étrangères en Espagne, Australie, Canada et Equateur. Les travaux relatifs à la préparation d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux spécifiques d'agents pathogènes ou de maladies de mollusques et de crevettes sont résumés ci-dessous. Différents protocoles de sélection des hybridomes ont été conçus pour tester leurs avantages respectifs, mais aussi en fonction de la plus ou moins grande disponibilité en antigènes purifiés. En bilan, l'immunofluorescence indirecte (IFI) pourrait préférentiellement être utilisée comme test de sélection en raison de ses nombreux avantages: facilité de mise au point; extrême sensibilité et spécificité; visualisation directe des complexes antigène-anticorps; possibilité de sélectionner des anticorps spécifiques d'antigènes intracellulaires si les frottis ont été préalablement fixés par l'acétone qui perméabilise les membranes. De plus, l'IFI peut éviter de devoir purifier les antigènes, ce qui peut être fastidieux voire pratiquement impossible. L'inconvénient relativement mineur de l'IFI est lié au fait qu'elle repose sur des examens microscopiques qui ne peuvent être que partiellement automatisés.

Bonamia ostreae (13,14)

La purification de *B. ostreae* en 1985 avait immédiatement conduit à l'obtention d'anticorps polyclonaux qui s'étaient avérés spécifiques sur la base de tests d'immunofluorescence indirecte (7).

La préparation d'anticorps polyclonaux a été entreprise, ce qui correspondait au premier travail de ce type pour un agent pathogène d'invertébré marin. Un double protocole de sélection des hybridomes spécifiques a été établi sur la base d'un test radioimmunologique indirect en utilisant des microplaques couvertes, soit d'antigènes d'huître, soit de parasites purifiés. Ce protocole avait pour but d'éviter la sélection des hybridomes faussement spécifiques de *B. ostreae*. En effet, les parasites purifiés sont couverts de fragments de la vacuole parasitophore hémocytaire qui correspondent donc à des antigènes d'huîtres. Un simple protocole de sélection avec des suspensions de parasites purifiés aurait pu conduire à retenir des hybridomes spécifiques de ces antigènes, qui sont évidemment présents dans les suspensions utilisées pour immuniser les souris.

Après la sélection et le clonage, 10 hybridomes spécifiques du parasite ont été obtenus. La réactivité des anticorps monoclonaux (AcM) a été analysée. L'AcM 20B2, en particulier, réagit avec un épitope massivement représenté chez *B.ostreae*, 800000 épitopes environ par parasite. La localisation sub-cellulaire des épitopes a été précisée ultérieurement sur la base de profil d'immunofluorescence.

Marteilia (15)

Des anticorps polyclonaux ont été préparés à partir des suspensions purifiées de pansporoblastes de *Marteilia refringens* parasite de l'huître plate *Ostrea edulis*, et ensuite des *Marteilia* isolés des moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*.

Des anticorps monoclonaux ont été préparés contre les formes végétatives et les pansporoblastes du parasite qui ont été isolés de *Mytilus edulis*. Les souris ont été immunisées avec des suspensions hautement purifiées de parasites. Le protocole de sélection des hybridomes a consisté dans un premier temps à identifier ceux réagissant positivement avec des parasites purifiés selon un test d'immunofluorescence indirecte (IFI). Dans un deuxième temps, la spécificité des hybridomes ainsi sélectionnés a été confirmée par l'absence de réactivité vis-à-vis d'antigènes de cellules de la glande digestive, également selon un test IFI. Six anticorps monoclonaux ont été obtenus qui diffèrent par leur spécificité vis-à-vis des parois des pansporoblastes ou des spores.

Perkinsus atlanticus (16)

Les protozoaires du genre *Perkinsus* provoquent des endémies dramatiques chez plusieurs espèces de mollusques. La taxonomie et l'épidémiologie de ces parasitoses sont très mal comprises car il semble que la spécificité parasitaire soit large, du moins expérimentalement. La disponibilité d'anticorps monoclonaux devaient permettre d'aborder ces questions avec des outils hautement résolutifs, en termes de sensibilité et spécificité. Selon un protocole similaire à celui précédemment décrit pour *Marteilia*, des anticorps monoclonaux ont été produits contre les stades zoospores de *P. atlanticus*. Ceci est particulièrement intéressant car il s'agit du stade infectieux et qu'il est facile d'obtenir *in vitro* des zoospores à partir de tissus infectés en les cultivant sur des milieux utilisés en mycologie.

Rickettsiales (17)

Après avoir établi un protocole de purification pour la rickettsie de *Pecten maximus*, des anticorps polyclonaux ont pu être obtenus par immunisation de souris.

Pour la production d'anticorps monoclonaux, le protocole de sélection des hybridomes a été basé sur un test ELISA en fixant environ 1 million de rickettsies par puits de microplaques, ce qui n'a pas été difficile compte tenu des rendements des opérations de purification. Ce test a permis d'analyser très rapidement un grand nombre d'hybridomes. Plus de vingt hybridomes ont été sélectionnés et l'un d'eux retenu préférentiellement en raison de l'intensité des signaux en ELISA qui ont été confirmés en IFI.

Bactéries (18)

Le *Vibrio P1* a été identifié en 1989 par Philippe Maes et Christine Paillard comme étant l'agent responsable de la maladie de l'anneau brun de la palourde *Tapes philippinarum*. Ces deux jeunes scientifiques ont ainsi contribué à considérer les bactéries comme des microorganismes pathogènes des mollusques, non seulement aux stades larvaires et juvéniles, mais aussi adultes. La méthode de diagnostic qu'ils avaient établie était cependant incompatible avec une utilisation de routine en raison de la complexité des critères culturels et biochimiques utilisés, et de la durée des opérations d'identification. Des anticorps polyclonaux étaient disponibles mais difficiles à utiliser en raison des risques de réaction croisée avec d'autres vibrios qui sont très fréquents dans le milieu marin et souvent associés aux mollusques. De plus, l'utilisation qui était escomptée des anticorps correspondait à un test de type ELISA, qui est plus facile à développer avec des anticorps monoclonaux que polyclonaux.

Le protocole de sélection des hybridomes a été basé sur un ELISA qui a permis de tester en parallèle leur réactivité vis-à-vis de *Vibrio P1* et d'une batterie de bactéries comme témoin de spécificité. Ce protocole s'est avéré efficace puisque plusieurs AcM spécifiques ont été obtenus. Ultérieurement, ils ont été utilisés pour développer une méthode très rapide et sensible de diagnostic de ce *Vibrio*.

Il convient d'indiquer que selon le même protocole d'immunisation et de sélection d'hybridomes, des anticorps monoclonaux ont été préparés contre une souche bactérienne isolée en Equateur par Iliana Morales et avec laquelle elle a reproduit expérimentalement le syndrome "Bolitas" chez des larves de *Penaeus vannamei*. Ces anticorps monoclonaux sont actuellement testés en tant que réactif de diagnostic, la méthode en cours de développement étant un test ELISA de type "colony-blot". Ce travail est original à l'échelle des crustacés puisqu'il correspond aux premiers anticorps monoclonaux pour un agent pathogène de crevette. De plus, il a été réalisé au CENAIM dans le cadre de la coopération Equateur-France, ce qui indique que la technologie d'hybridation lymphocytaire peut être transférée et pratiquée dans des laboratoires de biologie marine (résultats non publiés).

Virus (19)

La disparition en France de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, dans les années soixante-dix a été imputée à un virus de la famille des Iridoviridae. Sur la base de critères ultrastructuraux, ce virus a été apparenté aux *Lymphocystivirus* qui sont des agents pathogènes connus chez les poissons. Le virus d'huître n'a pas été isolé, mais il est encore parfois visualisé sur des préparations histologiques d'huîtres collectées au Portugal. Par contre, des *Lymphocystivirus* peuvent être isolés de poissons et cultivés sur lignée cellulaire, ce qui a permis d'entreprendre la préparation d'anticorps monoclonaux contre ce virus dans l'optique de les tester ultérieurement en tant que réactifs potentiels de diagnostic du virus d'huître. L'immunisation a été faite avec des homogénéisats de tissus fortement infectés de poissons, sans pratiquer de purification. En effet, il était utile d'essayer d'éviter de purifier les virus car la purification n'est pas encore bien pratiquée à partir de tissus de mollusques. La sélection des anticorps monoclonaux a été faite en pratiquant un test IFI en parallèle sur des cultures cellulaires non-infectées et infectées. Ces dernières ont été fixées à différents temps d'infection, et donc avec des antigènes viraux correspondant à diverses stades de la réplication virale. Plusieurs anticorps monoclonaux spécifiques ont été obtenus. Ils constituent des réactifs potentiels pour détecter des iridovirus d'huîtres.

Selon un schéma relativement similaire, des anticorps monoclonaux ont été préparés contre le baculovirus de la crevette *Penaeus vannamei*. L'immunisation a été faite avec des tissus virosés et le protocole de sélection d'hybridomes a été basé sur un test immunohistologique pratiqué en parallèle sur des échantillons d'hépatopancreas virosés et non virosés. La spécificité des anticorps sélectionnés vis-à-vis de polyèdres en suspension a été initialement montrée en IFI mais n'a pas été retrouvée lors d'analyses faites en Equateur. Il a été supposé que les anticorps aient été spécifiques de protéines de l'hôte associées aux polyèdres.

Néoplasies (20)

De nombreux cas de néoplasies ont été signalés chez les mollusques et les observations commencent aussi à se multiplier chez les crevettes. L'étiologie de ces néoplasies est très généralement inconnue, des polluants étant parfois suspectés. Dans un cas étudié chez le mollusque *Mya arenaria*, l'étiologie s'est avérée de type rétroviral. Dans le cas de la tumeur de la moule, étudiée en collaboration avec Ralph Elston (Battelle Institute, USA), la nature infectieuse de la tumeur a été démontrée sur la base de la reproduction expérimentale de la néoplasie à partir d'injection d'homogénéisats ultrafiltrés (32). Cependant, il n'a pas été possible d'isoler de virus. De ce fait, la préparation d'anticorps monoclonaux a été basée sur des immunisations avec des cellules transformées. Un double protocole de sélection a été conçu pour tester en parallèle la réactivité des hybridomes vis-à-vis des hémocytes normaux et vis-à-vis des hémocytes tumoraux. Plusieurs anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes de cellules tumorales ont été obtenus, ceci sans avoir à essayer de purifier des protéines spécifiques. Les épitopes reconnus par certains de ces anticorps monoclonaux ont été localisés en microscopie électronique.

3.3. Caractérisations génétiques (12)

Par référence aux travaux réalisés depuis déjà plusieurs années en médecine et en entomologie, il apparaissait que la caractérisation génétique des agents pathogènes méritait d'être abordée pour les invertébrés marins. A court terme, il s'agissait davantage de s'attacher à la préparation de sondes nucléiques applicables au diagnostic des agents pathogènes plutôt que d'étudier l'organisation de leurs génomes. D'un point de vue technique, la préparation de sondes nucléiques pouvait être plus simple, plus rapide et plus productive que la préparation de sondes immunologiques par hybridation lymphocytaire. En effet, grâce aux techniques de biologie moléculaire, il est possible à partir d'une quantité très limitée d'ADN d'un agent pathogène de préparer rapidement une banque génomique. Par ailleurs, les techniques de diagnostic basées sur l'utilisation de sondes nucléiques et celles basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux peuvent être complémentaires du point de vue de leurs applications en aquaculture.

La préparation de sondes nucléiques a été généralement basée sur l'utilisation de suspensions purifiées d'agents pathogènes qui ont permis d'extraire les ADN génomiques en limitant presque totalement le risque de contamination par de l'ADN correspondant au génome de l'invertébré. Quelques essais ont consisté à extraire l'ADN total de tissus infectés et ensuite à séparer les ADN génomiques de l'agent pathogène et de l'hôte. Cette séparation repose sur une centrifugation isopycnique en présence d'un agent intercalant ayant une affinité différente pour les bases puriques et pyrimidiques, ce qui modifie les densités des ADN génomique en fonction de leur composition en bases.

Les opérations de clonage ont été généralement faites en utilisant le plasmide Bluescript qui permet d'identifier facilement les colonies bactériennes correspondant à des plasmides recombinants. Ces colonies apparaissent de couleur blanche à la suite de l'insertion d'ADN dans le gène reporteur lacZ. A partir de colonies prélevées au hasard, des préparations d'ADN plasmidiques ont été effectuées et marquées de façon non radioactive afin de disposer de sondes. Il était en effet préférable de travailler avec ce type de marquage plutôt qu'avec des éléments radioactifs, compte tenu de la perspective d'utilisation de ces sondes dans des laboratoires de biologie marine ou dans des élevages et des écloséries. Généralement, les sondes ont été testées pour leur spécificité et leur sensibilité en réalisant des tests comparatifs de réactivité vis-à-vis d'ADN génomique de l'agent pathogène et de l'hôte. Dans certains cas, les sondes les plus performantes ont été séquencées et des oligonucléotides ont été synthétisés pour des applications ultérieures en diagnostic selon la technique dite de PCR (Polymerase Chain Reaction).

Selon cette démarche, des premières sondes nucléiques ont été obtenues pour *Marteilia* à partir d'ADN préalablement séparé de celui de l'hôte par centrifugation (21), et plus tard à partir d'ADN extrait de parasites purifiés (6). Pour la rickettsie de *Pecten maximus* il a été aussi possible de préparer des sondes oligonucléotidiques, ceci en collaboration avec David Shire et son équipe de Sanofi-Elf BioRecherches à Toulouse (22). Ensuite des sondes ont été préparées pour *Lymphocystivirus* (19) et *Perkinsus* (16).

4. Développement de méthodes de diagnostics

4.1. Microplaque de quantification bactérienne (23)

Les écloséries représentent un maillon particulièrement sensible aux infections bactériennes dans la chaîne de production d'invertébrés marins. Selon différents principes zootecniques, les aquaculteurs tentent de contrôler les proliférations bactériennes dans les écloséries, notamment en utilisant de façon préventive des antibiotiques ou, plus récemment, en disposant des systèmes de filtres biologiques qui permettent une recirculation de l'eau dans les bacs d'élevage.

Quelque soit le procédé, il est difficile d'en évaluer en permanence l'efficacité en raison de l'inadéquation des techniques classiques de bactériologie pour effectuer des contrôles routiniers, et ce, dans de nombreux points sensibles de l'éclosérie qui est une infrastructure relativement complexe. En effet, le suivi bactériologique pour être fiable et préventif doit porter sur l'ensemble des installations de pompage d'eau de mer, de filtration, de distribution dans les différentes salles spécifiquement utilisées pour la maturation des géniteurs, la production de microalgues et d'artémies, l'élevage larvaire, etc.. Dans de nombreux cas, l'éclosérie dispose effectivement d'un laboratoire de bactériologie, mais son fonctionnement est très critiquable en raison de l'impossibilité d'effectuer un nombre suffisant d'analyses. Celles-ci, pour être utiles, nécessiteraient l'ensemencement de géloses en boîtes de Petri avec différentes dilutions des échantillons et dénombrement ultérieurs des colonies. Il apparaît que plusieurs dizaines de géloses devraient être quotidiennement utilisées, ce qui représente plusieurs litres de milieux et des quantités considérables de boîtes chaque semaine en plus de nombreuses heures de travail technique.

