

Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II.

**D. E. A. de biologie fondamentale et appliquée,
option protistologie microbiologie**

**PREPARATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX SPECIFIQUES DE
L'HEMOLYPHE DE LA CREVETTE PENAEUS JAPONICUS**

**RECHERCHE PAR P.C.R. DE SEQUENCES DE TYPE ATTACINE
DANS L'A.D.N. GENOMIQUE DE
PENAEUS JAPONICUS**

Jenny RODRIGUEZ LEON

Septembre 1990

**Laboratoire de Pathologie et de Génétique
des Invertébrés Marins
17390 - LA TREMBLADE**



Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II.

D. E. A. de biologie fondamentale et appliquée,
option protistologie microbiologie

PREPARATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX SPECIFIQUES DE
L'HEMOLYMPHE DE LA CREVETTE PENAEUS JAPONICUS

RECHERCHE PAR P.C.R. DE SEQUENCES DE TYPE ATTACINE
DANS L'A.D.N. GENOMIQUE DE
PENAEUS JAPONICUS

Jenny RODRIGUEZ LEON

Septembre 1990

Laboratoire de Pathologie et de Génétique
des Invertébrés Marins
17390 - LA TREMBLADE

SOMMAIRE

I - INTRODUCTION.....	1
II - ETAT ACTUEL DE CONAISSANCES ET DES RECHERCHES SUR L'IMMUNITE DES ARTHROPODES.....	3
III - MATERIEL ET METHODES.....	6
1 - Origine des animaux.....	6
2 - Techniques de préparation des anticorps monoclonaux.....	6
2.1. Préparation des suspensions antigéniques:ponction d'hémolymphe de <i>Penaeus japonicus</i>	6
2.2. Immunisation des souris.....	6
2.3. Hybridation lymphocytaire.....	7
2.3.1. Préparation des cellules.....	7
2.3.2. Fusion cellulaire.....	9
2.3.3. Sélection des hybridomes.....	9
2.3.4. Sélection des hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques.....	10
2.3.5. Clonage des hybridomes.....	11
2.3.6. Cryopréservation et décongélation des hybridomes.....	11
2.3.7. Production des anticorps monoclonaux en ascite.....	12
2.4. Détermination des profils de fluorescence.....	12
3 - Techniques d'analyse d'A.D.N.....	13
3.1. Extractions d'A.D.N génomiques.....	13

3.1.1. Extraction d'A.D.N. génomique de la crevette <i>Penaeus japonicus</i>	13
3.1.2. Extraction d'A.D.N. génomique de <i>Hyalophora cecropia</i>	13
3.2. Synthèse d'amorces oligonucléotidiques.....	14
3.3. Amplification de séquence par Polymerase Chain Reaction.....	15
3.4. Purification des fragments amplifiés.....	16
 IV – RESULTATS.....	 17
 1 – Préparation d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'hémolymph de crevette <i>Penaeus japonicus</i>	 17
1.1 Etat d'immunisation des souris.....	17
1.2 Fusion.....	17
1.3 Criblage des hybridomes.....	18
1.4 Clonage et contrôle de la spécificité.....	18
1.5 Détermination des profils de fluorescence.....	18
 2 – Extractions d'A.D.N génomiques de <i>Penaeus japonicus</i> et de <i>Hyalophora cecropia</i>	 19
 3 – Amplification.....	 19
 V – DISCUSSION – CONCLUSION.....	 20
 BIBLIOGRAPHIE	
 ANNEXES	

ABREVIATIONS

Ac Mc.	Anticorps monoclonaux
A.D.C.	Acide dichloroacétique
A.D.N.	Acide désoxyribonucléique
A.D.N.c.	Acide désoxyribonucléique complémentaire
A.R.N.	Acide ribonucléique
Br Et.	Bromure d'éthidium
dATP.	2'-Deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP.	2'-Deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP.	2'-Deoxyguanosine 5'-triphosphate
dTTP.	2'-Deoxythymidine 5'-triphosphate
D.M.T.	Diméthoxytrityl chloride
DMSO.	Dymethyl sulfoxide
D.O.	Densité optique
E.D.T.A.	Ethylène diamine tetraacetic acid
H.A.T.	Hypoxanthine aminoptérine thymidine
H.G.P.R.T.	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase
IgG.	Immunoglobuline G.
I.F.I.	Immunofluorescence indirecte
pb.	Paire de bases
P.C.R.	Polymerase chain reaction
P.E.G.	Polyéthylène glycol
proPo.	Prophénoloxydase
S.D.S.	Sodium dodecyl sulfate
S.M.A.	Solution modifiée d'Alsever
S.V.F.	Sérum de veau foetal
T.E.	Tris-E.D.T.A.
T.I.F.	Tampon immunofluorescence

INTRODUCTION

I- INTRODUCTION

Les élevages de crevettes sont pratiqués depuis fort longtemps dans des pays du Sud-Est asiatique où ils constituaient une activité traditionnelle, basée essentiellement sur le grossissement de jeunes crevettes prélevées en milieu naturel. A partir des années 60, avec les progrès des techniques d'élevage, ces activités se sont progressivement étendues jusqu'aux pays d'Amérique Latine. Initialement, les post-larves étaient pêchées dans le milieu naturel, mais la maîtrise des processus de maturation de géniteurs et des élevages larvaires a conduit à la mise en place de structures d'écloseries, dont le développement s'est généralisé afin de s'affranchir du caractère fluctuant des prélèvements de post-larves du milieu naturel et d'assurer un approvisionnement régulier tout au long de l'année. Actuellement les élevages de crevettes péneides constituent une activité importante à l'échelle mondiale (400 000 T/an au minimum en 1990), soit environ le quart de la production liée à la pêche qui plafonne depuis les années 1980. Les espèces concernées sont relativement peu nombreuses, les plus importantes étant *Penaeus vannamei*, *P. monodon* et *P. japonicus*.

Dans ce contexte zootechnique, relativement similaire quelques soient les pays, des problèmes de pathologie à caractère épidémique sont régulièrement observés, en écloserie principalement en raison du caractère confiné de ces structures, mais aussi dans les bassins de grossissement où la tendance vers l'élevage intensif favorise les épidémies. Des infections virales d'étiologies variées (Baculovirus, Picornavirus et Parvovirus) sont les maladies les plus importantes à prendre en compte puisque des mortalités massives ont été fréquemment associées à ces virus (LIGHTNER, 1983). Plusieurs cas de maladies dues à des bactéries de type *Vibrio* ont été signalées au cours des dernières années dans des écloseries de crevettes (CRIADO-FORNELIO et al., 1988). Enfin, parmi les agents pathogènes fongiques, *Lagenidium sp.* est bien connu pour sa forte pathogénicité vis à vis de larves et de post-larves en élevage (BATICADOS et al, 1978), alors que *Fusarium solani* affecte les stocks de géniteurs (BIAN and EGUSA, 1981).

A court terme, la prophylaxie de ces maladies est liée à l'amélioration des contrôles zoosanitaires. Dans cette optique, des méthodes de diagnostics sont élaborées qui font appel à des techniques immunologiques (MIALHE et al, 1988), à des sondes ADN (LANDEGREN et al, 1988) et à des systèmes bactériens miniaturisés (NOEL et al, 1989). A plus long terme, la pérennité et la rentabilité de ces élevages reposent sur l'amélioration génétique des crevettes, basée essentiellement sur des critères de résistance aux maladies. C'est pourquoi des programmes de recherches sont mis en place, notamment à l'IFREMER, sur l'immunologie des crevettes. En raison de leur caractère récent, ces recherches sont en majorité relativement fondamentales. Néanmoins, certaines bénéficient des acquis chez d'autres groupes zoologiques et sont de ce fait conduites dans une optique plus appliquée.

Cette double approche est illustrée par mon stage de DEA, effectué au Laboratoire de Pathologie et de Génétique des Invertébrés Marins à la Tremblade. Dans un premier temps je me suis consacrée à la préparation, par hybridation lymphocytaire (SCHONHERR and HOUWINK, 1984), d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'hémolymphe de la crevette *P. japonicus*. La deuxième facette de mon travail a consisté en la recherche dans le génome de cette espèce, de gènes de protéines anti-bactériennes apparentées aux attacines du ver à soie *Hyalophora cecropia*, en appliquant la méthodologie d'amplification de séquences homologues selon la technique de Polymerase Chain Reaction (PCR).

**ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES ET DES RECHERCHES SUR
L'IMMUNITE DES ARTHROPODES**

II - ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES ET DES RECHERCHES SUR L'IMMUNITE DES ARTHROPODES

Les connaissances acquises dans le domaine de l'immunité des Arthropodes sont encore limitées chez les Crustacés et concernent essentiellement les Insectes qui ont été l'objet de nombreuses études, en raison de leur importance économique en tant que ravageurs mais surtout en raison de leur association avec différents types d'agents pathogènes dont ils sont les vecteurs pour l'homme ou des animaux domestiques. Les arthropodes ont un système circulatoire ouvert et présentent des mécanismes de défense "immédiats" dans lesquels les hémocytes jouent un rôle prépondérant. La classification des hémocytes d'arthropodes, basée sur des critères morphologiques conduit à considérer trois catégories de cellules, des hyalines, des semi-granuleuses et des granuleuses. Cette classification étant encore l'objet de nombreuses controverses, des études ont été développées dans le but de corrélérer des caractéristiques ultrastructurales avec des données histochimiques et des activités fonctionnelles (GUPTA, 1986). Comme cela a été, montré notamment chez le crustacé d'eau douce *Astacus astacus* et chez des Décapodes marins, les cellules hyalines seraient les plus phagocytaires, les semi-granuleuses et les granuleuses interviendraient directement dans le système prophénoloxydase (proPo) dont les différents constituants sont impliqués dans les phénomènes de coagulation, mélanisation et encapsulation (SÖDERHÄLL and SMITH, 1983; JOHANSSON and SÖDERHÄLL, 1989). L'enzyme à l'origine de la mélanine, qui aurait une activité cytotoxique, est la phénoloxydase qui est présente dans l'hémolymph sous la forme inactive de prophénoloxydase. Selon un modèle proposé par JOHANSSON et SÖDERHÄLL (1989), les hémocytes semi-granuleux reconnaîtraient les particules étrangères, dégranuleraient, libérant le système d'activation de la proPo ainsi qu'un facteur de dégranulation, une protéine de 76 Kda, également dénommé facteur d'adhésion cellulaire. Ce facteur serait impliqué dans la communication entre les différents types hémocytaires, semi-granuleux et granuleux dont la dégranulation serait stimulée. Ainsi, les différents constituants du système proPo interviendraient dans de multiples réactions de défenses cellulaires comme la phagocytose stimulée par des opsonines et l'encapsulation (Annexe 1).

Outre ces réactions de défenses, les Arthropodes possèdent des mécanismes immunitaires humoraux, inductibles, impliquant notamment des facteurs antibactériens. Diverses familles de peptides constitués de 30 à 180 acides aminés, ont été mises en évidence, et dénommées, cecropines, attacines et lysozyme chez le ver à soie *Hyalophora cecropia* (BOMAN and HULTMARK, 1987) et diptéricines chez la mouche *Phormia terranova* (DIMARCQ et al, 1988). La caractérisation biochimique de ces facteurs microbicides a été entreprise au niveau protéique et au niveau nucléotidique parallèlement à la préparation de banques d'ADNc. Les séquences complètes en acides aminés ainsi que celles des ARNm d'un certain nombre de ces peptides sont d'ores et déjà établies (REICHART et al, 1989; BOMAN and HULTMARK, 1987) et sont accessibles sur les banques de données (BISANCE).

Chez les Crustacés péneïdes, les données se limitent à des descriptions morphologiques et des analyses cytochimiques des hémocytes, à l'étude des hémogrammes en fonction du cycle de mue chez *P. japonicus* (TSING et al, 1989) et à des analyses quantitatives des acides aminés et des protéines de l'hémolymphe (MOUREAU et CECCALDI, 1985; BOUCARD et al, 1985).

Il faut souligner la difficulté d'identification fiable des types hémocytaires qui représente un point de blocage pour la caractérisation des hémogrammes et l'étude des fonctions spécifiques des types hémocytaires, et qui pourrait être résolue par la préparation d'anticorps monoclonaux. De tels réactifs, chez les Vertébrés et certains Mollusques (YOSHINO and GRANATH, 1983), se sont avérés constituer des marqueurs particulièrement performants et des outils adaptés à des travaux expérimentaux tels que l'immunopurification (BARTHOLOMEN et al, 1982).

Par ailleurs, l'identification de molécules à activité anti-bactérienne ou anti-virale devra être abordée selon une stratégie identique à celle développée chez les Insectes, sur la base de tests biologiques mettant en évidence des activités inhibitrices vis-à-vis de différents agents pathogènes, suivis de travaux de purification et de caractérisation. Parallèlement, une approche basée sur des méthodologies de biologie moléculaire, consistera en la recherche dans le génome des crevettes, de gènes immunitaires homologues avec ceux caractérisés chez d'autres espèces de Vertébrés ou d'Invertébrés. L'intérêt majeur de ce type de travaux est à considérer d'un point de

vue appliqué, car il réside dans l'identification rapide et la production par génie génétique de peptides antimicrobiens spécifiques, susceptibles d'être utilisés en aquaculture, alternativement aux antibiotiques classiques dont l'utilisation pose des problèmes pour l'environnement et la santé humaine.

MATERIEL
ET
METHODES

III - MATERIEL ET METHODES

1 - Origine des animaux

Les crevettes *P. japonicus* proviennent de l'écloserie "Les poissons du soleil" (Balaruc les Bains) et sont maintenues au laboratoire en bacs de 700 l équipés de filtres biologiques fonctionnant selon le principe " d'air-lift ".

Des pupes du ver à soie, *H. cecropia*, ont été fournies par le Professeur H.G.Boman (Département de Microbiologie de l'Université de Stockholm, Suède.)

2 - Techniques de préparation des anticorps monoclonaux

2.1. Préparation des suspensions antigéniques: ponction d'hémolymphe de *Penaeus japonicus*

L'hémolymphe est ponctionnée dans le sinus ventral au niveau de la première paire de pléopodes et simultanément diluée (1 volume pour 3 volumes) dans de la solution modifiée d'Alsever (SMA) (glucose 20,8 g/l; citrate de Na 8 g/l; EDTA 3,33 g/l; Na Cl 22,5 g/l; pH 7,5; 1000 mOSm.) afin d'éviter des phénomènes de coagulation et de mélanisation.

Pour l'immunisation des souris, la suspension hémocytaire est ensuite rendue isotonique par dilution au 2/3 dans de l'eau distillée (400 mOSm).

2.2. Immunisation des souris

Deux souris Balb/C ont été immunisées avec la suspension antigénique précédemment décrite, après congélation et décongélation.

Le schéma d'immunisation consiste en une première injection intrapéritonéale de 500 μ l (4×10^6 hémocytes /ml) et deux injections identiques de rappel, effectuées à une semaine d'intervalle.

Le titre en anticorps spécifiques est estimé pour chaque souris 13 jours après le dernier rappel, selon une technique d'immunofluorescence indirecte (cf. Matériel et Méthodes 2.3.4.).

La souris ayant le titre le plus élevé est retenue pour l'hybridation lymphocytaire et reçoit, 3 jours avant la fusion, une dernière injection de rappel, identique aux précédentes.

2.3. Hybridation lymphocytaire

Le schéma général de la préparation d'anticorps monoclonaux (Ac Mc) selon la technique d'hybridation lymphocytaire est présenté sur la figure 1.

2.3.1. Préparation des cellules.

Macrophages

Les macrophages présents dans les puits de culture ont pour rôle, d'une part, de phagocyter les cellules mortes et les microorganismes éventuellement présents, et d'autre part, de métaboliser le milieu de culture. Ils sont introduits dans les puits de culture, 24 heures avant la fusion cellulaire.

Les souris Balb/C sont tuées par élévation et rupture de la colonne vertébrale. Après avoir ouvert soigneusement la peau de l'abdomen sans léser le péritoine, on injecte dans la cavité abdominale 5 ml de milieu A (RPMI 1640; sérum de veau foetal SVF 10%).

La cavité abdominale est ensuite rincée par aspiration et refoulement du liquide en ayant soin de ne pas perforer les intestins. Le liquide prélevé est centrifugé (250g, 10 minutes, 4°C) et le surnageant est éliminé. Le culot de cellules est repris dans 10 ml de milieu A. Les cellules sont alors comptées. Une souris permet d'obtenir entre $1,5$ et 3×10^6 macrophages.

Immunisation

Préparation des cellules

Fusion par traitement chimique (PEG)

Sélection des hybridomes

Sélection des hybridomes sécréteurs
d'anticorps spécifiques

Clonage des hybridomes

Cryopréservation des hybridomes

Production des anticorps monoclonaux

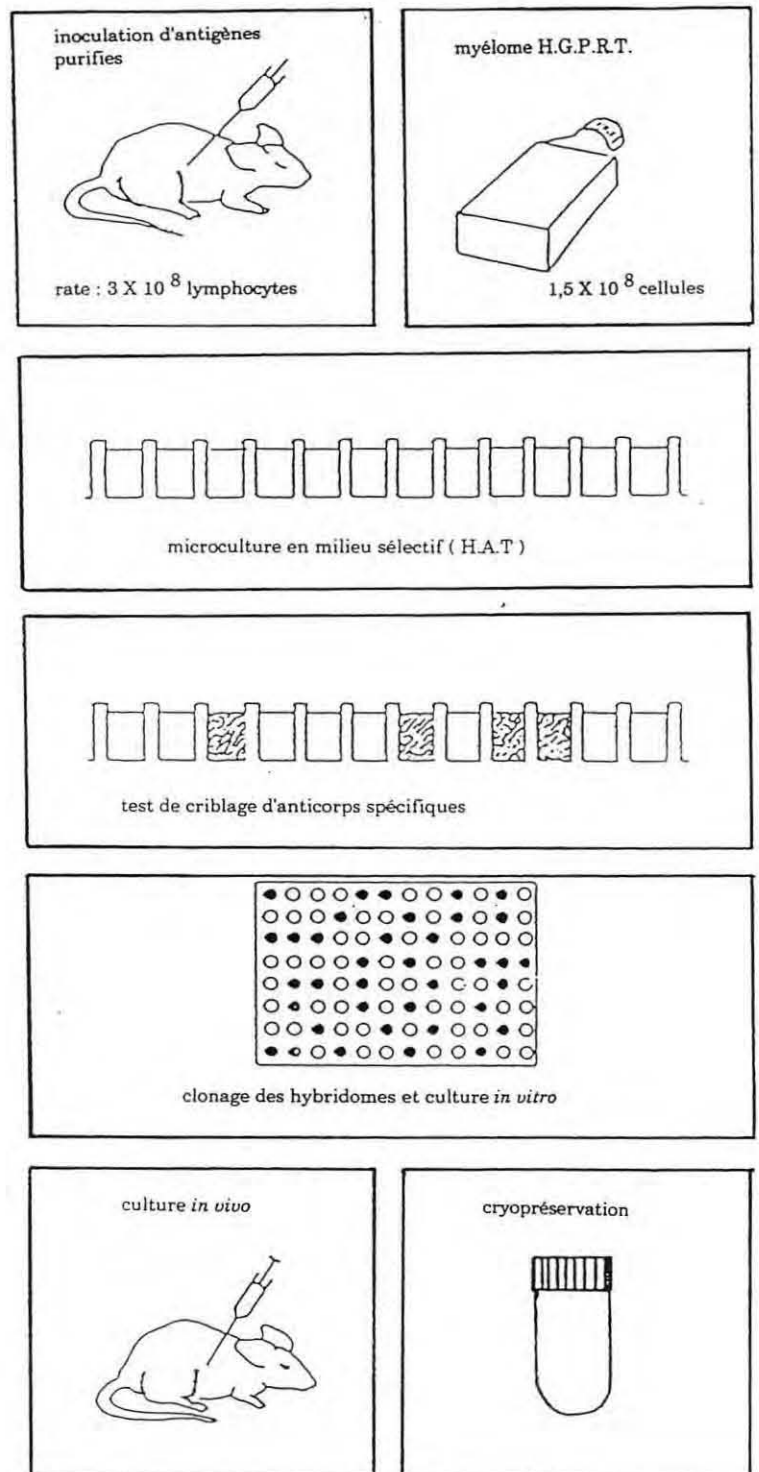


FIGURE 1 : Principe de production d'anticorps monoclonaux selon la technologie de l'hybridation lymphocytaire

Ceux-ci sont répartis dans les plaques de culture à raison de 10 000 à 20 000 cellules par puits. Après un délai de 2 heures à 37°C, les macrophages sont activés et adhèrent au fond des puits, le milieu de culture peut alors être éliminé par aspiration.