La bactériologie humaine et vétérinaire a depuis longtemps modernisé ses techniques en développant de nombreux systèmes miniaturisés et prêts à l'emploi qui sont adaptés à la détection et l'identification des souches d'importance médicale.

A court terme, la bactériologie des invertébrés marins manque d'informations fiables sur les souches associées aux problèmes en écloséries, notamment pour connaître les souches strictement pathogènes et celles opportunistes. De ce fait, il est encore prématuré d'envisager la production de systèmes miniaturisés permettant le diagnostic d'une ou plusieurs souches pathogènes.

Un outil méritait par contre d'être conçu pour faciliter le contrôle bactériologique et le suivi épidémiologique des écloséries, et plus généralement des élevages d'invertébrés marins. Cet outil consiste en un système miniaturisé et prêt à l'emploi pour quantifier facilement et rapidement les populations bactériennes. Le principe qui a été développé, initialement avec Iliana Morales de l'éclosérie équatorienne d'Inbiosa lors d'un séjour à l'URPIGM, repose sur la méthode d'estimation du nombre le plus probable de bactéries cultivées en milieu liquide. Ultérieurement, en collaboration avec Sanofi et Institut Pasteur Production, un produit a été développé et commercialisé sous le nom d'Aqua-Plak (23 bis). Les puits de la microplaque contiennent sous forme déshydratée, soit un milieu non-sélectif permettant la croissance de très nombreux types de bactéries marines, soit un milieu sélectif pour les vibrios qui sont les bactéries les plus fréquemment impliquées dans des problèmes pathologiques. Ainsi, en effectuant une simple série de dilutions dans les puits d'une plaque préalablement réhydratée,

il est possible en 24 heures d'estimer, pour une douzaine d'échantillons, le nombre de bactéries totales et la proportion de vibrios. La lecture des microplaques est visuelle, par simple observation du changement de couleur des milieux dans les puits, et les nombres sont déterminés en se référant à un document fourni avec le kit.

4.2. Immunodiagnosics (12)

Les immunodiagnosics reposent sur la spécificité de formation du complexe antigène-anticorps. Chez les invertébrés, il n'y a pas de production d'anticorps, ce qui impose pour le diagnostic d'une infection de mettre en évidence l'antigène et par conséquent de disposer d'anticorps spécifiques utilisables en tant que réactifs.

La préparation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux a ouvert la voie au développement d'immunodiagnosics, qui étaient jusqu'alors absents des méthodes de détection des agents pathogènes de mollusques. En ce qui concerne les crevettes, un seul essai de développement d'immunodiagnostic avait été rapporté concernant un dosage de polyèdres de baculovirus à l'aide d'un immunosérum.

En 1985, il existe déjà en santé humaine et animale un nombre considérable de données techniques et épidémiologiques relatives à différents types d'immunodiagnosics. De ce fait, les axes de travail ont été faciles à déterminer pour développer des immunodiagnosics adaptés aux divers types d'applications envisageables en aquaculture des invertébrés. Il convenait toutefois de considérer avec attention ces divers types d'utilisations. Pour les producteurs, les immunodiagnosics devaient reposer sur des appareillages simples. Pour les institutions ou associations professionnelles, les tests devaient permettre un très grand nombre d'analyses plus ou moins automatisées. C'est pourquoi deux types d'immunodiagnosics ont été développés, d'une part, l'immunofluorescence indirecte (IFI), d'autre part l'immunoenzymologie, plus connue sous l'abréviation de la terminologie anglaise ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), selon une technique dite "direct sandwich".

Immunofluorescence indirecte (IFI)(5-8, 11-20)

L'immunofluorescence repose sur l'utilisation d'anticorps marqués par un fluorochrome, ce qui permet leur visualisation en épifluorescence. Des anticorps marqués, spécifiques d'immunoglobulines de souris et d'autres animaux utilisés pour préparer des anticorps, sont disponibles dans le commerce. Ainsi, il n'est pas nécessaire de procéder au marquage des anticorps spécifiques des agents pathogènes si l'on utilise une méthode d'immunofluorescence dite indirecte (IFI). Celle-ci consiste à faire dans un premier temps la réaction antigène-anticorps spécifique, et dans un deuxième temps la réaction antigène-anticorps spécifique-anticorps fluorescent.

La technique d'IFI est difficile à surpasser en termes de simplicité de développement et de mise en oeuvre. En effet, dès que des anticorps spécifiques sont disponibles, il devient immédiatement possible de disposer d'un test d'immunofluorescence spécifique et généralement extrêmement sensible. Il suffit de préparer un frottis de tissus et de le fixer, avant de l'incuber successivement avec les solutions d'anticorps spécifiques de l'antigène, puis d'anticorps fluorescents spécifiques des immunoglobulines utilisées précédemment. La détection des complexes antigène-anticorps-anticorps repose alors sur un simple examen

microscopique pour visualiser les images de fluorescence localisées aux sites antigéniques. Cet examen microscopique peut être relativement long dans le cas de faibles infections, ce qui limite l'IFI à des petites séries d'analyses. L'IFI ne peut pas être facilement automatisée, même si l'on dispose d'un système d'analyse d'image qui est onéreux et complexe à standardiser. Enfin, il faut noter que l'IFI est mal adaptée à la quantification des infections.

En pratique, des immunodiagnostic en IFI ont été établis pour tous les agents pathogènes pour lesquels des anticorps ont été préparés et précédemment décrits. Pour la bonamiose, l'IFI a été validée comme technique de diagnostic comparativement à l'examen de coupes ou de frottis colorés (14). L'IFI s'est en particulier avérée très utile pour reconnaître, sans risque de confusion avec des bactéries, de faibles infections rickettsiennes sur frottis de tissus où les colonies sont très souvent dissociées (27). La détection de cellules néoplasiques chez la moule a été facilitée par l'utilisation du test IFI (20). Par ailleurs, cette maladie se caractérise par deux types d'hémocytes néoplasiques qui diffèrent par leur niveau de ploïdie et qui peuvent être différenciés en fonction de leurs réactivités vis-à-vis d'anticorps monoclonaux (20 bis). La technique d'IFI a été aussi souvent utilisée pour localiser les épitopes (14, 20) et dans quelques cas pour déterminer les relations antigéniques entre différentes souches ou espèces d'agents pathogènes (26, 15 bis).

Immunodosages enzymatiques (ELISA) (12,24,25)

Les immunodosages enzymatiques reposent sur l'utilisation d'anticorps couplés à une enzyme qui généralement permet la transformation d'un substrat incolore en un produit coloré. La quantité de produit formé peut être estimée à l'aide d'un spectrophotomètre, cette quantité étant proportionnelle à celle d'enzyme, elle-même proportionnelle à celle d'anticorps fixés sur les antigènes. Les tests ELISA sont donc adaptés à la détection mais aussi à la quantification des antigènes. Parmi les différents procédés qui ont été décrits, la méthode sandwich a été préférentiellement retenue en raison de ses performances pour détecter des antigènes dans des échantillons biologiques complexes. Elle consiste à utiliser un anticorps pour capturer spécifiquement les antigènes présents dans un échantillon. Après lavages, la détection des complexes antigène-anticorps est faite avec un anticorps spécifique couplé à une enzyme. Si l'anticorps de détection est directement couplé à l'enzyme, la méthode est dite directe, alors que la méthode est dite indirecte si l'anticorps de détection est mis en évidence à l'aide d'un second anticorps marqué.

Généralement, les tests ELISA sont pratiqués dans des microplaques avec l'anticorps de capture fixé dans les puits. A la fin des différentes étapes de réactions avec les échantillons, les solutions de lavages, les solutions d'anticorps de détection et la solution de substrat, les microplaques sont analysées automatiquement avec un spectrophotomètre permettant la mesure des densités optiques dans chaque puits. Toutes les étapes d'un test ELISA peuvent être automatisées, ce qui permet d'effectuer en routine plusieurs dizaines, voire centaines, de diagnostics qualitatifs et quantitatifs dans un laps de temps limité et avec du personnel relativement peu spécialisé.

L'ELISA apparaît comme une technique particulièrement attrayante pour des laboratoires qui seraient en charge de nombreux contrôles zoosanitaires. Des travaux ont donc été entrepris dans l'optique d'ouvrir à l'aquaculture ce type de technique pour effectuer les contrôles épidémiologiques et, subséquentement, d'élaborer des mesures prophylactiques à l'encontre des épidémies et endémies.

ELISA de la bonamiose de l'huître (24, 24 bis)

Pour l'élaboration d'un premier test ELISA, qui puisse être développé comme un nouveau type produit de diagnostic pour l'aquaculture des invertébrés marins, les travaux ont été initiés sur la bonamiose. Ce choix a été motivé par l'importance de la bonamiose dans plusieurs pays européens et nord-américain. De plus, il y avait l'anticorps monoclonal 20B2 qui réagit avec toutes les souches de ce parasite (26) et reconnaît un épitope situé à la surface du parasite (14), ce qui devait faciliter la mise au point du test. A la différence de l'IFI, le développement d'un test ELISA est un processus long et complexe, car il exige de prendre en compte de nombreux paramètres pour chacune des étapes: mode de fixation de l'anticorps de capture sur la microplaque; concentration de cet anticorps; saturation des plaques; traitement de l'échantillon; tampons de lavages; couplage de l'enzyme et de l'anticorps de détection, etc.. En pratique, le savoir-faire des collègues de Sanofi, et en particulier de Francis Paolucci et Bernard Panatier, a été essentiel à l'aboutissement du kit de diagnostic de la bonamiose et de sa mise sur le marché.

ELISA de la vibriose de la palourde (25)

Un test ELISA de type "colony-blot" a été développé pour identifier très rapidement le *Vibrio P1* responsable de la maladie de l'anneau brun de la palourde. La sensibilité et la spécificité de ce test sont parfaites puisque égales à 100 % par rapport à la méthode de référence qui nécessite plusieurs jours pour effectuer l'identification. Le test ELISA est de plus incomparablement plus simple à mettre en oeuvre et moins onéreux.

Divers

Des travaux ont été aussi réalisés pour essayer de développer des immunodosages enzymatiques sur deux autres modèles, la rickettsiose de la coquille Saint-Jacques et la néoplasie hémocytaire de la moule. Dans les deux cas des anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes membranaires étaient disponibles. Les travaux se sont avérés rapidement trop lourds au regard de leur intérêt à court terme pour des études fondamentales ou des applications en aquaculture. De ce fait, les travaux ont été arrêtés à un stade relativement précoce de standardisation.

Diagnostiques par sondes nucléiques (12,16,19,21-22)

Comparativement aux immunodiagnostic, l'intérêt de la majorité des techniques de diagnostics par sondes nucléiques repose davantage sur la facilité de préparation de ces dernières que sur les caractéristiques des tests eux-mêmes qui consistent en l'hybridation des sondes avec les ADNs ou les ARNs des agents pathogènes. En effet, les techniques d'hybridation par sondes nucléiques de type dot-blot peuvent être adaptées à des grandes séries d'analyses comme le sont les techniques d'immunodiagnostic de type ELISA, et leur sont généralement équivalentes, en termes de spécificité et sensibilité. Les travaux réalisés avec des sondes nucléiques spécifiques de quelques agents pathogènes de mollusques ont

montré des seuils de sensibilité situés dans le domaine des valeurs classiquement rapportées en médecine en utilisant des sondes non radioactives.

Quelques essais préliminaires ont été effectués en utilisant des sondes rickettsiennes pour essayer d'appliquer l'hybridation *in situ* au diagnostic sur frottis de tissus, ceci en tant qu'alternative à l'immunofluorescence qui en pratique s'est avérée beaucoup plus facile à mettre en oeuvre que l'hybridation.

Un intérêt particulier a été porté à la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) en raison de sa sensibilité inégalée, puisqu'elle permet d'atteindre des seuils de détection voisins d'un génome d'un agent pathogène présent dans un échantillon. Ce niveau de sensibilité est indispensable pour étudier par exemple les processus de transmission verticale par contamination des ovocytes, ce qui a été suspecté pour des viroses et des rickettsioses de crevettes et de mollusques. En collaboration avec David Shire de Sanofi-Elf Biorecherches, l'acquisition de la technique de PCR et sa mise au point ont été effectuées sur le modèle de la rickettsie de *Pecten maximus*, en utilisant des amorces oligonucléotidiques dont les séquences correspondaient à un clone d'ADN génomique de cette rickettsie. Il faut noter qu'il s'agissait de la première mise au point d'un test de PCR pour un agent pathogène d'invertébré marin.

5. Epidémiologie

Deux maladies, la bonamiose de l'huître plate et la rickettsiose de la coquille Saint-Jacques, ont été prises en compte du point de vue de leur épidémiologie descriptive et/ou analytique car elles affectaient les productions françaises durant la réalisation de ce programme.

5.1. Bonamiose (26)

Dans le cas de la bonamiose, l'agent pathogène avait déjà été décrit avant l'initiation de ce programme et de nombreuses données d'épidémiologie descriptive avaient été accumulées, tant en France que dans d'autres pays européens. Le diagnostic, initialement effectué par examen histologique de coupes ou frottis colorés, a été ensuite possible par IFI et ELISA qui ont constitué de nouveaux outils d'épidémiologie. La validation de ces techniques a été basée sur quelques études cliniques pour comparer les résultats de ces méthodes avec l'histologie considérée comme technique de référence.

La disponibilité d'une collection d'anticorps polyclonaux et monoclonaux a permis d'entreprendre des analyses antigéniques sur les différentes souches géographiques, notamment pour vérifier l'hypothèse faite sur l'origine de la maladie qui résulterait de l'introduction de naissain infecté en provenance des USA. Sur la base de tests en IFI, une stricte parenté antigénique a été montrée entre toutes les souches géographiques, ce qui étayait les données histologiques de Ralph Elston. Par ailleurs, il a été montré que le parasite *Bonamia* associé à l'huître australienne *Tiostrea lutaria* était différent antigéniquement de *B. ostreae*.

5.2 Rickettsiose (27)

L'étude épidémiologique de la rickettsiose correspondait en 1987 à un problème d'actualité. En effet, il fallait déterminer l'aire d'extension de l'infection et si possible son origine, établir si les mortalités étaient liées à la présence de ce micro-organisme, et essayer de préciser les modalités de sa transmission intra- et inter-spécifique. Cette étude a été développée en étroite collaboration avec Jean-Claude Dao de l'IFREMER-Brest, Christophe Halary et Yvon Royer du Comité d'Expansion Economique des Côtes du Nord.