. Cellules de la lignée myélomateuse

Les cellules de la lignée myélomateuse P3X63Ag8-653 sont déficientes en hypoxanthine - guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT), qui intervient dans la voie secondaire de synthèse de nucléotides (Annexe 2, Fig. b). Pour obtenir des myélomes HGPRT⁻, ils sont cultivés, à raison de 100 000 cellules au maximum, dans du milieu A contenant 0,13 mM de 8-azaguanine, un analogue létal de l'hypoxanthine. A 37°C, en présence de 5% de CO₂, le temps de doublement cellulaire est d'environ 18 H. Le jour avant la fusion, une concentration de 50 000 cellules par ml environ est nécessaire afin de se situer dans la phase exponentielle de croissance cellulaire. Le milieu est renouvelé régulièrement par élimination du surnageant.

. Lymphocytes

La souris, sélectionnée sur la base de son titre en anticorps spécifiques est tuée par décapitation : le sang est soigneusement éliminé. La rate est alors prélevée aseptiquement, rincée dans du milieu A sans SVF, broyée à l'aide d'un homogénéiseur de tissus de type Dounce dans 10 ml de milieu A sans SVF. Toutes ces manipulations sont effectuées au froid (4°C), les tubes et broyeurs étant conservés dans de la glace pilée. Le broyat est filtré sur de la gaze stérile, le filtrat est centrifugé (150 g, 10 minutes, 4°C). Le culot est repris dans 10 ml de milieu A sans SVF. Le dénombrement des lymphocytes est effectué à l'aide d'une cellule de Malassez. Une certaine habitude est indispensable pour reconnaître les lymphocytes qui correspondent aux cellules de plus grande taille.

2.3.2. Fusion cellulaire

Les cellules myélomateuses, préalablement dénombrées, sont centrifugées (200 g, 5 minutes, 4°C). Le culot est repris dans du milieu A sans SVF et centrifugé comme précédemment.

Ce culot est remis en suspension dans 5 ml de milieu A sans SVF et les cellules sont à nouveau comptées.

Dans le tube contenant la suspension de lymphocytes, on ajoute les cellules myélomateuses en nombre cinq fois moindre. Cette suspension mixte est centrifugée (200 g, 10 minutes, T° laboratoire). Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension par simple agitation du tube. Il faut alors ajouter au culot de cellules 1 ml de polyéthylène glycol 1540 (P.E.G.) à 37°C, les 10 premières gouttes étant mises en 30 secondes ($t = 0$)

$t = 0'30$ Mettre au bain-marie à 37°C

$t = 1'30$ Centrifuger à 200 g à 20°C

$t = 3'00$ Arrêter rapidement la centrifugeuse

$t = 4'30$ Mettre au bain marie

$t = 6'30$ Mettre aussitôt 6 ml de milieu A sans SVF à raison de 100 μ l toutes les 5 secondes puis ajouter 9 ml de milieu.

Cette suspension est centrifugée (150 g, 10 minutes, 20°C). Le culot est repris dans 10 ml de milieu B (RPMI 1640-15% SVF). Les cellules sont ensuite réparties à raison de 100 000, 50 000 ou 25 000 cellules par puits (100 μ l). Les microplaques (96 puits) ont été, le jour précédent,ensemencées avec des macrophages (cf. Matériel et Méthodes 2.3.1.). Les plaques sont maintenues à 37°C dans un incubateur à CO₂ (5%).

2.3.3. Sélection des hybridomes

Un jour après la fusion, dans chaque puits de culture sont ajoutés 100 μ l de milieu B sélectif HAT 2X (Hypoxanthine 10 mM; Aminoptérine 0,04 mM; Thymidine 1,6 mM). L'aminoptérine bloque la voie de synthèse primaire des nucléotides. Seules les cellules

myélomateuses fusionnées avec un lymphocyte (HGPRT⁺) sont alors capables de se multiplier (Annexe 2, Figure a et b).

Le dixième jour, 100 μ l de surnageant de culture sont remplacés par le même volume de milieu B sélectif HAT 1X.

Au moment du criblage des hybridomes, 100 μ l de surnageant de culture sont prélevés et remplacés par le même volume de milieu B additionné en hypoxanthine (5 mM) et en thymidine (0,8 mM).

2.3.4. Sélection des hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques

La présence d'anticorps spécifiques de l'hémolymphe est recherchée dans les surnageants de culture des hybridomes, en pratiquant un test d'immunofluorescence indirecte (I.F.I.).

L'anticorps de détection est couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine.

La formation de complexes Ag - Ac - Anti Ig est visualisée à l'aide d'un microscope à épifluorescence

Anticorps couplé : 

Anticorps spécifique de l'antigène : 

Antigène : 

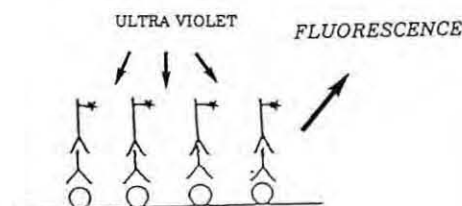


Schéma d'immunofluorescence indirecte (I.F.I.)

Les préparations histologiques d'hémolymphe de crevette sont effectuées dans des microplaques (96 puits) préalablement traitées à la Poly-D-lysine: 10 μ l de suspension

hémocytaire (1 vol. d'hémolymph / 3 vol. de SMA) sont repartis dans chaque puits avec 200 μ l d'eau de mer filtrée. Après incubation de 30 minutes à température ambiante, les hémocytes adhèrent à la plaque et les surnageants sont éliminés. Les cellules sont fixées 10 minutes à température ambiante par une solution de paraformaldéhyde à 4 % dans du tampon Pasteur pour immunofluorescence (T.I.F.), (réf. IPP 74901) puis lavées dans le tampon T.I.F (200 μ l/puits). Chaque surnageant de culture d'hybridomes est analysé en déposant 50 μ l par puits. Après incubation de 15 minutes puis deux lavages (5 minutes tampon T.I.F.), une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (réf. 7461), diluée au 1/100e dans du tampon T.I.F. additionné de Bleu Evans (concentration finale de 1‰), est répartie à raison de 50 μ l par puits. Les plaques sont incubées 30 minutes puis lavées 2 fois 5 minutes dans le tampon T.I.F. Après addition de glycérine tamponnée (IPP, réf. 74921) dans chaque puits, les préparations sont examinées au microscope à épifluorescence.

2.3.5. Clonage des hybridomes

Les hybridomes sélectionnés sur la base de leur spécificité sont, d'une part, transférés dans des puits de 5 ml, d'autre part, clonés selon la technique des dilutions limites. Pour ce faire, les hybridomes sont repartis sous un volume de 200 μ l à raison de 0,3 cellule par puits. Après 10 à 15 jours de culture, la spécificité des anticorps sécrétés est testée à nouveau, selon la même technique d'immunofluorescence indirecte. Les hybridomes clonés producteurs d'anticorps spécifiques sont cultivés en volumes progressivement augmentés, afin de disposer de suffisamment de cellules, pour congeler les hybridomes et inoculer des souris en vue de la production en ascite des Ac Mc.

2.3.6. Cryopréservation et décongélation des hybridomes

Les hybridomes devant être congelés sont centrifugés (250g, 10 minutes, 4°C) et repris dans du SVF (DMSO 7,5%) à raison de 3×10^6 cellules par ml. Cette suspension cellulaire est répartie en ampoules scellées qui sont placées dans un récipient isotherme à l'intérieur d'un

congélateur à -80°C . Après un refroidissement progressif (48 heures) jusqu'à cette température, les hybridomes sont introduits et conservés dans l'azote liquide (-196°C).

La décongélation de ces hybridomes se fait rapidement à 37°C . La suspension de cellules est transvasée dans 15 ml de milieu A et centrifugée pour éliminer le DMSO. Le culot de cellules est resuspendu dans du milieu A, puis mis en culture.

2.3.7. Production des anticorps monoclonaux en ascite

Les Ac Mc sont produits dans des souris par inoculation d'hybridomes dans le péritoine. Les souris subissent, 15 jours avant cette inoculation, une injection de pristane ($500\ \mu\text{l}$) par voie intrapéritonéale, ce qui favorise la formation d'ascite liquide au lieu de tumeurs solides. Les hybridomes sont injectés sous un volume de $500\ \mu\text{l}$ ($3\ \text{à}\ 4 \times 10^6$ cellules par ml). Les solutions d'anticorps sont collectées par ponction intrapéritonéale du liquide d'ascite, une à quatre semaines après l'injection des hybridomes. Les cellules sont éliminées par centrifugation et les ascites sont conservées à -80°C .

2.4. Détermination des profils de fluorescence.

Les ascites sont testées par immunofluorescence indirecte sur des primocultures d'hémolymphes, préparées comme précédemment décrit (cf Matériel et méthodes 2.3.4.), en utilisant des lames de type microprint afin de pouvoir examiner avec plus de précision (objectifs à immersion) les préparations qui dans ce cas ont été fixées à l'acétone.

3 – Techniques d'analyse d'A.D.N.

3.1 Extractions d'A.D.N. génomiques

3.1.1. Extraction d'A.D.N. génomique de la crevette *Penaeus japonicus*.

L'extraction est réalisée sur *P. japonicus* selon le protocole dérivé de JEANPIERRE (1987). Les branchies, prélevées sur deux crevettes adultes, sont dissociées à l'aide d'un homogénéiseur de tissus de type Potter dans 6 ml d'une solution d'isothiocyanate de guanidine (5 M), à laquelle sont additionnés 1,2 ml d'acétate d'ammonium (5 M), 2,4 ml d'une solution de Sarkosyl à 10% et 30 μ l de protéinase K à 10 mg/ml. Le broyat est alors incubé 2 heures à 60°C, en ajoutant toutes les 30 minutes 1,2 ml de sarkosyl et 10 minutes après 30 μ l de protéinase K. Les acides nucléiques sont ensuite précipités par l'éthanol absolu, rincés dans l'éthanol à 70° puis repris dans du tampon T.E. (Tris.Cl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8.) Une nouvelle digestion de 2 heures à 50°C est effectuée dans un volume de 5 ml (Sarkosyl 10%), auquel sont ajoutés 500 μ l de sarkosyl et 30 μ l de protéinase K toutes les 40 minutes. Deux extractions au phénol-chloroforme suivies d'une au chloroforme seul sont alors pratiquées, les acides nucléiques étant ensuite précipités par l'éthanol absolu puis rincés à l'éthanol 70°. La purification de l'ADN s'achève par une dégradation enzymatique des ARN: le culot d'acides nucléiques est repris dans 490 μ l de T.E. auxquels sont ajoutés 10 μ l de ribonucléase (RNase, DNase free ; Boehringer) à 10 mg/ml. Après une incubation de 3 heures à 37°C, une extraction phénol-chloroforme et une précipitation à l'éthanol, l'efficacité du traitement RNase et la qualité de l'ADN purifié sont contrôlées sur un gel d'agarose à 2%. La quantité d'A.D.N. purifié est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

3.1.2. Extraction d'A.D.N. génomique de *Hyalophora cecropia*

Les premières étapes de préparation d'ADN génomique sont celles préconisées par XANTHOPOULOS et al (1988). Deux pupes de *H. cecropia* sont disséquées, le contenu intestinal et l'hémolymphe sont rincés avec une solution de KCl à 0,9 %; les tissus adipeux sont prélevés, et

homogénéisés à l'aide d'un broyeur de type Dounce dans 5 ml de tampon de lyse (NaCl 0,14 M; MgCl₂ 1,5 mM; Tris.Cl 1mM, pH 8,6; Nonidet P- 40 0,5 %). La suspension cellulaire obtenue est mélangée à un volume égal de tampon de lyse contenant du sucrose (24 % W/V) et du Nonidet P-40 à 1 %. Les noyaux sont isolés par centrifugation (10 000 g, 20 minutes, 4°C) puis remis en suspension dans du tampon Protéinase K (Tris-Cl 0,1 M, pH 7,5; EDTA 12,5 mM; NaCl 0,15 M; SDS 1%; Protéinase K à concentration finale de 200 µg/ml) (MANIATIS et al, 1982. p. 191). A partir de cette étape l'extraction est poursuivie selon le protocole précédemment décrit pour l'ADN de crevette (cf Matériel et méthodes 3.1.1).

3.2. Synthèse d'amorces oligonucléotidiques

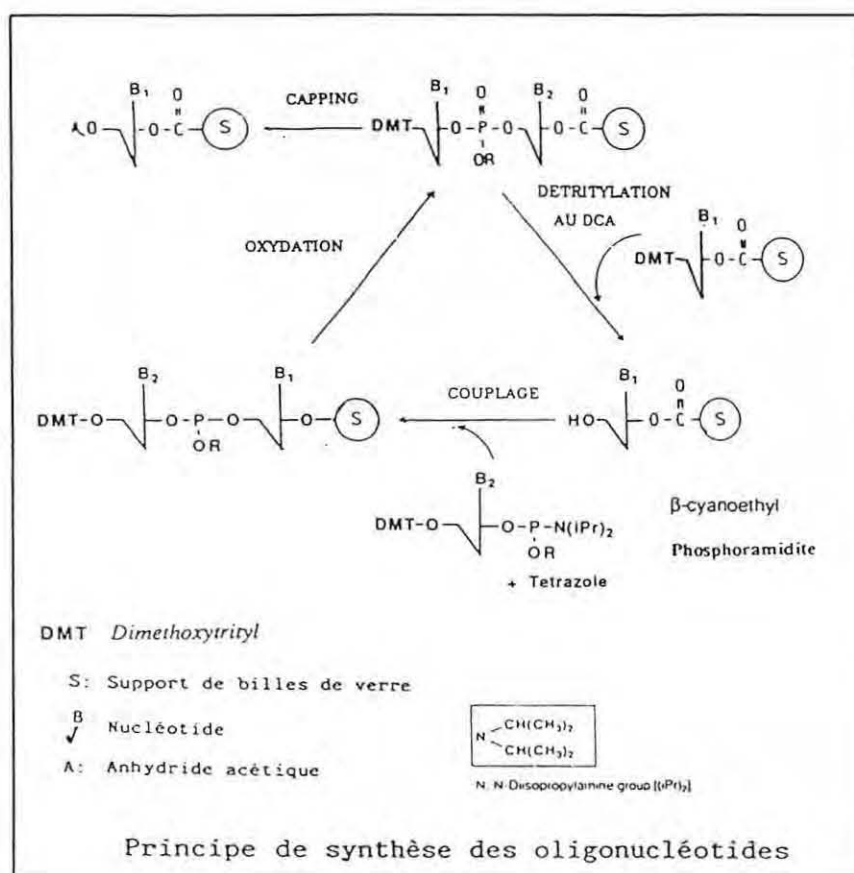
Deux amorces de 26 nucléotides, possédant un site de restriction à leur extrémité 5', ont été synthétisées à l'aide d'un synthétiseur d'ADN, système Cyclone (Milligène). Les séquences de ces amorces ont été établies en recherchant des séquences homologues entre les ADNc correspondant aux attacines basique et acide de *H. cecropia*. (KOCKUM et al 1984). (annexe 3)

5'CTC GAA TTC TAC CTC (A-T)GG TGC TGT GG 3'

5'CCG ATC GAT GG(T-C) TCC CA(A-C) GAG GAC TT 3'

Le principe de la synthèse d'ADN, repose sur l'utilisation de B-cyanoéthyl phosphoramidate nucléotide. Un premier nucléotide est fixé sur un support de billes de verre par son extrémité 3'. L'extrémité 5' est protégée par un groupement diméthoxytrityl (D.M.T.). La première étape du cycle consiste à éliminer cette protection grâce à l'acide dichloroacétique (A.C.D.) pour permettre dans un deuxième temps, le couplage avec un B-cyanoéthyl phosphoramidite nucléotide en présence de tétrazole qui agit comme activateur de la réaction chimique. Le phosphore est rendu pentavalent par oxydation à l'iode , et un nouveau cycle peut alors être reconduit.

Le cycle de polymérisation est résumé sur le schéma suivant :



Lorsque le polynucléotide est achevé, l'extrémité 5'OH libre est protégée par l'anhydride acétique (A) (étape de "capping").

Aux extrémités 5' de chaque oligonucléotide se trouve 1 site de restriction, *EcoRI* ou *ClaI*, en vue de l'intégration ultérieure du fragment amplifié dans le gène marqueur galactosidase d'un vecteur de clonage de type Bluescript II (Stratagène).

3.3. Amplification de séquence par Polymerase Chain Reaction

Les amplifications par P.C.R. (Annexe 4) sont réalisées selon le protocole classique de KUMAR. (1989), résumé ci-après: 50 μl de mélange réactionnel contenant de l'ADN génomique (1 μg), 325 ng de chaque amorce, du chlorure de magnésium (2 à 5 mM en concentration finale, selon essai), 5 μl de tampon de réaction (10x) (Tris.HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl_2 1,5 mM; gélatine 0,01% p/v) 100 μm de chaque désoxynucléotide (dATP, dTTP, dCTC, dGTP) et 2,5

unités d'enzyme Taq polymérase (Cetus), sont recouverts d'une goutte d'huile de paraffine, puis soumis à 25 cycles d'amplification dans un bain thermostatique programmable (PHC II, Techne OSI). Chaque cycle comprend :

- une incubation de 10 minutes à 95°C (dénaturation des brins cibles)
- une incubation de 3 minutes à 45°C (appariement des amorces)
- une incubation de 2 minutes à 70°C (extension à partir des amorces).

Après le 25^{ème} cycle, une dernière incubation de 3 minutes à 70°C permet l'élongation totale de tous les brins inachevés.

Les échantillons sont ensuite refroidis à température ambiante, l'huile de paraffine est enlevée par dissolution dans l'éthéroxyde et 10 µl de chaque échantillon sont déposés sur un gel d'agarose à 2% puis soumis à l'électrophorèse (40 minutes, 10 volts/cm).