Sur la base d'examen histologiques, les taux et les degrés d'infection ont été régulièrement déterminés pour plusieurs populations. Ainsi, il est apparu que la Baie de Saint-Brieuc semblait exempte de rickettsie en 1985, alors qu'en 1987 tous les animaux étaient infectés. La rickettsie a été trouvée à de faibles taux et degrés chez des coquilles collectées en Ecosse, ce qui pourrait correspondre à l'origine de la maladie puisque des animaux ont été importés de ce pays dans la Baie de Saint-Brieuc à partir de 1982 dans le cadre de programme de repeuplement. Après 1987, les degrés d'infection ont augmenté progressivement en Baie de Saint-Brieuc. Les animaux les plus atteints ont disparu régulièrement des échantillonnages à la fin de l'hiver, ce qui a coïncidé avec les mortalités massives et étaye le rôle pathogène de la rickettsie. La transmission horizontale de la rickettsiose a été établie. Grâce à la sensibilité et la spécificité de l'IFI, il a été possible de montrer que la transmission peut aussi être verticale. Cette information est primordiale compte tenu des projets de production de naissain en écloséries qui étaient mis en place avec des géniteurs infectés. Ces travaux devront être étoffés par des analyses en PCR qui n'était pas encore disponible au moment de ces travaux.

L'influence du facteur température sur l'effet pathogène de la rickettsie a été juste abordée par le biais d'une expérimentation dont les résultats n'ont pas été publiés en raison de leur caractère préliminaire. Il a été montré que les coquilles de la Baie de Saint-Brieuc, qui sont fortement infectées par la rickettsie, ont un rapport énergétique, inférieur à 1 lorsqu'elles sont acclimatées à la température de 7.5 °C, et supérieur à 1 lorsqu'elles sont acclimatées à 15.5 °C. Les coquilles, d'autres origines et peu infectées, ont des rapports énergétiques supérieurs à 1 dans les deux conditions thermiques. Ces résultats préliminaires méritent néanmoins d'être considérés en tant qu'hypothèse de travail, cette rickettsiose pouvant constituer un modèle d'étude pour analyser les interactions entre un stress physiologique et un processus infectieux.

Sur la base de comparaisons antigéniques réalisées à l'aide des anticorps polyclonaux et monoclonaux en IFI, il a été possible d'établir que la rickettsie associée au pétoncle, *Chlamys opercularis*, était très différente de celle de *P. maximus*, et par conséquent il ne s'agit pas d'un hôte réservoir.

En parallèle à ces travaux et en collaboration avec Stein Mortensen, l'association de *Pecten maximus* avec des birnavirus a été aussi analysée car, au moment des mortalités en France, les collègues norvégiens avaient isolé un birnavirus (28). Il convenait donc de préciser la nature de cette association.

Les birnavirus sont connus pour leur pathogénicité chez les poissons et ont été souvent isolés chez des mollusques et chez l'écrevisse. La nature de ces associations semble correspondre à une simple contamination des organes, mais les données les plus récentes acquises à Taiwan chez un clam, *Meretrix lusoria*, suggèrent qu'il puisse s'agir d'une réelle

infection. C'est pourquoi l'isolement de birnavirus chez des coquilles Saint-Jacques en Norvège a été pris en compte, et ce d'autant plus qu'il était concomitant avec des mortalités de naissain et d'adultes en éclosure. De plus, il faut rappeler que les examens histologiques à l'URPIGM avaient indiqué que les coquilles norvégiennes étaient exemptes de rickettsies. L'hypothèse de mortalités de coquilles dues à un birnavirus dépassait le cadre norvégien et méritait d'être prise en compte en relation avec les mortalités en France.

Des infections expérimentales ont révélé que le virus pouvait persister plusieurs mois dans les coquilles avec une diminution progressive du titre qui diffère en fonction des organes. Les résultats ont conduit à établir qu'il s'agit d'une simple persistance de virus et non pas d'une réplication.

6. Traitements

Comme cela a été indiqué en introduction, les traitements correspondent à un domaine limité d'applications en aquaculture des invertébrés marins en raison de divers impératifs liés à la disponibilité, l'efficacité et le coût des molécules. En pratique, des traitements peuvent être intéressants à court terme pour quelques types de maladies, essentiellement dues à des agents non-intracellulaires, tels que des parasites métazoaires, des champignons ou des bactéries, car ils sont plus facilement accessibles pour les molécules. Concernant les molécules antibiotiques, il peut s'agir d'insecticides, d'antifongiques ou d'antibactériens, qui doivent être solubles dans l'eau de mer ou disponibles sous une formulation adaptée à un traitement en masse des animaux.

En intégrant ces données avec celles relatives aux maladies et aux caractéristiques zootechniques des élevages, il est apparu que des études méritaient d'être entreprises sur le traitement de quelques infections parasitaire et microbienne, et ce, dans la perspective d'applications occasionnelles, notamment lors d'épidémies.

6.1 Parasitose: *Mytilicola intestinalis* (29)

La première étude relative à un traitement concerne la parasitose de la moule, *Mytilus edulis*, par le crustacé copépode *Mytilicola intestinalis*. Ce parasite du tube digestif affecte la croissance des mollusques qui deviennent non-commercialisables lorsque les infections sont trop fortes. Des mortalités massives se sont produites à plusieurs reprises, notamment dans les années quatre-vingt dans la Baie du Mont Saint-Michel en France. En tant que crustacé et arthropode, *M. intestinalis* s'apparente aux insectes, ce qui le rendait potentiellement sensible à des molécules insecticides. Par ailleurs, les données épidémiologiques montraient que l'infection se produit essentiellement au printemps. A cette époque, les animaux sont au stade juvénile et sont encore sur les cordes qui sont utilisées comme collecteur de naissain et qui sont ultérieurement placées sur les bouchots. Il existe de ce fait un créneau temporel pour effectuer un traitement après le pic d'infection et avant la mise sur bouchot. De plus, le traitement n'entraînerait pas de manipulation spéciale du naissain s'il pouvait coïncider avec celle des cordes.

Des essais de traitement ont été entrepris au laboratoire avec du Neguvon, qui est une molécule utilisée en aquaculture pour le traitement d'ectoparasites de poissons et qui est

soluble dans l'eau de mer. Un protocole de traitement a été établi et a permis l'élimination de la totalité des parasites sans effets négatifs apparents sur la survie et le développement du mollusque. Les essais ont été ensuite réalisés avec le Dichlorvos qui est la molécule efficace issue de la transformation du Neguvon. En parallèle, une formulation du Dichlorvos sous forme de microémulsion a été préparée par les collègues d'Elf afin de faciliter la solubilisation dans des bacs de grand volume. Comme précédemment, il a été possible de traiter efficacement les animaux. Ces résultats ont été validés par des essais à petite échelle réalisés dans des élevages du Vivier-sur-Mer en Bretagne où la maladie avait provoqué des pertes considérables.

Les infections par *M. intestinalis* n'étant alors plus critiques pour les élevages, les éléments relatifs au traitement de cette parasitose n'ont pas été analysés à plus grande échelle. Ils seront importants à considérer dans le cas où ce type de parasitose se déclencherait à nouveau avec un caractère épidémique. Il faut évidemment souligner le caractère occasionnel que devrait revêtir ce type de traitement afin d'éviter l'apparition de phénomènes de résistance qui sont bien connus chez les insectes. De plus, il importerait de considérer l'impact écologique de tels traitements par référence aux données établies pour les zones d'élevage de saumons où le Neguvon est massivement utilisé.

6.2. Bactériose: *Vibrio P1* (30)

L'expansion extrêmement rapide de la maladie de l'anneau brun de la palourde *Tapes philippinarum* et son impact sur les cheptels ont conduit à développer des travaux sur le traitement de naissain et/ou de juvéniles, simultanément à ceux sur le diagnostic.

Différents antibiotiques antibactériens ont été testés *in vitro* pour leur efficacité vis-à-vis de *Vibrio P1*. La furazolidone a été sélectionnée et ensuite testée *in vivo*. Le protocole a été ensuite transféré aux professionnels de la vénériculture et aux responsables de cette activité au sein de l'IFREMER.

6.3 Mycose

Des essais de traitements de la fusariose due à *Fusarium solani* de la crevette *Penaeus japonicus* ont été effectués avec Jean-Louis Charriot de l'écloserie "Les Poissons du Soleil". En effet, les quelques écloséries de crevettes en France et en Espagne avaient des problèmes de maintien des géniteurs d'une saison de production à l'autre à cause d'une fusariose branchiale. Ces travaux ayant été financés par Sanofi, ils n'ont pas été publiés. Sommairement, parmi les molécules testées, une s'est avérée très efficace *in vitro*. La balnéation des animaux a ralenti le développement de la fusariose expérimentale qui est basée sur l'implantation entre la carapace et la branchie d'un disque de gélose couvert de culture de *F. solani*. Quelques expériences ont pu être effectuées en écloserie, mais en nombre trop restreint pour pouvoir conclure sur l'effet préventif d'un traitement. Ces difficultés d'expérimentation en écloserie professionnelle et la difficulté d'expérimentation tout au long de l'année avec des crevettes ont conduit à mettre au point l'infection expérimentale d'artémies.

B. TRAVAUX AYANT UN CARACTERE APPLIQUE A MOYEN TERME POUR LE CONTROLE DES MALADIES DES INVERTEBRES MARINS EN AQUACULTURE

A moyen terme, le contrôle des maladies d'invertébrés marins d'intérêt aquacole repose essentiellement sur la sélection de souches résistantes. Cet objectif nécessite, d'une part, d'acquérir et d'intégrer des connaissances, et d'autre part, de développer des méthodologies, ceci en pathologie expérimentale, en immunologie et en génétique. Ces trois domaines étant pratiquement vierges lors de l'initiation de ce programme, des travaux ont été entrepris dans plusieurs axes qui ont été retenus par référence aux données acquises concernant d'autres groupes zoologiques, mais aussi végétaux.

1. Pathologie expérimentale

1.1. Reproduction des maladies et modélisation *in vivo*

La pathologie expérimentale *in vivo*, en terme de reproduction contrôlée de maladies infectieuses ou non-infectieuses, est importante pour prouver la nature pathogène d'un agent ou toxique d'un produit. Pour les maladies infectieuses, la reproduction contrôlée d'une maladie est conditionnelle de la disponibilité en agents pathogènes sous forme purifiée et quantifiée. La pathologie expérimentale est aussi primordiale pour entreprendre des travaux de sélection de souches résistantes, comme cela a été par exemple réussi chez les insectes vis-à-vis de virus. En effet, la comparaison de la sensibilité de souches ou d'individus est à la base de schémas de sélection génétique et impose de ne pas avoir de différence ou variation entre les inoculums. Par ailleurs, la disponibilité de préparations purifiées et quantifiées d'agents pathogènes est aussi nécessaire pour exercer continuellement une pression de sélection sur la base d'infections expérimentales.

Chez les mollusques, au moment de l'initiation de ce programme, aucun agent pathogène intracellulaire n'était disponible sous forme purifiée pour entreprendre des travaux de reproduction expérimentale de maladies. Des bactéries isolées de mollusques pouvaient être facilement cultivées et utilisées pour réaliser des infections expérimentales, mais leur nature pathogène ou opportuniste était souvent controversée. De ce fait, la reproduction d'infection bactérienne n'apparaissait pas comme particulièrement difficile ou prioritaire. Chez les crevettes, quelques données étaient disponibles relatives à la purification de virus, mais toujours en quantité extrêmement limitée correspondant juste aux besoins pour effectuer des analyses biochimiques de caractérisation.

La reproduction expérimentale des maladies avait déjà été cependant réussie dans quelques cas selon des protocoles assez rustiques, généralement basés sur la mise en contact d'animaux sains avec des animaux infectés ou avec des homogénéisats de tissus infectés. Alors que chez les insectes, les animaux et les plantes, la notion de dose infectieuse était classique pour les travaux de pathologie, cette notion était encore inconnue en pathologie des mollusques et des crevettes.

Sur la base de critères techniques et économiques, quelques maladies pouvaient être alors retenues comme modèles pour développer les méthodologies de pathologie expérimentale *in vivo*.

Reproduction de la bonamiose (31)

Pour plusieurs raisons, la bonamiose est apparue comme un modèle de choix pour entreprendre des travaux relatifs aux techniques de pathologie expérimentale. Tout d'abord, il était facile d'obtenir des huîtres infectées et de purifier massivement le parasite dont la viabilité et la quantification étaient fiables. Par ailleurs, il était possible d'obtenir en provenance de l'Etang de Thau des individus exempts de parasites pour réaliser les infections expérimentales. Enfin, les pertes économiques liées à la bonamiose justifiaient et motivaient l'initiation de travaux visant à la sélection de souches résistantes, par exemple à partir d'huîtres âgées ayant survécu à la maladie dans des zones fortement infectées et de ce fait potentiellement résistantes.

Initialement, des infections expérimentales ont été réalisées chez des huîtres dont la valve supérieure a été préalablement tronçonnée afin d'avoir accès à la glande digestive. Les parasites ont été injectés dans la glande sous un volume d'inoculum de 100 mL. Dans ces conditions expérimentales et en considérant une durée d'expérience de 6 mois, l'infection d'huîtres de 3 ans originaires de l'Etang de Thau s'est avérée dépendante du nombre de parasites injectés. La dose infectieuse 50%, estimée selon la méthode de Reed et Meuch, a été de 80000 parasites. La variabilité individuelle est apparue extrêmement importante et peut être en partie artéfactuelle, puisque par exemple l'inoculum pouvait ne pas être injecté dans le tissu conjonctif de la glande mais dans un diverticule du tube digestif.

En dépit d'imperfections, cette technique s'est avérée suffisamment reproductible pour analyser la cinétique de développement de l'infection. Il a été noté que les infections sont très difficiles à déceler en histologie durant les deux premiers mois, ce qui est important à retenir d'un point de vue épidémiologique. Par ailleurs, il a été montré que l'injection massive de parasites (500000) à l'huître japonaise, *Crassostrea gigas*, n'induisait pas d'infection, ce qui suggère qu'il y ait une barrière de spécificité au niveau des hémocytes.

Ce protocole de reproduction de la bonamiose s'est aussi avéré adapté à la comparaison de la sensibilité de différentes souches géographiques. Il a été particulièrement intéressant de noter que des huîtres, produites en écloserie et descendantes de vieux géniteurs qui ont survécu à plusieurs années d'endémies, sont plus résistantes à l'infection expérimentale, puisque la dose infectieuse 50% a été significativement plus élevée. Ces résultats ont permis d'initier un programme de sélection d'huîtres résistantes à la bonamiose. Ce programme est développé par André Gérard et son équipe à l'écloserie expérimentale de l'IFREMER à La Tremblade. Ces huîtres résistantes sont soumises régulièrement à des infections et sont utilisées comme géniteurs selon un plan de sélection par génétique quantitative. Il faut indiquer que lors d'analyses des cellules immunitaires de ces huîtres "résistantes", il a été observé qu'elles ont un nombre d'hémocytes circulants nettement supérieur à la normale. Ces données préliminaires ouvrent la voie à des analyses immunologiques sur les bases cellulaires de la résistance à un agent pathogène.

Il est important de mentionner une expérimentation qui a été réalisée en collaboration avec Ralph Elston lors d'une mission aux USA, et dont les résultats n'ont pas été publiés. Il s'agit de la comparaison de sensibilité de souches d'huîtres américaines et françaises. En effet, en 1987, R. Elston avait comparé la sensibilité de deux souches d'huîtres américaines vis-à-vis du parasite responsable du "micro-cell disease" et assimilé à *Bonamia ostreae* sur la

base de données morphologiques et plus récemment de comparaisons antigéniques. Il avait basé ses expériences sur des infections par proximité et arrivait à la conclusion que la souche dite Washington, originaires d'une zone d'endémie aux USA, était résistante vis-à-vis de *B. ostreae* (Aquaculture, 1987, 64:237-242).