3.4. Purification des fragments amplifiés

Après coloration du gel au Bromure d'Ethidium (Br Et), les bandes sont visualisées par illumination avec des rayons ultra-violets et découpées finement avec un scalpel. L'ADN est extrait de l'agarose en utilisant le kit Geneclean (Ozyme): chaque morceau d'agarose est dissous dans deux fois son volume de NaI par chauffage à 50°C (7 minutes environ) 1 µl de billes Geneclean pour 100 µl de NaI est ajouté dans chaque tube. Au cours des 10 minutes d'incubation dans la glace, l'ADN se fixe sur les billes. Une brève centrifugation (5 à 10 secondes, centrifugeuse Eppendorf 5412) permet la mise au culot des billes et l'élimination du surnageant. Le culot est lavé ainsi à trois reprises dans 0,5 ml de solution. Les billes et l'ADN absorbés sont alors repris dans 20 µl de tampon T.E. (pH 8) et incubés 5 minutes à 50°C, afin de décrocher l'ADN. Après centrifugation (1 minute à 11 000g), les billes sont mises au culot et le surnageant est prélevé. La présence et la pureté des fragments amplifiés sont contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

RESULTATS

IV - RESULTATS

1 - Préparation d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'hémolymph de crevette *Penaeus japonicus*

Selon la technique d'hybridation lymphocytaire, des Ac Mc spécifiques ont été préparés après immunisation sélective de souris vis-à-vis d'hémolymph de *P. japonicus*.

1.1. Etat d'immunisation des souris

L'état d'immunisation des souris Balb/C a été déterminé 13 jours après le dernier rappel, délai qui correspond généralement au maximum de production d'immunoglobulines par les lymphocytes stimulés. Les dilutions limites des sérums auxquelles une fluorescence spécifique est observée, sont égales respectivement à 1/1000 et 1/500. La souris correspondant au titre le plus élevé (1/1000) a été sélectionnée pour la fusion.

1.2. Fusion

345 millions de lymphocytes ont été obtenus à partir de la rate de la souris sélectionnée et fusionnés à 69 millions de cellules myélomateuses.

Les résultats concernant l'obtention des hybridomes sont récapitulés dans le tableau 2, en distinguant les conditions d'ensemencement correspondant à 100 000 cellules par puits (A1), 50 000 cellules par puits (A2) et 25 000 cellules par puits (A3). Le taux d'obtention d'hybridomes est de l'ordre de $1,06 \times 10^{-5}$ évalué à partir du nombre de puits contenant des hybridomes dans les conditions A2.

L'analyse de ces résultats, à l'aide des formules établies par PAOLUCCI (1983), montre que l'ensemencement des puits avec 50 000 cellules est plus performant du point de vue de la notion de préclonage, puisque 72,29% (33,4/46,2) des puits contenant des hybridomes sont préclonés pour la condition de culture A2 (Tableau 1 et Figure 2).

Conditions de culture	Nbre de puits	K=0 pK=F	m	K=1 pK	K>2 pK	Nbre de puits avec des hybridomes
A 1	768	15,2%	1,88	28,6%	56,2%	651
A 2	1 056	53,8%	0,62	33,4%	12,8%	488
A 3	1 056	64,0%	0,44	28,2%	7,8%	380

Ensemencement des puits suite à la fusion :

A1 100 000 cellules/puits

A2 50 000 cellules/puits

A3 25 000 cellules/puits

m = moyenne du nombre de clones différents par puits : $m = -\ln \frac{F}{100}$

F = % de puits ne contenant pas d'hybridomes

K = nombre de clones différents par puits

pK = % puits contenant K clones différents par puits

$$pK = 100 \times \frac{(m)^K}{K} \times \frac{F}{100}$$

(Paolucci, 1983).

TABLEAU 1 : Estimations des nombres de puits contenant K clones différents d'hybridomes, pour les conditions de culture retenues, en fonction du nombre moyen de clones différents par puits de culture.

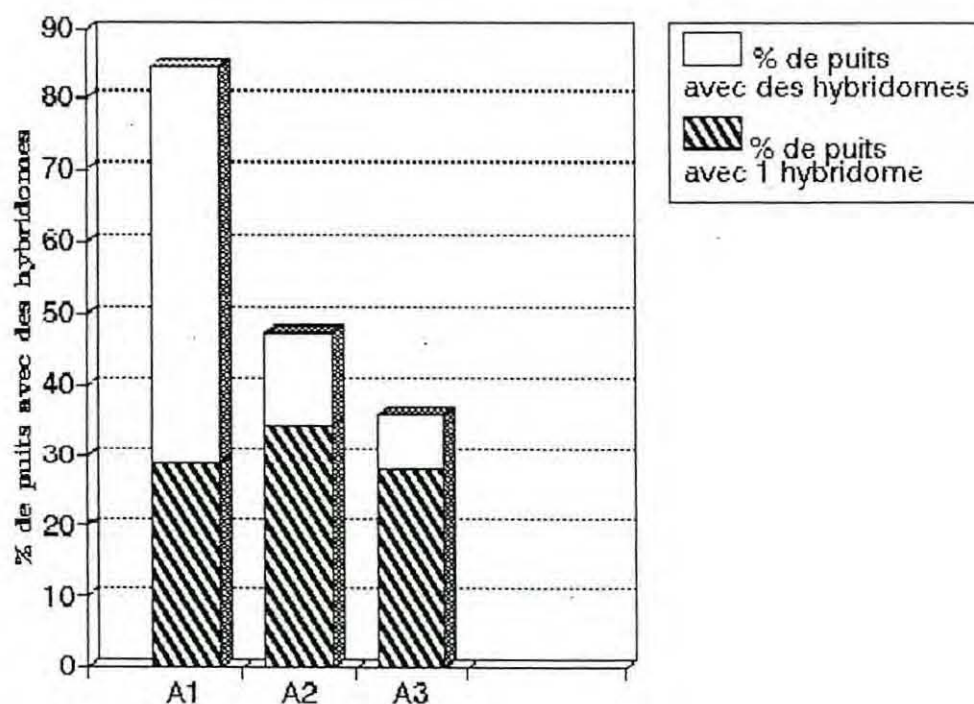


FIGURE 2 : Pourcentages de puits contenant des hybridomes préclonés (▨) estimés à partir des pourcentages de puits contenant des hybridomes (□) observés dans les ensemencements :

A 1 : 100 000 cellules/puits

A 2 : 50 000 cellules/puits

A 3 : 25 000 cellules/puits

L'intérêt pratique de ce préclonage est à souligner car l'individualisation initiale des hybridomes confère un caractère monoclonal immédiat aux anticorps sécrétés dans les différents puits. Ainsi, les difficultés liées à la présence de plusieurs hybridomes dans un même puits sont évitées lors du criblage des hybridomes, qu'il s'agisse de la sécrétion simultanée d'anticorps de spécificités différentes, ou de l'élimination progressive d'un hybridome intéressant par un autre qui ne le serait pas mais qui se développerait plus rapidement.

1.3. Criblage des hybridomes

La croissance des hybridomes ayant été assez homogène, leur criblage a pu être effectué en une seule opération. En bilan, 72 hybridomes ont été sélectionnés, (31 de la condition de culture A1 et 41 de la condition de culture A2). La technique d'immunofluorescence indirecte, retenue pour le criblage, a été particulièrement performante car elle a permis de tester 440 surnageants de culture et de sélectionner avec certitude les hybridomes spécifiques d'antigènes de l'hémolymph.

1.4. Clonage et contrôle de la spécificité

Selon la technique des dilutions limites, les hybridomes contenus dans 18 puits de culture, ont été clonés. Après vérification en immunofluorescence indirecte de leur spécificité, 21 clones ont été retenus. Ils ont été ensuite congelés et produits en ascite sur souris.

1.5. Détermination des profils de fluorescence

L'analyse des profils de fluorescence observés pour ces 21 hybridomes clonés révèle qu'ils constituent un éventail de réactifs spécifiques de différents déterminants antigéniques de l'hémolymph de *P. japonicus*