Sur la base de ces résultats, plusieurs ostréiculteurs américains avaient entrepris des démarches pour commercialiser des huîtres "Washington" à des écloséries françaises qui étaient prêtes à établir des contrats et à importer des géniteurs. Ce type de transfert présentait le risque d'introduire une nouvelle souche de *Bonamia* puisque les huîtres "Washington" sont porteuses de parasites. Il faut rappeler que l'origine de la bonamiose en France a été très probablement liée à des introductions de naissain américain. L'introduction d'une nouvelle souche de parasite pouvait conduire à une nouvelle épidémie. Par ailleurs, l'analyse des résultats de R. Elston pouvait être différente de celle qu'il avait faite, et aboutir alors à considérer qu'il avait en fait comparé une souche particulièrement sensible (Casco) avec une souche de sensibilité normale (Washington). En effet, les taux d'infection de la souche Casco étaient extraordinairement élevés pour des infections par proximité. Avant d'émettre un avis sur le caractère judicieux ou risqué et inopportun de l'introduction d'huîtres "Washington" en France, une expérimentation a été programmée avec Ralph Elston et Dominique Hervio aux USA. L'objectif de cette expérience était de comparer au laboratoire la sensibilité de la souche "Washington" avec celle d'huîtres provenant de l'Etang de Thau et exemptes de parasites. Les infections expérimentales ont été réalisées avec des parasites de souches française, purifiés sur place et injectés selon le protocole récemment mis au point, à raison de 5000 ou 50000 parasites par huître. Après 8 mois d'expérience, il est apparu que les taux d'infection étaient tout à fait similaires pour les deux souches d'huîtres, américaine/Washington et française/Thau. Sur la base de ces résultats il n'y a pas eu d'autorisation d'importation d'huîtres américaines.

A ce jour, la reproduction de la bonamiose nécessite d'être optimisée, par exemple en substituant la valvotomie partielle par une anesthésie des huîtres à l'aide de chlorure de magnésium à la concentration de 5% qui par balnéation provoque l'ouverture des animaux. D'autres sites d'injection, voire de perfusion, méritent aussi d'être testés. Quoiqu'il en soit, la reproduction de la bonamiose reste à ce jour un modèle à l'échelle de la pathologie des invertébrés marins dans leur ensemble.

Divers

Des données moins sophistiquées ont été acquises sur la reproduction de la néoplasie hémocytaire (32) et de la rickettsiose (27).

Des essais préliminaires d'infection d'embryons de *Pecten maximus* par sa rickettsie ont été réalisés avec Jean-Paul Cadoret (données non publiées) sur la base de microinjections de rickettsies purifiées dans des larves trochophores. Les rickettsies ont été détectées un jour plus tard en immunofluorescence dans les tissus larvaires.

Par ailleurs, il faut mentionner les résultats très simples qui ont consisté à infecter expérimentalement l'artémie, *Artemia salina*, avec *Fusarium solani*, agent pathogène pour la crevette *Penaeus japonicus*. Ces essais avaient pour but de pouvoir disposer au laboratoire

d'un modèle d'étude des mycoses et de leur traitement, en tant que système alternatif à l'utilisation de crevettes. En effet, la facilité d'obtention et de maintien des artémies dans n'importe quel laboratoire confère à ces animaux un statut potentiel d'hôte expérimental qu'il sera intéressant d'explorer pour d'autres maladies, en particulier les viroses de crevettes.

1.2. Infection de cellules et modélisation *in vitro* (33)

Du point de vue des études de pathologie, la modélisation *in vitro* de systèmes hôte-pathogène est primordiale pour aborder à l'échelle cellulaire et moléculaire les modalités de développement et de réplication des agents pathogènes intracellulaires, mais aussi pour étudier les moyens d'inhiber ces agents par le biais de la transformation génétique. Il faut rappeler que les agents pathogènes intracellulaires sont les plus nombreux et les plus importants chez les mollusques et les crevettes. En pratique, il s'agit de développer des cultures de cellules sensibles et permissives pour les agents pathogènes, et ensuite d'essayer de les infecter.

Du point de vue de l'immunologie, la modélisation *in vitro* de systèmes hôte-pathogène concerne la culture d'hémocytes qui sont considérées comme les cellules effectrices de la réponse immunitaire. Cet aspect sera présenté dans la partie suivante relative aux travaux en immunologie.

Chez les insectes et quelques autres groupes d'invertébrés, la culture de cellules est un domaine de recherche déjà ancien, initié dans les années soixante aux USA par des scientifiques comme Grace et Maramorosch, et en France par Vago et son équipe. Des dizaines de lignées cellulaires d'insectes holométaboles ont été établies à partir de différents tissus, en général peu différenciés comme des tissus conjonctifs, ou totipotents comme les tissus embryonnaires. Le succès de ces travaux relatifs à la culture de cellules d'insectes est assurément lié à la forte mobilisation de scientifiques sur ce thème et à des caractéristiques physiologiques, par exemple la stimulation de la croissance et de la division cellulaire en réponse à des facteurs du serum de vertébrés. Par contre, quelques lignées seulement ont été établies pour des insectes hémimétaboles ou d'autres invertébrés, aucune lignée n'ayant pu être établie pour les mollusques marins et les crustacés.

Les premiers travaux significatifs sur la culture de cellules de mollusques ont été réalisés en France dans l'équipe de C. Vago, essentiellement par Francois Cousserans dans les années quatre-vingt, et ensuite de façon ponctuelle par quelques biologistes américains. Les nombreux micro-organismes et protozoaires qui contaminent la majorité des organes des mollusques bivalves se sont révélés constituer un problème majeur et difficile à résoudre pour l'établissement de primocultures. De même, les tissus embryonnaires sont difficiles à aseptiser et les élevages axéniques sont délicats. Par ailleurs, la multiplication des cellules en primoculture s'est avérée extrêmement faible, indiquant peut être l'inadéquation des milieux de culture.

Concernant les cellules de crustacés, des tentatives de primocultures ont été réalisées à l'URPIGM à partir de tissus larvaires d'artémies provenant de cystes préalablement désinfectés. Différents milieux classiques ont été testés sans révéler d'effets positifs sur

l'évolution des cultures. Les protocoles empiriques d'établissement de lignées cellulaires à partir de primocultures se sont avérés efficaces chez les insectes holométaboles mais ne semblent pas pouvoir être simplement extrapolés aux crustacés. Il faut noter que pour la majorité des agents pathogènes de crevettes, les cellules cibles sont l'hépatopancréas et les branchies qui sont des organes fortement contaminés par des protozoaires et des micro-organismes, ce qui s'est traduit dans nos essais par des mises en culture constamment contaminées. Par ailleurs la différenciation de ces cellules confère à leur culture un caractère extrêmement délicat. Quelques essais ont pu être effectués avec du tissu conjonctif associé aux ovaires, car ce type cellulaire a souvent conduit à l'établissement de lignées chez les insectes. Des primocultures avec des migrations cellulaires ont été observées mais les difficultés d'approvisionnement en crevettes n'ont pas permis d'explorer correctement cette voie.

Dans ce contexte peu encourageant, les travaux de primocultures de différents organes et de tissus embryonnaires qui ont été réalisés pendant quelques temps à l'URPIGM ont été focalisés sur la culture de tissus cardiaques et d'hémocytes. En effet, ceux-ci ont pu être régulièrement mis en culture sans problème de contamination, et ce, pour diverses espèces de mollusques chez lesquels la cavité péricardique ou un sinus sanguin sont facilement accessibles pour effectuer les prélèvements d'hémolymphe.

Système in vitro hémocyte-Bonamia (34-35)

Les travaux sur la culture d'hémocytes ont été approfondis dans le cas de l'huître plate, *Ostrea edulis*, car les hémocytes correspondent aux cellules hôtes du protozoaire *Bonamia ostreae*. La mise en culture d'hémocytes, associée à la disponibilité de suspensions purifiées de parasites, a permis d'établir un système *in vitro* pour entreprendre l'étude des interactions hôte-pathogène à l'échelle cellulaire et moléculaire.

Grâce au système d'infection de primocultures d'hémocytes avec des parasites purifiés, il a été possible de montrer que tous les types hémocytaires d'*O. edulis* pouvaient être infectés. Ces observations en microscopie photonique ont été vérifiées en microscopie électronique afin d'identifier sûrement les types hémocytaires.

Ce système *in vitro* a été ensuite extrapolé aux hémocytes de *Crassostrea gigas*, qui est naturellement résistante à *Bonamia*, et que nous avons montrée être aussi résistante à des injections de parasites purifiés. Sur la base de ces résultats *in vivo*, il avait été envisagé que la barrière de spécificité parasitaire vis-à-vis de *Bonamia* puisse se situer au niveau des interactions membranaires entre les hémocytes de *C. gigas* et le parasite. Les expérimentations *in vitro* ont révélé que les taux et degrés d'infection des hémocytes sont en fait identiques pour *O. edulis* et *C. gigas*. La résistance de *C. gigas* vis-à-vis de *B. ostreae* doit donc être liée à des processus intrahémocytaires qui mériteront d'être étudiés. Ce système d'étude *in vitro* a aussi permis de préciser les modalités de pénétration du parasite, qui correspond à une phagocytose par l'hémocyte avec participation du parasite.

2. Immunologie (52)

Lors de l'initiation de ce programme, les connaissances acquises en immunologie des mollusques et des crevettes se limitaient essentiellement à des descriptions des hémocytes. Diverses hypothèses avaient été avancées sur la filiation des types cellulaires qui étaient alors reconnus sur la seule base de critères morphologiques ultrastructuraux. Quelques données concernaient les hémogrammes, mais leur fiabilité était limitée par la difficulté à identifier les types hémocytaires en microscopie photonique. Enfin, quelques travaux avaient été entrepris pour mettre en évidence des activités de type lysosyme ou anti-virale.

Par référence à l'immunologie des vertébrés, l'identification des cellules immunitaires est primordiale pour ensuite développer des études sur les capacités fonctionnelles des différents types cellulaires et sur les phénomènes de coopération cellulaire dans les processus anti-infectieux. L'introduction de marqueurs antigéniques grâce à la préparation d'anticorps monoclonaux a profondément marqué les travaux en immunologie fondamentale et appliquée chez l'homme. Dans la perspective de commencer à identifier de tels marqueurs pour les cellules immunitaires et des composants de l'hémolymphe de mollusques et de crevettes, des anticorps monoclonaux ont été préparés selon la technique d'hybridation lymphocytaire. La caractérisation antigénique des hémogrammes est en effet un élément essentiel pour entreprendre des travaux d'immunologie clinique, en particulier pour déterminer les hémogrammes d'animaux en bonne conditions et reconnaître les anomalies susceptibles d'indiquer des états d'immunodéficience d'origines diverses. Les causes d'immunodéficience peuvent être liées à des mauvaises conditions d'élevage ou à des modifications environnementales, naturelles ou liées aux activités humaines. L'acquisition de ce type de données sur l'état immunitaire apparaît aussi essentielle pour reconnaître des processus pathologiques non-infectieux et susceptibles de faciliter des infections. Enfin, ces travaux ont été motivés par l'intérêt d'étudier les possibilités d'immunostimulation des animaux en élevage.

En parallèle à la caractérisation antigénique des hémogrammes, il est apparu important d'essayer de développer une technique permettant d'estimer individuellement les capacités fonctionnelles des cellules immunitaires des mollusques et des crevettes. Ce critère fonctionnel d'estimation de l'état immunitaire des animaux pourrait compléter les données relatives à leur hémogramme et affiner l'identification d'anomalies liées aux conditions environnementales d'élevage et de milieu.

Enfin, l'étude de facteurs immunitaires humoraux a juste été abordée, initialement lors de la préparation d'anticorps monoclonaux. Ensuite, des activités susceptibles de neutraliser des virus ont été recherchées, ceci en utilisant un système hétérologue correspondant à un bactériophage. Cette approche hétérologue a été aussi retenue dans l'étude d'effecteurs immunitaires provenant d'autres organismes.

2.1. Caractérisation antigénique de l'hémolymphe

Hémocytes de la moule Mytilus edulis (36)

Des anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes de moules ont été produits par hybridation lymphocytaire. Sur la base de leurs profils d'immunomarquage en microscopie photonique et électronique, et des profils immunoélectrophorétique en Western-blot, 4 groupes d'anticorps ont été identifiés.

Dans le premier groupe se trouve un anticorps monoclonal qui réagit spécifiquement avec des granulocytes basophiles contenant de petits granules et qui reconnaît deux protéines de 67 et 100 Kd.

Les anticorps monoclonaux des groupes 2 et 3 réagissent avec une différence d'intensité vis-à-vis d'éléments cytoplasmiques des granulocytes basophiles et éosinophiles et ils sont spécifiques de protéines de 72 ou 67 Kd.

Le groupe 4 correspond à un anticorps réagissant toujours vis-à-vis des granulocytes éosinophiles et à des degrés variables avec les granulocytes basophiles, ce qui suggère que cet anticorps reconnaisse un antigène de différenciation.

Cette collection d'anticorps monoclonaux a ouvert la voie à la caractérisation antigénique de sous-populations d'hémocytes de *Mytilus edulis*, ceci en complément des critères morphologiques. Par ailleurs, ces anticorps constituent des réactifs utilisables chez d'autres espèces de moules, *M. galloprovincialis*, *M. californiensis* et *M. trossulus*, car ils réagissent selon des profils de marquages tout à fait similaires. Les anticorps du groupe 2 réagissent aussi avec des hémocytes de la coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus*.

Il faut indiquer qu'une collection de 21 anticorps monoclonaux avait été préparée pour l'hémolymphe de l'huître japonaise *Crassostrea gigas*. Quatre anticorps correspondaient à des antigènes pan-hémocytaires et 17 discriminaient des sous-populations hémocytaires. Parmi ces derniers, 7 réagissaient avec des épitopes strictement cellulaires et les 10 autres réagissaient aussi avec des composants extrahémocytaires. La production de ces anticorps avait été annoncée en 1991 lors d'une communication à un congrès. Ces résultats n'ont pas été publiés ultérieurement en raison de la perte accidentelle des hybridomes congelés lors du déménagement de l'unité de La Tremblade à Montpellier.

Hémolymphe de la crevette Penaeus japonicus (37)

Des anticorps monoclonaux ont été préparés vis-à-vis des constituants de l'hémolymphe de *P.japonicus*. La sélection des hybridomes a été basée sur un test d'immunofluorescence effectué sur des primo-cultures afin d'accroître la probabilité de détection d'anticorps spécifiques de molécules secrétées. Selon leur réactivité, les anticorps se répartissent dans 3 groupes.

Le groupe 1 regroupe 4 anticorps spécifiques d'épitopes pan-hémocytaires qui correspondent à une protéine de 170 Kd. Cette protéine est à la fois présente dans le cytoplasme et le plasma.

Le groupe 2 correspond à deux anticorps spécifiques de sous-populations d'hémocytes qui peuvent par ailleurs être séparées par centrifugation isopycnique. L'Acm 40E2 reconnaît des cellules granuleuses et une protéine de 142 Kd présente dans le plasma. L'Acm 40E10 reconnaît les cellules semi-granuleuses et les petites cellules hyalines. Cet Acm immunoprécipite des protéines de 27, 66, 150 et 250 Kd qui sont secrétées par les hémocytes et pourraient correspondre aux sous-unités d'une hémagglutinine.

Les Acm du groupe 3 réagissent avec des protéines sériques, l'une de 180 Kd pouvant être le coagulogène, et l'autre de 75 Kd s'est avérée être l'hémocyanine.

Compte tenu de leur réactivité vis-à-vis des constituants de l'hémolymphe de deux autres espèces, *P. vannamei* et *P. indicus*, cette collection d'anticorps pourra aussi être utilisée dans des études du système immunitaire de ces deux espèces de crevettes qui sont très importantes en aquaculture.

2.2. Phagocytose et chimioluminescence

Chez les vertébrés, la phagocytose par les cellules macrophages a été associée à leur activité microbicide qui repose sur un système indépendant de l'oxygène et sur un métabolisme oxydatif. Celui-ci est caractérisé par la production de métabolites oxygénés qui réagissent avec les éléments phagocytés par le biais de processus d'oxydo-réductions qui sont associés à la génération de photons. Ce phénomène de production de lumière peut être détecté en chimioluminescence. La technique de chimioluminescence apparaissait donc intéressante pour étudier les mécanismes microbicides et tumoricides des hémocytes de mollusques et de crevettes. Une attention particulière a été portée à la mise au point d'un protocole adapté à l'analyse individuelle de plusieurs échantillons sans sacrifice de l'animal. Dans ces conditions, la chimioluminescence devait permettre d'estimer individuellement l'état immunitaire d'animaux et d'effectuer des comparaisons, par exemple en fonction des conditions d'élevage. De plus, il serait possible d'étudier et de comparer *in vitro* les activités de chimioluminescence pour des échantillons ayant subi différents traitements mais provenant d'un même animal, ceci afin d'intégrer d'éventuels phénomènes de variabilité individuelle.

Mollusques (38,39)

Le processus de phagocytose et le métabolisme oxydatif des hémocytes ont été étudiés initialement chez les huîtres, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, et ensuite chez la moule *Mytilus edulis* et la coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus*. La technique de chimioluminescence basée sur l'utilisation du luminol, a été mise au point en optimisant les différents paramètres expérimentaux qui se sont révélés extrapolables d'une espèce à l'autre.

Le prélèvement de l'hémolymphe avec une dilution instantanée au 1/2 dans une solution modifiée d'Alsever (SAM) a permis d'éviter l'agrégation des hémocytes, et consécutivement, leur stimulation immédiate. Dans cette solution, il a été montré que les hémocytes sont dans un état quiescent qui est réversible dès que cette solution est diluée avec de l'eau de mer filtrée et stérilisée.

Le protocole de chimioluminescence a été standardisé pour un nombre de 200000 hémocytes, ce qui permet aisément de réaliser plusieurs tests à partir d'un échantillon d'hémolymphe prélevé sans traumatisme pour l'animal.

Le métabolisme oxydatif des hémocytes de mollusque a été étudié en chimioluminescence à l'aide de différentes molécules connues pour leur effet inhibiteur spécifique d'enzymes ou de produits impliqués dans le métabolisme oxydatif des macrophages de vertébrés.

Des analyses comparatives de chimioluminescence ont mis en évidence une importante variabilité individuelle, indépendante du nombre d'hémocytes circulants qui est le même pour tous les échantillons.

Par ailleurs il a été montré que les hémocytes maintenus en culture restent en grande majorité viables pendant plusieurs jours mais perdent totalement leur activité de chimioluminescence en moins de 6 heures, alors que pendant plusieurs dizaines d'heures ils sont encore capables de phagocyter. De plus, il s'est avéré que les activités de chimioluminescence les plus élevées correspondent à des cultures d'hémocytes dans de l'eau de mer (40).

Chez la moule, la variabilité individuelle de l'activité de chimioluminescence a été analysée plus en détail, en étudiant l'activité de sous-populations hémocytaires séparées par centrifugation isopycnique et caractérisées à l'aide de l'anticorps monoclonal 13B9 qui est spécifique des granulocytes basophiles. Les granulocytes éosinophiles ont été associés à l'activité de chimioluminescence. Ces données suggèrent que les granulocytes éosinophiles correspondent au type cellulaire le plus mature et le plus actif, ce qui est en accord avec les données antigéniques sur la filiation des hémocytes.

Crustacés

Compte tenu des résultats extrêmement intéressants acquis avec la chimioluminescence pour les hémocytes de mollusques, cette technique a été explorée pour étudier la phagocytose et les processus microbicides dépendants de l'oxygène chez les crevettes. La disponibilité de *Penaeus japonicus* en France a conduit à mettre au point le protocole expérimental avec les hémocytes de cette espèce, et il devrait être facile de l'extrapoler aux autres espèces économiquement importantes. Les tests sont pratiqués en routine avec 500000 hémocytes par échantillons, ce qui permet comme chez les mollusques de réaliser plusieurs analyses à partir de chaque échantillon individuel d'hémolymphe.

Effets d'antibiotiques et de polluants sur l'activité de chimioluminescence des hémocytes (41)

Une application majeure de la chimioluminescence en aquaculture consisterait à pouvoir détecter chez des animaux toute anomalie de leur état immunitaire, notamment des déficiences causées par des molécules toxiques. Dans cette optique, des analyses *in vitro* ont

été effectuées avec des antibiotiques couramment utilisés en aquaculture et des polluants fréquemment identifiés dans des zones d'élevages. Ainsi, il a été montré que le mercure et le TBT (tributyltin), aux concentrations égales et supérieures respectivement à 0.1 ppm et à 1 ppm, provoquent une très nette diminution ou une inhibition de l'activité de chimioluminescence des hémocytes d'huître. En ce qui concerne les antibiotiques testés, il faut noter que la thrimethoprim-sulfadimidine provoque une réponse accrue en chimioluminescence.

Etude in vitro des activités de phagocytose et de chimioluminescence des hémocytes vis-à-vis d'agents pathogènes et de cellules tumorales.

Plusieurs systèmes ont été étudiés *in vitro* et ont conduit à montrer que des agents pathogènes ou des cellules tumorales pouvaient être phagocytés sans déclenchement du métabolisme oxydatif des hémocytes.

- Rickettsies (42)

Sur la base de cultures d'hémocytes de *Pecten maximus* et de leur infection expérimentale avec des rickettsies purifiées, il a été montré que celles-ci sont phagocytées mais ne déclenchent pas le mécanisme oxydatif des hémocytes, puisqu'aucune activité de chimioluminescence n'a été notée. De plus, il a été établi que les rickettsies interfèrent avec le métabolisme oxydatif des hémocytes lorsque ceux-ci ont été préalablement stimulés avec des particules de zymosan. Ces données suggèrent que les rickettsies présentent certaines adaptations à l'encontre du système immunitaire de leur hôte.

- *Bonamia ostreae* (40)

Comme dans le cas de la rickettsie, il a été montré lors d'infections expérimentales de cultures d'hémocytes que le protozoaire *Bonamia ostreae* présente des adaptations vis-à-vis du système immunitaire de son hôte *Ostrea edulis*, mais aussi de celui d'une espèce non sensible, *Crassostrea gigas*. En effet, pour les deux espèces d'huîtres, il a été établi que les hémocytes phagocytent le parasite sans que soit déclenché le métabolisme oxydatif, puisqu'aucune activité de chimioluminescence n'a été enregistrée. Ces résultats sont très intéressants pour comprendre la capacité du parasite à infecter les hémocytes de son hôte. Par contre, la résistance de l'huître *C. gigas* à *Bonamia* ou l'incapacité de celui-ci à se développer dans les hémocytes de cette espèce, doivent impliquer d'autres systèmes métaboliques.

- Hémocytes tumoraux (43)

La déficience fonctionnelle des hémocytes tumoraux a été montrée en histologie et en chimioluminescence. Ces cellules ont perdu leur capacité de phagocytose et, subséquemment, leur activité de chimioluminescence.

Les hémocytes normaux sont capables de phagocyter les hémocytes tumoraux sans que soit impliqué leur métabolisme oxydatif. Cette reconnaissance des cellules tumorales semble être liée aux antigènes spécifiques du processus de transformation, bien que des antigènes de sous-espèce puissent être en cause. En effet, les expériences ont été réalisées avec des hémocytes normaux de *Mytilus edulis* et des hémocytes tumoraux de *M. trossulus*, qui est maintenant considérée comme une sous-espèce, *M. edulis trossulus*.

2.3. Effecteurs "immunitaires" moléculaires.

Deux types d'effecteurs "immunitaires" moléculaires, homologues et hétérologues, ont été considérés en raison de leur application potentielle pour sélectionner des animaux résistants, soit par génétique classique en identifiant les animaux ayant un taux d'activité élevé d'un effecteur, soit par transformation génétique en transférant un gène homologue ou hétérologue.

Effecteur homologue: Mise en évidence d'activité neutralisante de virus (44)

L'identification de molécules microbicides, ou plus particulièrement antivirale, est un axe important en immunologie des invertébrés marins, compte tenu de la fréquence et de la gravité des viroses. Par ailleurs, des molécules microbicides et antivirales isolées chez des invertébrés marins pourraient avoir des applications en médecine.

L'absence actuelle pour les mollusques et les crevettes d'une souche virale disponible au laboratoire, a conduit à entreprendre des travaux en utilisant un système hétérologue correspondant à un coliphage qui est facile à titrer. Des travaux similaires avaient été effectués une vingtaine d'années plus tôt, mais ils présentaient des défauts expérimentaux ou n'avaient pas été poussés jusqu'à la caractérisation d'effecteur.

Plusieurs phages ont été testés afin de vérifier leur sensibilité aux conditions ionique et osmotique. Le coliphage T3 a été alors sélectionné et a permis de mettre en évidence un facteur neutralisant dans le sérum de l'huître *Crassostrea gigas*. Ce facteur neutralisant est quantitativement variable d'un individu à l'autre, et il est inductible en effectuant des ponctions successives d'hémolymphe. Sur la base de tests biochimiques avec des inhibiteurs, il a été établi que ce facteur neutralisant est lié à une activité sérine protéase. Il reste à préciser si cette enzyme est directement impliquée dans la neutralisation, par exemple en modifiant des protéines de la capsid virale, ou indirectement en activant des processus cytotoxique.

*Effecteurs hétérologues: mise en évidence d'activités inhibitrices vis-à-vis de *Bonamia ostreae*.*

En utilisant le modèle *Bonamia*, deux types d'effecteurs hétérologues ont été étudiés du point de vue de leur effet inhibiteur.

- Effet du peptide antimicrobien magainine 1 (45)

Les magainines sont des peptides de 23 acides aminés qui ont été isolés de la peau de crapaud et qui ont une activité microbicide vis-à-vis de bactéries, de champignons et de nombreux protozoaires de différents phylums. Des expériences ont été entreprises pour analyser l'utilisation potentielle de magainines vis-à-vis d'agents pathogènes de mollusques ou de crevettes. Ces expériences ont été inspirées des études sur la transformation génétique des plantes avec des gènes de cecropine et magainine, et des travaux réalisés avec des parasites transmis par des moustiques et avec des bactéries de poissons. Dans cette perspective, le système *in vitro* *Bonamia*-hémocyte était un modèle de choix pour considérer simultanément les effets de la molécule sur l'agent pathogène et sur la cellule hôte.

Sur la base de tests de viabilité et d'examens ultrastructuraux, il a été montré que la magainine 1 a sur *B. ostreae* un effet cytocide qui est dépendant de la concentration. A la concentration de 500 ppm, 94% des parasites sont tués en une heure, alors que les hémocytes d'*Ostrea edulis* sont intacts et conservent leurs activités de phagocytose et de chimioluminescence. Cette activité microbicide *in vitro* de la magainine 1, spécifiquement vis-à-vis du parasite et sans effet pour les cellules hôtes, confère à cette molécule un intérêt potentiel pour la transformation génétique des mollusques.

- Effet d'anticorps monoclonaux (résultats préliminaires)

La disponibilité d'anticorps monoclonaux spécifiques de *Bonamia ostreae* d'une part, et le système d'infection *in vitro* de primoculture d'hémocytes d'autre part, ont permis d'explorer l'utilisation d'Acm en tant qu'effecteurs hétérologues pour inhiber le développement d'agents pathogènes. Ces travaux se réfèrent aux données relatives à la transformation génétique des plantes avec des gènes d'immunoglobulines qui sont spécifiques de virus et qui confèrent à la plante une résistance au virus. Parmi les Acm qui ont été produits, le 20B2 et le 15C2 reconnaissent des épitopes localisés à la surface du parasite. Quelques expériences *in vitro* ont été réalisées pour analyser l'effet d'une pré-incubation de ces anticorps avec les parasites sur la pénétration de ces derniers dans les hémocytes. Les résultats préliminaires ont semblé indiquer que les taux d'infection soient légèrement réduits, mais d'autres expériences sont nécessaires pour analyser statistiquement les taux et degrés d'infection en fonction d'un plus grand nombre de conditions expérimentales.

3. Technologie de transformation génétique

La transformation génétique a permis de sélectionner de nombreuses souches de plantes résistantes à divers agents pathogènes. Selon les cas, la résistance résulte de l'expression de gènes viraux selon le concept de "pathogen-derived resistance", de l'expression de séquences anti-sens, ou de l'expression de gènes immunitaires homologues ou hétérologues. Cette stratégie de sélection, qui est primordiale en agriculture pour les plantes qui ne peuvent pas être vaccinées, a été appliquée chez les mammifères et les oiseaux en dépit de la possibilité de vaccination. Plus récemment, la transformation génétique a été prise en compte en entomologie médicale pour sélectionner des souches transgéniques d'insectes vecteurs qui ne pourraient pas transmettre l'agent pathogène. Cette stratégie, introduite par L. Miller avec des travaux sur le moustique *Anopheles gambiae* vecteur du paludisme, est maintenant largement soutenue par des organisations internationales telle que l'OMS. Elle est de plus en plus étendue à d'autres arthropodes vecteurs et à des insectes d'intérêt agricole.

C'est dans ce contexte que des travaux ont été entrepris sur la transformation génétique des mollusques et des crevettes d'intérêt aquacole, en s'attachant au développement des technologies de base qui correspondent à la transfection des embryons et à l'analyse de promoteurs.

3.1. Techniques de transfection d'embryons

Microinjection (46,47)

La microinjection est une technique de choix pour introduire de l'ADN dans des embryons car il est possible de visualiser les opérations. Initialement, les expériences de microinjections ont été réalisées avec un fluorochrome. Celui-ci a permis d'estimer les taux d'injection et de survie en fonction des paramètres de fabrication des micro-instruments pour maintenir l'embryon et l'injecter. Cette technique s'est avérée relativement facile à maîtriser par de nouveaux expérimentateurs. Par contre, le rythme de microinjection est assez lent, ce qui limite le nombre d'embryons microinjectés à quelques dizaines ou centaines par jour. En pratique, la microinjection peut donc être appliquée à l'analyse de promoteurs sur la base de l'expression transitoire de gène reporteur. Par contre, la microinjection est inadaptée pour entreprendre des travaux de transfert de gènes, à moins de disposer de systèmes de transformation permettant des taux d'intégration élevés, ce qui n'est pas actuellement le cas chez les invertébrés à l'exception de la drosophile chez laquelle le transposon P est extrêmement efficace.