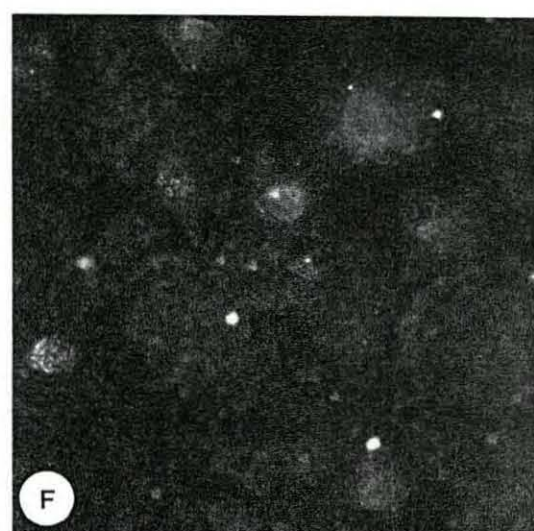
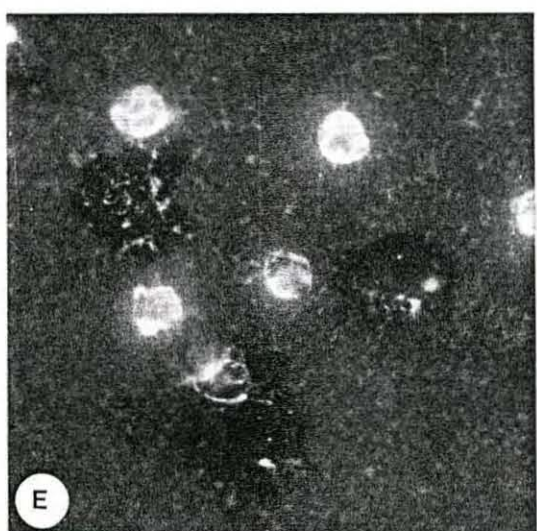
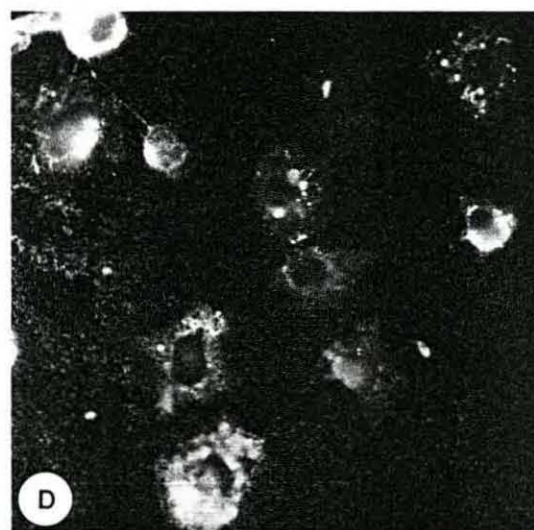
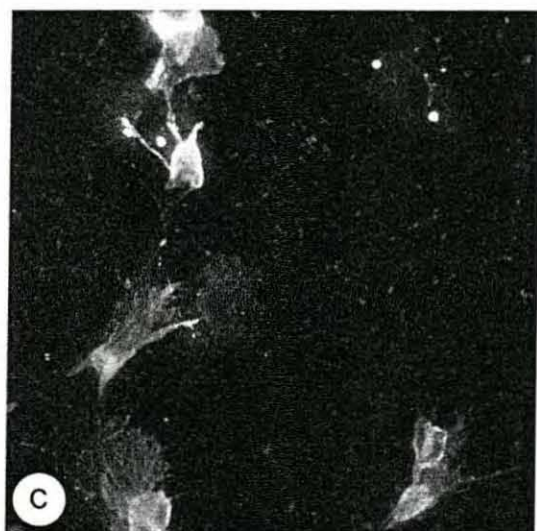
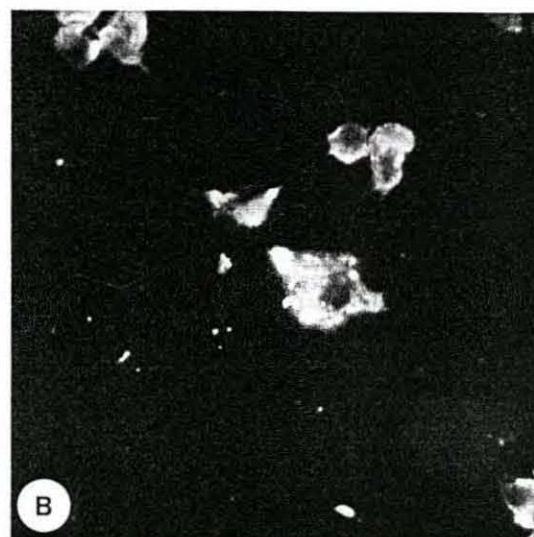
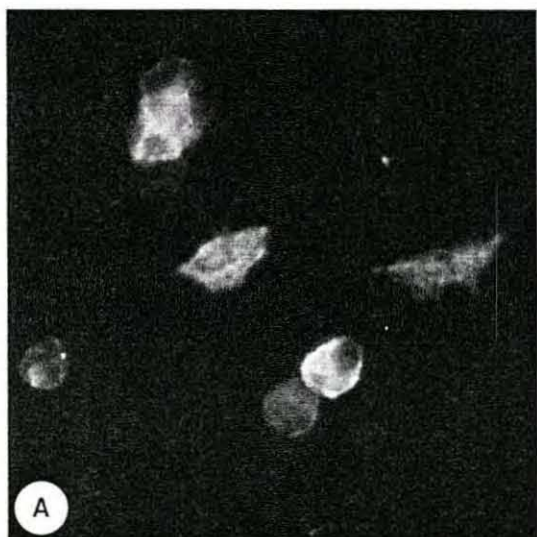
Certains anticorps monoclonaux semblent spécifiques de différents types hématocytaires, d'organites ou de granulations cytoplasmiques, une majorité d'hybridomes étant spécifique de sécrétions des hématocytes et de protéines plasmatiques (Figure 3).

FIGURE 3 : Profils de fluorescence d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'hémolymphe de *Penaeus japonicus* (primoculture d'hémocytes) (X 800).

A-B : Anticorps spécifiques de types hématocytaires.

C-D-E : Anticorps spécifiques des produits de sécrétion de certains types cellulaires.

F : Anticorps spécifiques de protéines plasmatiques.



2 – Extractions d'A.D.N. génomiques de *Penaeus japonicus* et de *Hyalophora cecropia*.

Le protocole d'extraction et de purification d'ADN génomique à partir de branchies de deux crevettes a permis d'obtenir 285 μg d'ADN, estimés sur la base d'une absorbance égale à une unité de D.O (260 nm) pour une concentration d'acides nucléiques de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Le degré de pureté de l'ADN a été vérifié en estimant le rapport des absorbances à 260 nm et à 280 nm dont la valeur de 1,46 confère à cette préparation d'ADN une qualité suffisante pour pratiquer une amplification de gène.

La quantité d'ADN purifié à partir de deux pupes de *H. cecropia*, est égale à 144,5 μg , avec un rapport d'absorbance 260/280 nm égal à 1,42.

3 – Amplification

Une première série d'essais a permis de déterminer l'effet de la concentration en MgCl_2 sur la mise en évidence de fragments amplifiés par la Taq polymérase, chez les espèces *P. japonicus* et *H. cecropia* (tableau 2).

Avec 1 μg d'ADN total, chez *H. cecropia*, une concentration optimale en MgCl_2 de 3mM permet de visualiser 2 bandes majeures situées entre les marqueurs de poids moléculaires de 1000 pb et 516 pb. Chez *P. japonicus*, une seule bande est obtenue qui correspond au marqueur de 516 pb, la concentration optimale en MgCl_2 étant de 4mM (Figure 4).

Les bandes visualisées chez chacune des deux espèces sont extraites de l'agarose en utilisant le kit Geneclean. La pureté de ces bandes est vérifiée de nouveau sur gel d'agarose.

		<i>P. japonicus</i>			<i>H. cecropia</i>				T
Echantillons		1	2	3	4	5	6	7	
A D N	µg	1	1	1	1	1	1	1	6µl T.E
Amorce 1	µl	1	1	1	1	1	1	1	1
Amorce 2	µl	1	1	1	1	1	1	1	1
Tampon x 10	µl	5	5	5	5	5	5	5	5
Mgcl ₂ 10mM	µl soit	10 3,5mM	12,5 4mM	15 4,5mM	2,5 2mM	5 2,5mM	7,5 3mM	10 3,5mM	10 3,5mM
H ₂ O qsp 50	µl	27	24,5	22	34,5	32	29,5	27	27

1er cycle : 95°C 10'
45°C 3'

Enzyme (CETUS) 2,5 U. µl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
dNTPls								
1 mix µl	1	1	1	1	1	1	1	1

2ème cycle : 70°C 2'
3ème cycle : 92°C 2'
45°C 2'
70°C 2'
4ème cycle : 70°C 3'
18°C 1'

TABLEAU 2 : Protocole d'amplification enzymatique (P.C.R.) des séquences de type attacine dans l'A.D.N. génomique de *Penaeus japonicus* et *Hyalophora cecropia*.



FIGURE 4 : Détection sur gel d'agarose des fragments amplifiés par P.C.R. avec des amorces de type attacine; A.D.N. génomiques de *Hyalophora cecropia* (bandes 1, 2, 3, 4,) et de *Penaeus japonicus* (bandes 5, 6, 7) ; concentrations en Mg Cl₂ (mM) (1 3,5; 2 3,0; 3 2,5; 4 2,0; 5 4,5; 6 4,0; 7 3,5).

T : Témoin négatif (T.E. 6 µl, Mg Cl₂ 3,5 mM)

M : Marqueur de poids moléculaire d'A.D.N., échelle 1 KB (B.R.L).

DISCUSSION
ET
CONCLUSION

V - DISCUSSION - CONCLUSION

Dans un premier temps, la préparation d'Ac Mc a été entreprise en vue de disposer de réactifs spécifiques pour l'étude des effecteurs de l'immunité.

Les ponctions d'hémolymphe de *P. japonicus* ont été réalisées dans une solution modifiée d'Alsever (SMA), solution antiaggrégante efficace chez les Mollusques Bivalves (BACHERE et al, 1988) qui s'est révélée assez performante pour inhiber les phénomènes de coagulation et de mélanisation très développés chez les Arthropodes (SÖDERHÄLL and SMITH, 1986). Les suspensions d'hémolymphe ponctionnées dans cette solution, puis rediluées dans de l'eau de mer filtrée ont permis l'établissement de primocultures d'hémocytes, les cellules retrouvant après quelques minutes leur capacité d'adhésion et d'étalement sur les lames. La réversibilité des propriétés inhibitrices de la SMA nous a conduit à l'utiliser, d'une part pour la préparation des suspensions hémocytaires destinées à l'immunisation des souris, d'autre part pour la préparation des primocultures destinées au criblage des hybridomes et à la caractérisation des anticorps monoclonaux produits en ascite.

En ce qui concerne l'hybridation lymphocytaire, il peut être noté que le protocole de criblage des hybridomes s'est révélé performant, son principe ayant été basé sur une technique d'immunofluorescence indirecte pratiquée sur des primocultures d'hémocytes préparées dans des microplaques de 96 puits. En dépit du caractère relativement fastidieux de l'examen microscopique, plusieurs centaines de surnageants d'hybridomes ont pu être testés rapidement, dans un laps de temps compatible avec le délai de clonage des hybridomes sélectionnés. Il faut, à ce sujet, souligner l'intérêt du préclonage des hybridomes qui est assuré en procédant après l'étape de fusion à une répartition des cellules à différentes concentrations. Compte tenu du taux d'hybridation résultant de cette fusion, il s'est avéré que la distribution de 50 000 cellules/puits a conduit à un pourcentage optimal d'hybridomes préclonés. Cette notion de préclonage s'est trouvée confirmée par la spécificité inchangée des hybridomes après clonage. A partir de 72 cultures d'hybridomes sécréteurs d'Ac Mc spécifiques de l'hémolymphe de crevette, 21 clones, dont la spécificité a été confirmée, ont été sélectionnés et produits en ascite.