Biolistique (48,49)

Cette technique consiste à bombarder des cellules, des tissus ou des embryons avec des microparticules préalablement couvertes d'ADN. Les paramètres de biolistiques sont extrêmement nombreux et nécessitent de multiples expérimentations pour déterminer des conditions efficaces et ensuite les optimiser. Cette optimisation repose généralement sur l'analyse de l'expression transitoire d'un gène reporteur. Ceci impose de connaître au préalable un promoteur efficace dans le système biologique étudié ou d'utiliser un promoteur ubiquitaire potentiellement efficace.

La biolistique a été développée dans un premier temps pour transférer l'embryon du moustique *Anopheles gambiae*. La technique correspondant à l'équipement commercialement disponible a été expérimentée et validée. Cette technique, dite "dry biolistics" parce que les particules couvertes d'ADN sont séchées sur un support avant d'être projetées sur les embryons, a été ensuite modifiée pour conserver les particules en suspension aqueuse. Cette nouvelle technique, dite "aqueous biolistics" s'est avérée environ 500 fois plus performante que la technique "dry". Elle permet de transférer en quelques minutes des dizaines de milliers d'embryons.

La "dry" biolistique a été, dès sa mise au point chez le moustique, appliquée à la transfection de l'embryon d'artémie. Cette espèce a été utilisée en raison de sa disponibilité sous forme de cystes commercialisés. Des travaux sur la transformation génétique de l'artémie seraient utiles pour créer des souches ayant des caractères particuliers. De plus, des travaux sur l'artémie ont un caractère modèle pour les autres crustacés, en particulier les crevettes pénéides qui sont difficiles à maintenir dans un laboratoire et dont la durée des générations est incomparablement plus longue. Ces travaux ont permis d'établir l'efficacité du promoteur hétérologue hsp 70 de drosophile (heat shock protein) pour contrôler l'expression de gènes chez l'artémie. Ce promoteur devrait aussi être efficace chez les crevettes pénéides.

L'application de la biolistique à la transfection des embryons de mollusques a été plus tardive et directement basée sur la méthode dite "aqueuse", mise au point avec l'embryon de moustique. Il a été très récemment démontré que le protocole de biolistique développé pour l'embryon de moustique est aussi adapté à la transfection en masse des embryons de moules et d'huîtres. Cette démonstration a reposé sur l'expression transitoire de gène reporteur.

3.2. Analyse de promoteurs hétérologues

Sur la base de l'expression transitoire du gène de la luciférase de la luciole, deux promoteurs hétérologues ont été montrés fonctionnels chez les invertébrés marins étudiés. Le caractère inductible du promoteur hsp 70 de drosophile a été vérifié en estimant les taux d'expression de luciférase consécutivement à divers chocs thermiques. Le promoteur viral du cytomegalovirus est aussi efficace chez les mollusques.

CONCLUSIONS ET FUTURES STRATEGIES DE RECHERCHES

Les travaux présentés dans ce document ont tous été motivés par l'idée de contribuer à la pérennité et au développement de l'aquaculture des mollusques et des crevettes. Alors que les aspects zootechniques des élevages d'invertébrés marins étaient, et sont toujours, énormément étudiés dans des centres de recherches et dans de nombreuses entreprises, les problèmes de pathologie étaient très peu étudiés, essentiellement par manque de laboratoires et d'équipes spécialisés. La création d'un laboratoire de recherches, à l'initiative de l'ISTPM puis de l'IFREMER, a été cruciale. Ainsi, il devenait possible d'essayer de dépasser le stade descriptif des maladies, subies avec un certain fatalisme, et d'amorcer des recherches orientées vers le contrôle des maladies. Il faut noter que ce projet de l'IFREMER est unique à l'échelle internationale en considérant les moyens humains et techniques qui y ont été consacrés, et surtout en considérant la durée et la régularité des moyens financiers qui ont été accordés pour assurer la réalisation du programme.

Ce programme a été au maximum conçu et développé en concertation avec les collègues zootechniciens et aquaculteurs, et ce dans une double perspective.

D'une part, il s'agissait d'essayer de mettre en place dans les meilleurs délais l'ensemble des techniques et outils classiques de la pathologie qui pouvaient permettre à court terme la prévention des maladies, d'où la mise en place d'une stratégie de recherches sur l'identification et le diagnostic, et de façon annexe le traitement.

D'autre part, il importait d'ouvrir la voie à l'immunologie et à la génétique afin de pouvoir à moyen terme sélectionner des souches résistantes et, ainsi, renforcer la stratégie de prévention et de contrôle des maladies de mollusques et de crevettes.

Stratégie à court terme

Identification des étiologies

Mollusques

L'identification de l'étiologie des maladies de mollusques et de crevettes est un domaine dans lequel il faut distinguer les maladies infectieuses et non-infectieuses.

En ce qui concerne les maladies infectieuses des mollusques il y a maintenant plusieurs équipes de pathologistes dans le monde dont l'activité est largement focalisée sur l'identification des agents pathogènes et qui disposent pour cela des équipements de microbiologie et de microscopie photonique et électronique.

En France, le laboratoire IFREMER de La Tremblade a été impliqué dans l'identification de divers agents pathogènes. Il est maintenant animé par Tristan Renault et il constitue un élément-clé dans l'identification des maladies des cheptels français. De plus, d'autres scientifiques, tels que Michel Comps (IFREMER Palavas) ou Christine Paillard (Brest), sont des partenaires essentiels compte tenu de leur extrême compétence.

En Europe, les équipes espagnoles de Vigo et Saint-Jacques de Compostelle sont de plus en plus performantes car elles acquièrent progressivement les équipements et le savoir-faire dans les différentes techniques d'identification. A l'étranger, il faut citer les équipes canadiennes sur les côtes est et ouest, animées respectivement par Sharon McGladdery et Suzan Bower. En Australie, l'équipe animée par Bob Lester est réellement excellente dans l'identification des agents pathogènes mais aussi dans le développement de nouvelles techniques de diagnostic. Aux USA, plusieurs instituts sont impliqués dans ce domaine, en particulier le VIMS (Virginia Institute of Marine Sciences) animé par Frank Perkins et le MBI (Marine Biotechnology Institute) animé par Rita Colwell. En parallèle, plusieurs scientifiques américains, notamment Ralph Elston qui est un éminent spécialiste, travaillent de façon conjoncturelle selon le système de grant qui prévaut dans ce pays.

Aujourd'hui, il peut être considéré qu'un réseau a été établi, même si les liens sont informels entre ces pathologistes qui sont tous des généralistes. Une évolution intéressante de ce réseau consisterait en la spécialisation des équipes sur un groupe donné d'agents pathogènes. Dans ces conditions, il deviendrait possible de se référer à des virologistes, des bactériologistes, etc...

Une spécialisation primordiale devra être faite sur les maladies non-infectieuses qui sont actuellement très mal identifiées, mais deviennent de plus en plus importantes en raison de l'altération du milieu marin en général, et des zones d'élevage en particulier. Il serait intéressant d'essayer d'organiser une équipe ou un réseau pluridisciplinaire, associant notamment l'anatomopathologie, l'immunopathologie, la physiopathologie, la toxicologie, l'écotoxicologie, la chimie. Les programmes soutenus par l'union européenne pourraient servir de cadre à l'élaboration d'un tel réseau.

Crevettes

Cette carence relative à la pathologie non-infectieuse est aussi valable pour l'aquaculture des crevettes, mais celle-ci souffre aussi énormément d'un manque de moyens pour identifier les maladies infectieuses, et ce pour deux raisons majeures. D'une part, l'aquaculture des crevettes est une activité récente, dont le développement a été certainement trop optimiste, ce qui a conduit à ne pas anticiper sur les risques d'épidémies et d'endémies. D'autre part, les pays producteurs sont en majorité des pays en voie de développement qui ne disposent pas d'infrastructure pour identifier des agents pathogènes.

Des erreurs ont été faites par le passé, et cela continue dans le présent, lorsque des projets de plusieurs dizaines de millions de dollars sont initiés sans que soit consacré le moindre crédit à l'organisation d'un laboratoire d'identification des agents pathogènes. Par exemple en Chine, les investissements ont été gigantesques et ont élevé ce pays au premier rang mondial, avec une production de crevettes d'environ 140000 tonnes. Actuellement, ce pays subit des pertes estimées à 70 %, sans être capable d'identifier les causes des mortalités et consécutivement d'organiser un plan d'intervention.

Un nombre beaucoup trop limité de scientifiques et d'équipes travaillent dans le domaine de la pathologie des crevettes. De plus, leur activité est souvent organisée dans une optique commerciale en intervenant en tant qu'experts et consultants. Ce système, au

demeurant très lucratif à l'échelle personnelle, a largement contribué à empêcher la formation de spécialistes locaux et la construction dans les pays producteurs des structures nécessaires pour prendre en compte rapidement les problèmes locaux des élevages. Un système de dépendance peu efficace s'est instauré, les producteurs faisant appel rarement et tardivement à un consultant-expert étranger qui apparaît comme le médecin "miracle". Afin de justifier leurs honoraires, les consultants se sont attachés à trouver des explications plus ou moins étayées et à préconiser des solutions difficiles à apprécier.

Cette situation a atteint un seuil tellement critique que des solutions urgentes sont recherchées dans certains pays par des associations de producteurs, et à l'échelle internationale par des organismes de coopération bi- et multi-latérale. Un projet concerne l'Equateur et mérite d'être mentionné. Sur la base d'une coopération bilatérale entre ce pays et la France, la formation doctorale de plusieurs étudiants a été organisée avec des Universités et l'IFREMER. Les formations sont faites en pathologie, mais aussi en immunologie et en génétique, et sont associées à des travaux de recherches développés avec le CENAIM (Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas) qui est dirigé par Jorge Calderon. Cette coopération est en phase d'extension régionale pour que des pathologistes d'autres pays latino-américains soient formés en pathologie au CENAIM.

En relation avec cette coopération, un projet a été élaboré sous l'égide du CENAIM et de la Chambre Nationale d'Aquaculture (CNA) et soumis à la CEE pour financement. Ce projet concerne la création d'un laboratoire de diagnostic des maladies de crevettes, ce laboratoire faisant partie d'un centre de diagnostic au service des producteurs. Ce laboratoire serait initialement organisé par trois scientifiques européens de niveau post-doctoral et spécialisés dans les différentes techniques et problématiques du diagnostic des maladies infectieuses et non-infectieuses. Ce laboratoire, qui disposerait sur place de l'ensemble des équipements nécessaires prendrait en charge à l'échelle nationale l'identification des étiologies et les contrôles zoosanitaires. Par ailleurs, il prendrait en charge la formation de pathologistes pour les autres pays producteurs et serait en étroite relation avec le groupe des pathologistes thaïlandais pour échanger les sondes moléculaires et les techniques de diagnostic.

Ce projet avec la CEE relatif aux activités de diagnostic est un élément d'un projet plus global sur la pathologie, l'immunologie et la génétique des crevettes pour lequel l'Equateur et la Banque Mondiale sont en pour-parlers et qui sera explicité ultérieurement.

Diagnostic et épidémiologie (50,53)

Au cours des dix dernières années, la réalisation de ce programme de l'IFREMER a permis de développer tous les aspects techniques et méthodologiques du diagnostic par sondes moléculaires, qu'il s'agisse des immunodiagnostic avec des anticorps polyclonaux et monoclonaux, ou des techniques d'hybridation et de PCR avec des sondes nucléiques et oligonucléotidiques. Il faut mentionner que ces méthodes sont applicables à tous les types d'agents pathogènes mais aussi à des maladies non-infectieuses, telles que des tumeurs.

La production commerciale de kits de diagnostic a été amorcée mais s'est trouvée alors en France et en Europe dans un contexte de marché immature. En effet, à la différence de la médecine ou de l'agriculture, le concept de prophylaxie basée sur des contrôles sanitaires est en aquaculture encore embryonnaire, dans les esprits, dans les textes et dans la pratique.

Aujourd'hui, l'élaboration d'une stratégie de contrôle et de prévention des maladies des invertébrés marins est du ressort des responsables de l'aquaculture, aux niveaux politiques, économiques et scientifiques d'une part, et aux niveaux nationaux et internationaux d'autre part. Jusqu'à un passé proche, ces responsables étaient confrontés au manque d'outils et de techniques pour mettre en place des mesures adaptées, ce qui n'est plus le cas maintenant. L'IFREMER devrait rapidement pouvoir jouer un rôle important dans la promotion de la stratégie de prévention des maladies basée sur le diagnostic, puisque les travaux ont émané à l'origine et en majorité de cet institut. D'autres pays performants pour leur capacité à créer de nouveaux marchés semblent être en train de prendre l'initiative, en particulier les USA qui commencent à déposer des brevets et des licences d'exploitation. Quelques soient les pays qui en prendront maintenant la direction, le diagnostic par sondes moléculaires devrait dans les prochaines années devenir un élément prépondérant dans toutes les phases des activités aquacoles, qu'il s'agisse du contrôle des maladies ou de celui des animaux, en termes d'état physiologique, de maturité sexuelle, de qualité des produits, etc... En effet, le diagnostic par sondes moléculaires correspond à de nombreux domaines qui sont en phase prospective et sont regroupés au sein des biotechnologies marines. Dans une conception classique des biotechnologies, il sera important de concevoir des systèmes miniaturisés et prêts à l'emploi qui soient réellement adaptés à l'identification des bactéries marines, comme cela a été fait avec les galeries de type API en santé humaine.

Il est important de noter que la disponibilité de ces outils de diagnostic, qui sont adaptables aux diverses activités des élevages aquacoles d'invertébrés marins, seront utiles pour optimiser les recherches expérimentales en zootechnie. Celles-ci sont orientées vers l'accroissement de la productivité et prennent en compte tout particulièrement l'amélioration des techniques pour limiter l'impact des agents pathogènes.

Traitements (52)

Au cours de ce programme les traitements ont été abordés de façon classique et mineure en raison des difficultés d'applications à des animaux essentiellement élevés en mer ou dans des bassins de grande surface, mais aussi en raison du choix limité de molécules utilisables. De plus, il importait de considérer les risques liés à l'utilisation d'antibiotiques, en termes de résidus et de résistance de souches. Ces limitations sont des éléments difficilement contournables, ce qui tend à considérer les traitements classiques comme un axe non prioritaire. Il sera peut être par contre important d'aborder les traitements en considérant les progrès en biotechnologie, par exemple ceux relatifs à la production de peptides microbicides qui ont été identifiés et clonés chez des insectes et qui sont des candidats pour des techniques alternatives de traitement.

Stratégie à moyen terme

Pathologie expérimentale *in vivo* et *in vitro*

Dans le cadre de ce programme, la pathologie expérimentale a été abordée *in vivo* et *in vitro* sur quelques modèles concernant essentiellement les mollusques, ceci en raison des

difficultés d'approvisionnement régulier en crevettes et de leur maintien en grand nombre au laboratoire en France. Des méthodologies d'infection expérimentale tout à fait originales ont été développées *in vivo* et *in vitro*. Ces méthodologies ont réellement ouvert plusieurs nouvelles voies de recherches qui concernent, plus ou moins directement, la sélection de souches résistantes.

Les travaux chez l'huître avec le parasite *Bonamia* ont permis d'introduire la notion de dose infectieuse, de comparer la sensibilité de souches géographiques et d'identifier des individus résistants à des infections massives. Le protocole d'infection, à partir de parasites purifiés et quantifiés, est maintenant utilisé dans le cadre d'un programme de sélection par génétique quantitative impliquant l'écloserie de La Tremblade et plusieurs stations côtières. Ce type de sélection de souche résistante sera relativement long et compliqué en raison de la non-connaissance des bases génétiques du phénotype résistante. De plus, cette sélection risque d'être confrontée à des problèmes de co-sélection de caractères défavorables. Néanmoins, et par référence à l'agriculture, des solutions doivent être espérées de cette approche expérimentale associée à la génétique quantitative.

L'extrapolation de ces premiers travaux à la sélection de crevettes résistantes, notamment à des virus, est une priorité pour l'aquaculture tropicale, d'autant plus que des données très encourageantes sont disponibles concernant les viroses d'insectes. Quelques soient les mécanismes moléculaires à la base de la résistance, la sélection de souches résistantes pourrait être aisément pratiquée à partir d'individus survivants à une épidémie. Actuellement, de tels animaux sont généralement sacrifiés, par exemple lors des opérations de vide sanitaire qui sont effectuées à la suite d'épidémie en écloserie. Des écloseries expérimentales sont évidemment nécessaires pour développer des travaux de génétique et ceux de pathologie expérimentale permettant d'exercer en permanence une forte pression de sélection. De plus, de telles écloseries doivent disposer de systèmes expérimentaux clos afin d'éviter le rejet d'agents pathogènes. Ces écloseries expérimentales devraient aussi être préférentiellement localisées en zones d'endémies pour éviter les risques d'introduction de maladie, ou bien en dehors de zone d'élevage. Le centre de CENAIM est évidemment un modèle et dans le cadre du projet CENAIM-Banque Mondiale, la sélection génétique basée sur la pathologie expérimentale constituera un axe d'activité.

La pathologie expérimentale *in vitro* est confrontée à un obstacle encore infranchi, et peut être pour longtemps infranchissable, à savoir la culture *in vitro* des cellules hôtes. En effet, jusqu'à ce jour, il n'a pas été possible de dépasser le stade des primocultures. La viabilité des cellules semble pouvoir atteindre quelques jours sur la base de tests d'intégrité membranaire, mais apparaît beaucoup plus courte sur la base de tests fonctionnels, telle que la chimioluminescence pour les hémocytes. C'est pourquoi, dans le cas des primocultures d'hémocytes infectés expérimentalement avec des parasites *Bonamia* purifiés, seules les interactions précoces entre la cellule hôte et le pathogène ont pu être étudiées. Ce modèle, qui apparaît très limité si on le compare aux modèles *in vitro* établis chez les vertébrés, est néanmoins un des plus élaborés à l'échelle des invertébrés en ce qui concerne les protozoaires.

Plusieurs axes de travail devraient être développés pour tenter de disposer de systèmes *in vitro* qui seraient extrêmement utiles pour détecter des agents et pour étudier leur réplication ainsi que les moyens d'inhiber cette réplication. Des travaux sur la composition des

milieux de cultures et l'identification des facteurs de croissance doivent être réalisés en exploitant l'ensemble des informations relatives à la culture de cellules animales. Depuis quelques années, un réseau a été établi et animé par Germaine Dorange de l'Université de Brest. Ce réseau a entrepris d'explorer et d'analyser de façon systématique tous les paramètres physico-chimiques et biochimiques susceptibles de favoriser la culture *in vitro* de cellules de mollusques. Concernant la culture *in vitro* de cellules de crevettes, qui s'apparentent aux insectes hémimétaboles, les recherches devraient être conçues en collaboration avec ce réseau et avec des spécialistes de la culture de cellules d'insectes hémimétaboles, et en intégrant les biologistes du centre IFREMER de Tahiti qui ont commencé à explorer ce sujet.

L'obtention de lignées cellulaires ne garantit pas pour autant de pouvoir cultiver *in vitro* des agents pathogènes car les cellules de ces lignées sont généralement peu différenciées, alors que les cellules hôtes sont des cellules différenciées. Une alternative à moyen terme, qui a été considérée dans le cadre du réseau "culture de cellules de mollusques", concerne la transformation génétique de cellules en primoculture par des oncogènes pour les immortaliser, ce qui chez les vertébrés a permis d'établir des lignées de cellules différenciées. Cependant, cette alternative nécessite des données préalables sur la technologie de transformation génétique et sur les oncogènes, et reste en partie dépendante de l'élaboration de milieux de culture adéquats.

Une autre alternative plus rapide permettrait d'éviter les difficultés relatives à la différenciation cellulaire et à l'élaboration des milieux de cultures. Il s'agit de l'embryoculture qui est largement utilisée pour cultiver des agents pathogènes de vertébrés et que C. Vago a développé avec J.M. Quiot et S. Paradis chez les insectes. En effet, dans le cas de l'embryoculture d'agents pathogènes de mollusques et de crevettes, la contrainte liée à la culture *in vitro* des embryons est inexistante puisque toute la technologie d'écloserie a été développée pour élever en masse des embryons dans de l'eau de mer. Le problème de la différenciation des cellules hôtes peut être évité si l'infection de l'embryon est précoce et préalable à la différenciation organique. L'embryoculture d'agents pathogènes de mollusques et de crevettes pourrait alors avoir comme seule contrainte la mise au point de méthode d'infection expérimentale non-traumatique pour les embryons. Dans le cadre de travaux préliminaires avec J. P. Cadoret, il a été montré que l'infection de larves trochophores de coquilles Saint-Jacques pouvait être réalisée par microinjection des rickettsies sans affecter la viabilité des animaux.

Une technique d'infection d'embryons qui devra aussi être explorée repose sur la biolistique. En effet, cette technique pourrait permettre d'infecter très rapidement des milliers d'embryons. D'ores et déjà, il a été montré que des microorganismes peuvent être introduits dans des cellules par bombardement. La méthode de biolistique "aqueuse" pourrait permettre de bombarder les embryons avec des rickettsies ou des virions, soit en suspension, soit adsorbés sur les particules par le biais d'anticorps. Dans le cas de certains virus, tels que les baculovirus et les densovirus dont les génomes sont infectieux, les infections pourraient être basées sur le bombardement d'ADN génomique. Dans ce cas, il serait aussi possible de co-introduire des oligonucléotides anti-sens pour analyser leur effet inhibiteur sur la réplication virale, ce qui permettrait d'anticiper sur leur utilisation en transfert de gènes.

Immunologie (52)

Les travaux réalisés au cours de ce programme sur l'immunologie des mollusques et des crevettes ont été particulièrement fructueux en termes de préparation de réactifs spécifiques des hémocytes et de développement de méthodologies adaptées à l'immunologie expérimentale. A cet égard, il convient de souligner l'originalité et l'importance de la contribution de l'unité au sein de la communauté des scientifiques concernés par l'immunologie des invertébrés, et d'indiquer le rôle majeur d'Evelyne Bachère dans l'animation de ce thème de recherche.

Grâce à ces réactifs et à ces méthodes, des données à caractère fondamental ont été acquises sur les hémocytes et leur métabolisme oxydatif associé à la phagocytose. Des applications pour l'aquaculture ont été envisagées et explorées. Ces applications concernent les moyens d'estimation de l'état immunitaire des animaux en élevage, ceci afin de pouvoir détecter précocement des anomalies et subséquemment d'anticiper sur le déclenchement de mortalités ou d'épidémies.

A l'aide des anticorps monoclonaux il est maintenant possible d'établir plus précisément les hémogrammes du point de vue de la formule hémocytaire. Les données préliminaires indiquent une extrême variabilité individuelle et, de ce fait, des études cliniques seront nécessaires pour en comprendre la signification, notamment en terme d'immunodéficience. La maîtrise de la technologie d'hybridation lymphocytaire permettra de continuer aisément à préparer des anticorps monoclonaux, au fur et à mesure des progrès réalisés dans l'étude des hémocytes et des besoins de nouveaux réactifs ayant des spécificités prédéterminées.

Sur la base de l'activité de chimioluminescence, il sera aussi très intéressant d'analyser la variabilité individuelle et la variabilité en fonction des conditions d'élevage, intensives ou extensives, ou en fonction des zones d'élevage et de la qualité de l'eau. Des recherches seront possibles pour tester *in vivo* et *in vitro* l'effet de polluants sur l'état immunitaire des mollusques ou des crevettes. Chez ces dernières, la chimioluminescence pourrait se révéler extrêmement utile à très court terme pour étudier les nombreux problèmes de mortalités qui sont suspectées être causées par des polluants, tel que le syndrome de Taura en Equateur. De même, l'effet d'immunostimulants pourra être objectivement analysé alors qu'actuellement des produits sont commercialisés et de plus en plus utilisés sans critères d'évaluation.

Les analyses des hémogrammes et de la capacité immunitaire des animaux seront nécessaires pour déterminer si leur variabilité est en partie génétique, ce qui conduirait alors à pouvoir utiliser ces caractères phénotypiques en tant que marqueurs pour sélectionner des animaux à forte capacité immunitaire. Il faut rappeler que le seul critère observé chez l'huître plate en relation avec la résistance à *Bonamia* a été le nombre accru d'hémocytes circulants.

Dans cette perspective de sélection de souches résistantes, que ce soit par génétique quantitative ou par transformation génétique, les recherches en immunologie doivent être amplifiées et certainement focalisées sur l'identification de molécules microbicides efficaces vis-à-vis des agents pathogènes de mollusques ou de crevettes. Grâce aux protocoles de purification d'agents pathogènes et de pathologie expérimentale il devient possible, d'une part, d'induire des facteurs humoraux et ensuite de les caractériser d'un point de vue biochimique et génétique, d'autre part, de tester des effecteurs hétérologues tels que les molécules

microbicides caractérisées chez les insectes. Cette double approche a été abordée en mettant en évidence un facteur neutralisant de coliphage dans l'hémolymphe d'huître et en testant l'effet microbicide de la magainine 1 sur un parasite.

L'importance des recherches en immunologie des mollusques et des crevettes pour le contrôle à moyen terme de leurs maladies a été prise en compte par l'IFREMER, le CNRS et l'Université de Montpellier II, ce qui a conduit à la création de l'unité mixte DRIM (Défense et Résistance chez les Invertébrés Marins) qui est animée par Philippe Roch. Ces programmes de recherches seront facilités à l'échelle nationale par des collaborations avec l'équipe de Jules Hoffmann qui est spécialisée en immunologie des insectes, cette équipe étant assurément une des meilleures à l'échelle mondiale. Concernant l'immunologie des crevettes, le projet établi entre le CENAIM et la Banque Mondiale devrait permettre d'établir un réseau impliquant les immunologistes d'invertébrés marins et d'arthropodes, français et étrangers, notamment Gérardo Vasta du MBI (USA), Kenneth Soderhall (Suède) et S. Iwanaga (Japon).

Génétique (53)

Par référence à l'agriculture, la sélection de souches résistantes de mollusques et de crevettes sera essentielle pour contrôler l'impact des épidémies et des endémies sur les productions aquacoles d'invertébrés marins.

Pour la génétique quantitative, les méthodologies de base sont d'ores et déjà disponibles puisqu'essentiellement liées à la pathologie expérimentale et à la technologie d'écloserie.

La transformation génétique, par contre, ne pourra être effective que lorsque un ensemble de méthodologies spécifiques seront maîtrisées. Dans le cadre de ce programme, la technologie de transformation génétique des mollusques et des crevettes a été abordée en intégrant l'ensemble des données technologiques acquises chez les plantes, les vertébrés et les quelques espèces d'invertébrés pour lesquels des informations étaient disponibles.

Les résultats de ces travaux ont été issus d'expérimentations, soit directement entreprises chez les mollusques et les crevettes, soit préalablement effectuées et optimisées chez le moustique.

La biolistique apparaît être une méthode de choix pour transférer en masse des embryons. Les informations relatives aux paramètres expérimentaux ont été transférées à Nigel Preston du CSIRO-Fisheries (Australie). Celui-ci avait jusque là essentiellement considéré la microinjection et l'électroporation pour transférer les embryons de crevette. Il faut souligner l'importance des moyens mis en oeuvre par le CSIRO sur la transformation génétique des crevettes et l'étroite relation scientifique entre le département "Fishery" du CSIRO et ceux d'entomologie et de génétique des plantes, qui sont très impliqués et performants en transformation génétique pour la résistance aux virus. Dans le cadre de la coopération avec le CENAIM, des essais de biolistique sont maintenant réalisés avec *Penaeus vannamei*.

Concernant les mollusques, la biolistique a été validée à la DRIM par Jean-Paul Cadoret et Viviane Boulo et des contacts ont été établis avec l'équipe de R. Colwell au Marine

Biotechnology Institute (MBI) à Baltimore qui est hautement spécialisée dans la transformation génétique des poissons et envisage de travailler sur les invertébrés marins.

L'identification de promoteurs hétérologues hautement efficaces pour contrôler l'expression de gènes reporteurs a ouvert la voie aux différents axes de recherche qui doivent être explorés afin de contrôler le processus de transformation génétique, notamment pour l'intégration de l'ADN transfecté dans le chromosome afin d'avoir une expression stable et héréditaire. Ces axes de recherche concernent en priorité l'étude de systèmes de transformation hétérologues ou homologues, soit de type transposon, soit de type viral.

Les transposons hétérologues seront préférentiellement analysés selon des tests d'excision-intégration qui informent très rapidement sur les potentialités d'utilisation. Des transposons homologues pourraient être recherchés sur la base d'homologies de séquences avec les transposons déjà caractérisés.

Des systèmes hétérologues viraux, capables de s'intégrer ou de se répliquer sous forme d'épisome, devront être expérimentés, par exemple les systèmes dérivés d'alphavirus de vertébrés (Semliki Forest virus) et de densovirus d'insectes. Ces derniers sont particulièrement bien étudiés dans l'équipe animée par M. Bergoin et ils constituent des candidats très prometteurs pour construire des systèmes d'expression et de transformation (54). En parallèle, la caractérisation des densovirus de crevettes et de retrovirus de moule devra être entreprise pour fabriquer des systèmes de transformation homologues.

L'extrême efficacité de la biolistique permettra aussi d'envisager la transformation à partir d'ADN dépourvu de caractéristique conférant une capacité d'intégration ou à partir de construits d'ADN avec des séquences répétées génomiques qui sont susceptibles de favoriser les phénomènes de recombinaison homologue.