Sur la base de leur profil de fluorescence en microscopie optique, quelques Ac Mc semblent différencier divers types d'hémocytes et peuvent de ce fait être appliqués à l'établissement des hémogrammes de crevettes. Toutefois, la localisation exacte des épitopes devra être établie en microscopie électronique selon une technique d'immunogold (SLOT and GEUZE, 1984). Les Ac Mc spécifiques d'épitopes membranaires sont particulièrement intéressants pour l'étude fonctionnelle des différents types cellulaires, car ils seront utilisés dans une technique d'immunopurification d'hémocytes, basée sur leur rétention par des anticorps spécifiques couplés à des billes magnétiques (GRIEBEL et al, 1989). Dans le but de favoriser l'obtention d'hybridomes sécréteurs d'Ac Mc spécifiques d'épitopes membranaires, il serait envisageable d'immuniser des souris avec des suspensions antigéniques constituées de membranes cellulaires purifiées à partir d'hémocytes préalablement séparés. En effet, le schéma d'immunisation que nous avons adopté, semble avoir favorisé la production d'hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques de granulations ou de constituants cellulaires cytoplasmiques de type sécrétion. A cet égard, cette collection de réactifs permettra d'étudier les protéines spécifiques qui pourraient être impliquées dans les mécanismes de défense. La caractérisation des poids moléculaires des protéines reconnues par ces Ac Mc sera réalisée par Western-Blot (KIMMEL, 1987) afin de les comparer avec les différentes protéines immunitaires et enzymatiques connues, constitutives notamment du système proPo. Des contacts sont initiés avec des équipes travaillant dans ce domaine pour tester les Ac Mc dont nous disposons vis-à-vis d'effecteurs immunitaires identifiés et déjà purifiés chez les Insectes (ASHIDA et al, 1982) et chez l'écrevisse *Astacus astacus* (SÖDERHÄLL and SMITH, 1986). Ces Ac MC constituent également des réactifs adaptés à l'immunopurification de protéines spécifiques (BARTHOLOMEN et al, 1982) et par conséquent faciliteront largement leur identification. En outre, il pourra être déterminé si certains Ac Mc sont spécifiques de facteurs à activité antimicrobienne en étudiant leurs effets dans des tests biologiques de neutralisation virale ou bactérienne par de l'hémolymph de crevette.

Dans un deuxième temps, ce travail a consisté chez la crevette *P. japonicus* à rechercher des gènes immunitaires selon une stratégie moléculaire basée sur l'hypothèse

d'existence d'homologies de séquences avec des gènes identifiés chez les Insectes ou chez des Vertébrés. En effet, chez les Insectes, la mise en évidence par des tests biologiques d'activités antibactériennes puis la caractérisation et la purification des facteurs responsables ont été suivies dans un certain nombre de cas, par l'établissement des séquences au niveau des acides aminés et au niveau des nucléotides. La disponibilité de telles données permettaient donc de rechercher directement si des gènes correspondants étaient présents dans le génome de *P. japonicus* par la technique d'amplification enzymatique de PCR, des amorces étant choisies dans des zones homologues pour les différentes séquences déjà connues (SAKANARI et al, 1989).

Cette stratégie de recherche de gène immunitaire, originale chez les Crustacés, a été abordée initialement en prenant en compte comme référence les trois classes de peptides antimicrobiens, identifiées chez *H. cecropia*, lysozyme, cecropines et attacines. Le choix du gène cible s'est alors basé sur une analyse bibliographique et sur une recherche sur banques de données des séquences disponibles au niveau acides aminés ou au mieux au niveau nucléotidique. Pour le lysozyme qui est une molécule antibactérienne très répandue dans le règne animal, l'alignement de séquences en acides aminés prises dans divers phylums(Chordés, Echinodermes, Arthropodes), a révélé des homologies relativement limitées. Cette difficulté, accentuée par la dégénérescence du code génétique rendait aléatoire le choix de séquences utilisables comme amorces oligonucléotidiques. Les cécropines sont des petits peptides basiques d'une trentaine d'acides aminés qui ont été mises en évidence chez diverses espèces d'Insectes et très récemment chez le porc (LEE et al, 1989), au niveau de l'intestin, ce peptide ayant été rattaché à la classe des cécropines sur la base d'une homologie en acides aminés de l'ordre de 33%. Ces informations étant limitées aux séquences en acides aminés, il s'est avéré, comme pour le lysozyme, difficile de sélectionner des amorces. En ce qui concerne les attacines, six protéines ont été purifiées et séquencées chez *H. cecropia*, l'analyse des séquences N- terminales révélant l'existence de deux gènes seulement, l'un codant pour les attacines acides, l'autre pour les attacines basiques (KOCKUM et al, 1984). Récemment la séquence a été établie pour un clone d'ADNc complet correspondant à l'attacine basique dont l'expression dans un vecteur baculovirus a montré qu'il codait pour une préproattacine (GUNNE et al, 1990). Cette disponibilité d'informations au

niveau nucléotidique a facilité le choix des deux amorces utilisées pour la PCR qui ont été prises dans la partie codante pour les peptides matures, correspondant à des zones de fortes homologies entre les deux gènes d'attacines.

Dans nos expériences avec l'espèce *H. cecropia*, qui a constitué le témoin positif de notre recherche de gène, deux fragments d'ADN génomiques sont amplifiés par PCR qui pourraient correspondre aux deux gènes d'attacines de cette espèce. Les poids moléculaires de ces fragments étant supérieurs à ceux estimés pour les ADNc des deux attacines, la présence d'introns devra être confirmée par comparaison des séquences des fragments amplifiés avec celles des ADNc. Ces informations ont été transmises au Dr. Boman spécialiste des attacines qui nous a fourni les pupes de *H. cecropia*. Chez *P. japonicus*, une seule bande est obtenue, dont la taille de l'ordre de 516 paires de bases correspond à celle prévue au niveau des ADNc pour le fragment compris entre les deux amorces, ce qui indiquerait l'absence d'introns. Ces premiers résultats confèrent un caractère original à la technique de PCR appliquée à l'immunologie des Crustacés. Cependant, il est indispensable de vérifier la nature attacine de ce fragment en poursuivant sa caractérisation par le séquençage et la comparaison avec les séquences établies chez *H. cecropia*. Les sites de restriction, *EcoRI* et *ClaI*, insérés dans les amorces, et donc présents aux extrémités des fragments amplifiés permettront les opérations directes de clonage et de séquençage (SAKANARI et al, 1989). A plus long terme, si sa nature attacine est prouvée, ce fragment amplifié cloné, constituera une sonde adaptée d'une part pour l'isolement des molécules d'ARN messenger spécifiques par hybridation sélective (JAGUS, 1987) et d'autre part pour préciser par hybridation *in situ* les sites de synthèse. La caractérisation des séquences latérales du fragment amplifié correspondant aux parties 5' et 3' du gène attacine de crevette pourrait être abordée en appliquant la technique de PCR Inverse (OCHMAN et al, 1990) au fragment d'ADN génomique préalablement sélectionné par Southern-Blot.

Cette approche, qui pourrait être extrapolée à d'autres gènes immunitaires, mérite d'être prise en compte quant à ses applications en aquaculture. A cet égard, les programmes développés en agronomie constituent un domaine de références, puisque des recherches sont axées sur l'obtention de plantes transgéniques exprimant des gènes antibactériens d'insectes

(JAYNES et al, 1987). En outre l'utilisation de ces protéines produites par génie génétique peut être envisagée en tant que bactéricides spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ASHIDA, M., IWAMA, R., IWAHANA, H. and YOSHIDA, H. 1982. Control and function of the prophenoloxidase activating system. In Proceedings of 3rd International Colloquium on Invertebrate Pathology. PAYNE, C.C. and BURGESS H.D., eds, University of Sussex, Brighton, pp 81-86.
- BACHERE, E., CHAGOT, D. and GRIZEL, H., 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. Dev. Comp. Immunol., 12 : 549-559.
- BARTHOLOMEN, R., BEIDLER, D. and DAVID, G., 1982. Immunoaffinity chromatography with monoclonal antibodies. In Peptides of the biological fluids, Proc. 30 th Colloq.Brussels. PECTERS, H.,ed, Pergamon Press, Oxford, pp 667-670.
- BATICADOS, M.C.L., LIO-PO, G.D. and GACUTAN, R.Q., 1978. Notes on the primary isolation of *Lagenidium* from *Penaeus monodon* larvae. Q. Res. Rep. SEAFDEC, Aquaculture Dept., 1(4) : 9-10.
- BIAN, B.Z. and EGUSA, S., 1981. Histopathology of black gill disease caused by *Fusarium solani* (MARTIUS) infection in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. J. Fish. Disease., 4 : 195-201.
- BOMAN, H.G. and HULTMARK, D., 1987. Cell-free immunity in insects. Ann. Rev. Microbiol., 41 : 103-126.
- CRIADO-FORNELIO, A., CHAGOT, D., CONSTANTIN, E., MIALHE, E., and GRIZEL, H., 1988. An outbreak of vibrio disease in hatchery reared *Penaeus vannamei* larvae. In Proceeding of 3rd International Colloquium of pathology in Marine Aquaculture., 2-6 Oct, Gloucester Point, VA. (U.S.A.). pp 19.
- DIMARCQ, J.L., KEPPI, E., DUNBAR, B., LAMBERT, J., REICHHART, J.M., HOFFMANN, D., RANKINE, S.M., FOTHERGILL, J.E. and HOFFMANN, J.A., 1988. Purification and characterization of family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipteracin A. Eur. J. Biochem., 171 : 17-22.
- GRIEBEL, P.J., GEE, A., QUATIERE, L., LAWMAN, M.J.P., and BADIUK, L.A., 1989. Negative enrichment of bovine T lymphocytes with monoclonal antibodies and magnetic microspheres. Veterinary Immunology and Immunopathology., 2 : 161-173.