La transformation génétique apparaît donc comme un vaste programme de recherche dont l'intérêt ne réside pas seulement dans ses applications en aquaculture pour le contrôle des maladies. En fait, la génétique fondamentale repose de plus en plus sur des travaux de transformation génétique comme l'atteste les milliers de publications et l'augmentation constante de leur nombre. Quelque soit le type de question de biologie ou de physiologie chez une espèce, la transformation génétique permet d'étudier l'expression d'un gène particulier à l'échelle de l'organisme, et ce, dans son environnement chromosomique et cellulaire. Par le biais de l'expression de séquence antisens, il est possible d'étudier les effets de la répression spécifique de ce gène. Selon le concept d'ablation génétique, il est aussi possible d'éliminer un type cellulaire en utilisant un promoteur spécifique couplé à une toxine pour transformer un organisme.

Compte tenu de cet ensemble d'applications, la transformation génétique est une priorité pour les invertébrés d'intérêt médical, agricole et économique. Pour quelques rares groupes zoologiques tels que les moustiques, le nombre de scientifiques qui étudient la transformation génétique est relativement suffisant pour explorer les différentes voies, d'autant qu'un réseau a été établi, à l'initiative de Louis Miller et sous l'égide de la Fondation Mac Arthur, pour optimiser ces moyens humains et techniques. Pour la majorité des groupes zoologiques, le nombre de scientifiques est extrêmement restreint, ce qui impose l'organisation de collaborations. Dans ce contexte et à l'initiative de Michelle Durand, un symposium a été organisé en décembre 1992, sous l'égide du Ministère des Affaires Etrangères et sous la Présidence d'Honneur de C. Vago, dans le but d'essayer d'organiser une coopération entre les USA et la France sur le thème de la transformation génétique des invertébrés d'intérêt

médical, agricole et aquacole. Ce projet de coopération, qui pourrait ultérieurement être étendu à d'autres pays notamment de la zone sud, doit être discuté en septembre 1994 par les responsables des institutions américaines et françaises. L'intégration à ce projet des généticiens concernés par les mollusques et les crevettes est un élément primordial pour l'avancement des travaux qui doivent conduire à la maîtrise de la technologie de leur transformation génétique et qui doivent être menés en parallèle avec ceux focalisés sur l'identification de gènes et des séquences susceptibles de conférer une résistance à une maladie.

PUBLICATIONS

1. Mialhe E., Chagot D., Boulo V., Comps M., Ruano F., Grizel H. (1987). An infection of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia) by rickettsia. *Aquaculture*, 67:258-259.
2. Le Gall G., Chagot D., Mialhe E., Grizel H. (1988). Branchial Rickettsiales-like infection associated with a mass mortality of sea scallop *Pecten maximus*. *Disease aquat. Org.*, 4:229-232.
3. Le Gall G., Chagot D., Mialhe E., Grizel H. (1988). Mise en évidence d'une infection rickettsienne chez *Chlamys opercularis* (Pectinidae) et comparaison avec la rickettsie de l'espece sympatrique *Pecten maximus*. 3rd Internat. Colloq. Pathol. Marine Aquacul., 2-6 Oct. 1988, Gloucester Point, VA, USA
4. Criado-Fornelio A., Chagot D., Constantin E., Mialhe E., Grizel H., 1988. An outbreak of *Vibrio*-caused disease in hatchery reared *Penaeus vannamei* larvae. 3rd Internat. Colloq. Pathol. Marine Aquacul., 2-6 Oct. 1988, Gloucester Point, VA, USA
5. Mialhe E., Bachère E., Le Bec C., Grizel H. (1985). isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Asctospora) parasites de bivalves marines. *C. R. Acad. Sci., Paris, Série III*, 301:
6. Robledo J.A.F., Bachere E., Boulo V., Despres B., Mialhe E., Figueras A.J., submitted. *Marteilia refringens* (Protozoa: Asctospora) Isolation and purification of the plasmodia, sporonts and spores; genomic DNA cloning-test of a non-isotopic labelled probe for the parasite diagnosis. *Dis. aquat. Org.*
7. Mialhe E., Bachère E., Chagot D., Grizel H. (1988). Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L.. *Aquaculture*, 71:293-299.
8. Le Gall G., Mialhe E. (1992). Purification of Rickettsiales-like procaryotes associated with *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia). Serological and biochemical characterization. *Diseases aquat. Org.* 12:215-220.
9. Criado-Fornelio A., Constantin E., Mialhe E., Grizel H., 1988. Biochemical characterization of an isolate of *Fusarium solani* pathogenic for *Penaeus japonicus*. 3rd Internat. Colloq. Pathol. Marine Aquacul., 2-6 Oct. 1988, Gloucester Point, VA, USA
10. Hervio D., Chagot D., Godin P., Mialhe E., Grizel H. Localization and characterization of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* (Asctospora), intrahemocytic protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). *Diseases aquat. Org.*, 12:67-70.
11. Mialhe E., Boulo V., Grizel H., Rogier H., Paolucci F. (1988). Monoclonal antibodies: a tool for molluscan pathology. *Amer. Fish. Soc., Special Publi.*, 18:304-310.

12. Mialhe E., Boulo V., Bachère E., Hervio D., Cousin K., Noël T., Ohresser M., Le Deuff R.M., Gendreau S. (1992). Development of new methodologies for diagnostic of infectious diseases in mollusc and shrimp aquaculture. *Aquaculture*. 107:1-10.
13. Rogier H., Hervio D., Boulo V., Clavies C., Hervaud E., Bachere E., Mialhe E., Grizel H., Pau B., Paolucci F., 1991. Monoclonal antibodies against *Bonamia ostreae* (Protozoa: Asctospora), an intrahaemocytic parasite of flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca: Bivalvia). *Dis. aquat. Org.*, 11:135-142.
14. Boulo V., Mialhe E., Rogier H., Paolucci F., Grizel H., (1989). *Immunodiagnosis of Bonamia ostreae* (Asctospora) infection of *Ostrea edulis* L. and subcellular identification of epitopes by monoclonal antibodies. *J. Fish Diseases*, 12:257-262.
15. Robledo J.A.F., Boulo V., Mialhe E., Despres B., Figueras A., 1994. Monoclonal antibodies against sporangia and spores of *Marteilia* sp. (Protozoa: Asctospora), *Dis. aquat. Org.*, 18: 211-216.
16. Goggin C.L., Boulo V., Mialhe E., Cousin K., Hervio D., 1991. Diagnosis of *Perkinsus atlanticus* with monoclonal antibodies and DNA probes. *European Aquaculture Society Special Publication*, 14:123
17. Le Gall G., Mourton C., Boulo V., Mialhe E., Paolucci F., Pau B. Monoclonal antibody against gill Rickettsiales-like organism (RLO) of *Pecten maximus* (Bivalvia): application to indirect immunofluorescence (IIF) diagnostic. *Diseases aquat. Org.*, 14:213-217.
18. Noel T., Boulo V., Mialhe E., Nicolas J.L., 1991. Diagnosis of the "Brown ring" disease in *Tapes philippinarum* with monoclonal antibodies. *European Aquaculture Society Special Publication*, 14:234.
19. Le Deuff R.M., Bachere E., Boulo V., Despres B., Mialhe E., 1991. Preparation of specific reagents, monoclonal antibodies and nucleic probes, for diagnosis of Lymphocystis related virus (Iridoviridae). *European Aquaculture Society Special Publication*, 14:185-186.
20. Noël D., Boulo V., Chagot D., Mialhe E., Paolucci F., Clavies C., Hervaud E., Elston R. (1991). Preparation and characterization of monoclonal antibodies against neoplastic hemocytes of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Diseases aquat. Org.*, 10:51-58.
21. Lubat V., Hervio D., Mialhe E., Grizel H., Baltz T., 1990. Characterization of a potential DNA probe for *Marteilia refringens*, a parasite of the flat oyster *Ostrea edulis*. 4th Internat. Colloq. Pathol. Marine Aquacul., 17-21 Sept, Vigo (Pontevedra), Spain.
22. Kellner-Cousin K., Le Gall G., Despres B., Kaghad M., Legoux P., Shire D., Mialhe E., 1993. Genomic DNA cloning of *Rickettsia*-like organisms of Saint-Jacques scallop *Pecten maximus*: evaluation of prokaryote diagnosis by hybridization with a non-isotopically labelled probe and by polymerase chain reaction. *Dis. aquat. Org.*, 15:145-152.

23. Noel T., Aubree E., Mialhe E., Panatier B., Flamion G., Grizel H., 1989. Aqua-Plak (R): a new tool for bacteriological survey in aquaculture. European Aquaculture Society Special Publication, 10:193-194.
24. Cochenne N., Hervio D., Boulo V., Panatier B., Mialhe E., Rogier H., Grizel H., Paolucci F. (1992). A direct monoclonal sandwich immunoassay for the detection of *Bonamia ostreae* (Asctospora) in the hemolymph of the flat oyster, *Ostrea edulis* (Mollusca: Bivalvia). Diseases aquat. Org. 12:129-134.
25. Noel T., Nicolas J.L., Boulo V., Mialhe E., submitted. Development of an immunoenzymatic assay using monoclonal antibodies to identify *Vibrio P1* responsible of "Brown ring disease" in the clam *Tapes philippinarum*. Aquaculture.
26. Mialhe E., Boulo V., Elston R., Hill B., Hine M., Montes J., Van Banning P., Grizel H. (1988). Serological analysis of *Bonamia* in *Ostrea edulis* and *Tiostrea lutaria* using polyclonal and monoclonal antibodies. Aquat. living Resour., 1:67-69.
27. Le Gall G., Mialhe E., Chagot D., Grizel H. (1991). Epizootiological study of rickettsiosis of the Saint-Jacques scallop *Pecten maximus*. Diseases aquat. Org., 10:139-145.
28. Mortensen S.H., Bachère E., Le Gall G., Mialhe E. (1992). Persistence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in scallops *Pecten maxims* Dis. aquat. Org. 12:221-227.
29. Bateau D., Le Coguic Y., Mialhe E., Grizel H., Flamion G., 1990. Traitement des moules (*Mytilus edulis*) contre le copepode *Mytilicola intestinalis*. 4th Internat. Colloq. Pathol. Marine Aquacul., 17-21 Sept, Vigo (Pontevedra), Spain.
30. Noel T., Aubree E., Bateau D., Mialhe E., Grizel H., 1992. Treatments against the *Vibrio P1*, suspected to be responsible for mortalities in *Tapes philippinarum*. Aquaculture, 107:171-174.
31. Hervio D., Vuillemin V., Bachère E., Boulo V., Cochenne N., Mialhe E. (in press). Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster *Ostrea edulis* with *Bonamia ostreae* parasites: application to parasite resistant oyster selection. Aquaculture.
32. Noel D., Moore J., Mialhe E., Boulo V., Elston R., 1991. Study of neoplastic hemocytes in the bivalve mollusc *Mytilus*. Proc. 8th intern. conf. on Invertebrate and Fish Tissue Culture. Publication of Tissue Culture, 47-55.
33. Mialhe E., Boulo V., Grizel H. (1988). Bivalve mollusc cell culture. Amer. Fish. Soc., Special Publi., 18:311-315.
34. Mourton C., Boulo V., Chagot D., Hervio D., Bachère E., Mialhe E., Grizel H. (accepted). Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Asctospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): I. *In vitro* model establishment. J. Invertebr. Pathol. 59:235-240.

35. Chagot D., Boulo V., Hervio D., Mourton C., Bachère E., Mialhe E., Grizel H. (accepted). Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): II. Entry mechanism. *J. Invertebr. Pathol.* 59:241-249.
36. Noel D., Pipe R., Elston R., Bachere E., Mialhe E., 1994. Antigenic characterization of hemocyte subpopulations in the mussel *Mytilus edulis* by means of monoclonal antibodies. *Marine Biology*, in press.
37. Rodriguez J., Boulo V., Mialhe E., Bachere E., submitted. The production and characterization of anti-shrimp hemolymph monoclonal antibodies. *J. Cell Science*.
38. Bachère E., Hervio D., Mialhe E., (1991). Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalve species, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Diseases aquat. Org.* 11:173-180.
39. Noel D., Bachere E., Mialhe E., 1993. Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Developmental and Comparative Immunology*, 17:483-493.
40. Boulo V., Hervio D., Morvan A., Bachere E., Mialhe E., 1991. *In vitro* culture of mollusc hemocytes. Functional study of burst respiratory activity and analysis of interactions with protozoan and procaryotic pathogens. Proc. 8th intern. conf. on Invertebrate and Fish Tissue Culture. Publication of Tissue Culture, 56-64.
41. Bachere E., Noel T., Mialhe E., 1991. Effects of environmental pollutants and chemotherapeutic agents on the chemiluminescence of the hemocytes from the oyster *Crassostrea gigas*. *European Aquaculture Society Special Publication*, 14:14-15.
42. Le Gall G., Bachère E., Mialhe E. (1991). Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes with zymosan and specific Rickettsiales-like organisms stimulation. *Diseases aquat. Org.* 11:181-186.
43. Noel D., Bachere E., Elston R., Mialhe E., submitted. *In vitro* study of phagocytic activities and interactions of normal and neoplastic mussel hemocytes (Mollusca: Bivalvia). *Dis. aquat. Org.*
44. Bachère E., Hervio D., Mialhe E., Grizel H. (1990). Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas hemolymph*. *Dev. comp. Immunol.*, 14:261-268.
45. Morvan A., Pimenta P., Bachere E., Mialhe E., submitted. *In vitro* activity of the antimicrobial peptide magainin 1 against *Bonamia ostreae*, the intrahemocytic parasite of the flat oyster *Ostrea edulis*. *Dis. aquat. Org.*
46. Cadoret J.P., Delecheneau J.M., Gendreau S., Mialhe E., 1991. Microinjection procedure applied on marine bivalva. *European Aquaculture Society Special Publication*, 14:48-49.

47. Gendreau S., Delecheneau J.M., Cadoret J.P., Mialhe E., 1991. Methodology for microinjection of embryos of the shrimp *Penaeus indicus*. European Aquaculture Society Special Publication, 14:115-116.
48. Mialhe E., Miller L.H., 1994. Biolistic Techniques for Transfection of Mosquito Embryos (*Anopheles gambiae*). Biotechniques, 16:924-931.
49. Gendreau S., Lardans V., Cadoret J.P., Mialhe E., submitted. Transient expression of luciferase reporter gene after biolistic introduction into *Artemia franciscana* (Crustacea) embryos. Aquaculture.
50. Mialhe E., Bachere E., Boulo V., Cadoret J.P., submitted. Strategy for research and international cooperation in marine invertebrate pathology, immunology and genetics. Aquaculture.
51. Mialhe E. (1990). Infectious pathology in mollusc and shrimp hatcheries. In "Advances in tropical aquaculture" Ifremer Ed., 233-236.
52. Bachere E., Mialhe E., Noel D., Boulo V., Morvan A., Rodriguez J., submitted. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. Aquaculture.
53. Mialhe E., Bachere E., Boulo V., Cadoret J.P., Saraiva E., Carrera L., Calderon J., Colwell R., submitted. Biotechnology-based control of disease in marine invertebrates: development of molecular probe diagnostics and disease-resistant transgenic shrimps and molluscs. Molecular Marine Biology and Biotechnology.
54. Jousset F.X., Jourdan M., Compagnon B., Mialhe E., Veyrunes J.C., Bergoin M., 1990. Restriction maps and sequence homologies of two densovirus genomes. J. gen. Virol., 71:2463-2466.