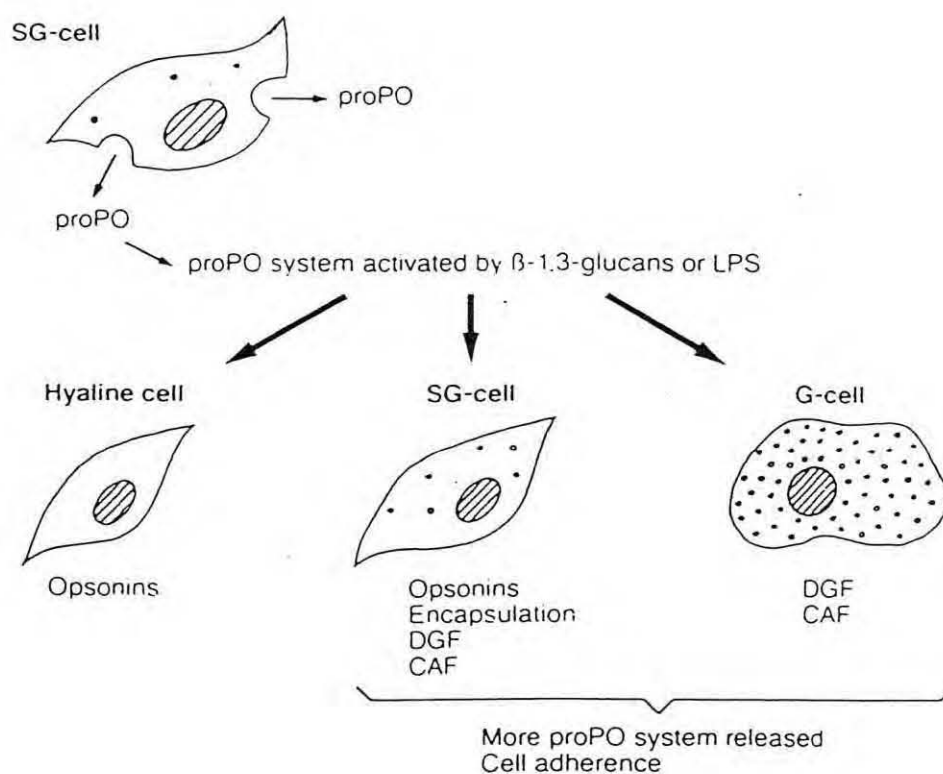
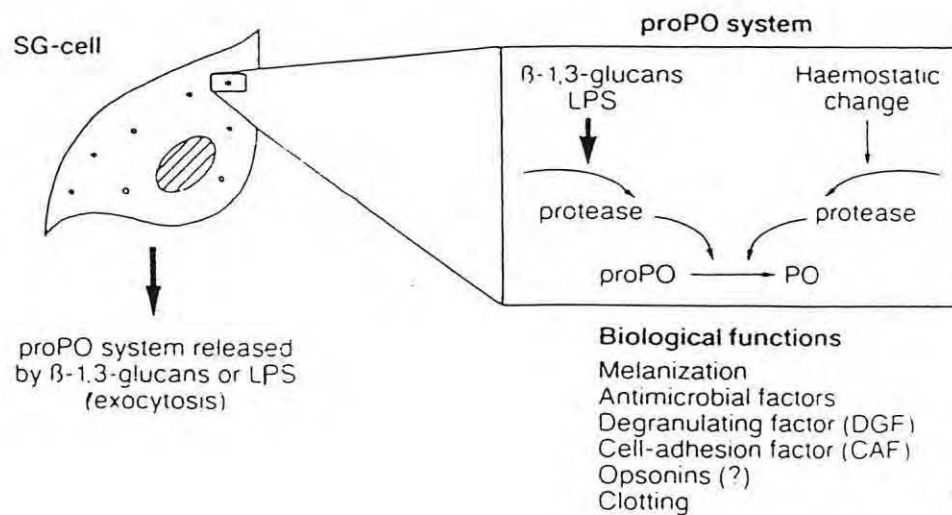
- GUNNE, H., HELLERS, M. and STEINER, H. 1990., Structure of preproattacin and its processing in insect cell infected with a recombinant baculovirus. *Eur. J. Biochem.*, 187 : 699-703.
- JAGUS, R., 1987. Hybrid selection of mRNA and hybrid arrest of translation. In *Methods in Enzymology*. BERGER, S.L. and KIMMEL, A.R., eds, 152 : 567.
- JAYNES, J.M., XANTHOPOULOS, K.G., DESTEFANO-BELTRAN, L. and DODDS, J.H., 1987. Increasing bacterial disease resistance in plants utilizing antibacterial genes from insects. *Bio.Essays.*, 6 : 263-270.
- JOHANSSON, M.W. and SÖDERHÄLL, K., 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today.*, 5 : 171-175.
- JEANPIERRE, M., 1987. A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nuc. Ac. Res.*, 22 : 9611.
- KOCKUM, K., FAYE, I., HOFSTEN, P.V., LEE, J.Y., XANTHOPOULOS, K.G. and BOMAN, H.G., 1984. Insect immunity. Isolation and sequence of two cDNA clones corresponding to acidic basic attacins from *Hyalophora cecropia*. *The EMBO journal.*, 3 : 2071-2075.
- KOLHER, G., and MILSTEIN, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature.*, 256 : 495-497.
- KUMAR, R., 1989. The technique of Polymerase Chain Reaction. *J. Meth.Cell Molec. Biol.*, 1 (3) : 133-152.
- LANDEGREEN, U., KAISER, R., THOMAS CASKEY, C. and HOOD, L., 1988. DNA diagnostics. Molecular techniques and automation. *Science*, 242 : 229-237.
- LEE, J.Y., BOMAN, A., CHUANXIN, S., ANDERSON, M., JÖRNVALL, H., MUTT, V. and BOMAN, H.G., 1989. Antibacterial peptides from pig intestine: Isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86 : 9159-9162.
- LIGHTNER, D.V., 1983. Diseases of cultured penaeid shrimp. In *Handbook of Mariculture*. McVEY, J.V., ed, 1 : 289-320.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. and SAMBROOK, J., 1982. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor., ed, pp 545.
- MIALHE, E., BOULO, V., GRIZEL, H., ROGIER, H. and PAOLUCCI, F., 1988. Monoclonal antibodies: A tool for molluscan pathology. In " *Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs.*" FISHER, W.S., ed, American Fisheries Society, Special Publication., 18 : 304-310.

- MOUREAU, C.E. et CECCALDI, H.J., 1985. Variations circadiennes des acides aminés libres de l'hémolymph de *Penaeus japonicus*. Bioch. Syst. Ecol., 13 : 35-40.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, G., HORN, G. and ERLICH, H. ,1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* : the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51 : 263-273.
- NOEL, T., AUBREE, E., MIALHE, E., PANATIER, B., FLAMION, G., GRIZEL, H., 1989. Aqua-plak: A new tool for bacteriological survey in aquaculture. EAS Special Publication N°10 : 193-194.
- OCHMAN, H., MEDHORA, M.M., GARZA, D. and HARTL, D.L., 1990. Amplification of flanking sequences by inverse PCR. In PCR Protocols A Guide to Methods and applications, part Two. Innis, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J. and WHITE, T.J., eds, pp 219-227.
- PAOLUCCI, F., 1983. Optimisation des techniques de préparation des anticorps monoclonaux par hybridation lymphocytaire. Rapport de DEA Option Immunologie, Université de Montpellier, pp 95.
- REICHHART, J.M., ESSRICH, M., DIMARCQ, J.L., HOFFMANN, D., HOFFMANN, J.A. and LAGUEUX, M., 1989. Insect immunity. Isolation of cDNA clones corresponding to dipterin, an inducible antibacterial peptide from *Phormia terranova* (Diptera). Eur. J. Biochem., 182 : 423-427.
- SAKANARI, J.A., STAUNTON, C.E., EAKIN, A.E., CRAIK, C.S. and McKERROW, J.H., 1989. Serine proteases from nematode and protozoan parasites: Isolation of sequence homologs using generic molecular probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86 : 4863-4867.
- SCHONHERR, O.T. and HOUWINK, E.H., 1984. Antibody engineering, a strategy for the development of monoclonal antibodies. Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol., 50 : 597-623.
- SLOT, J.W. and GEUZE, H.J., 1984. Gold markers for single and double In immunolabelling of ultrathin cryosections. Immunolabelling for Electron Microscopy. POLAK, J.M. and VARNDELL, I.M., eds, Elsevier Science Publishers B.P, pp 129-142.
- SÖDERHÄL, K. and SMITH, V.J.,1983. Separation of haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunol., 7 : 229-239.
- SÖDERHÄL, K. and SMITH, V., 1986. Prophenoloxidase-activating cascade as a recognition and defense system in arthropods. In Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods. GUPTA, A.P., ed, pp 251-285.

- SÖDERHÄL, K. and SMITH, V.J., 1986. The prophenoloxidase system: The biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity with special references to crustaceans. In Immunity in Invertebrates. BREHELIN, M., ed, pp 208-225.
- TSING, A., ARCIER, J.M. and BREHELIN, M., 1989 Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry, and hemograms. J. Invert. Pathol., 53 : 64-77.
- VAZQUEZ-BOUCARD, C.G., MOUREAU, C.E. et CECCALDI, H.J., 1985. Etude préliminaire des variations circadiennes des protéines de l'hémolymph de *Penaeus japonicus* Bate. J. Exp. Mar. Ecol., 85 : 123-133.
- XANTHOPOULOS, K.G., LEE, J.Y., GAN, R., KOCKUM, K., FAYE, I. and BOMAN, H., 1988. The structure of the gene for cecropin B, an antibacterial immune protein from *Hyalophora cecropia*. Eur. J. Biochem., 172 : 371-376.
- YOSHINO, R.H. and GRANATH, W.O., 1983. Identification of antigenically distinct hemocyte in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers. Cell Tissue Res., 232 : 553-564.

ANNEXES

ANNEXE 1



Communication cellulaire et activation du système proPo chez l'écrevisse *Astacus astacus*

(D'après JOHANSSON, M W. et SÖDERÄL, K., 1989)

ANNEXE 2

Figure a : Principe de l'hybridation lymphocytaire.

Les anticorps monoclonaux sont caractérisés par leur spécificité vis-à-vis de l'hémolymph de *P. japonicus*, c'est-à-dire par leur capacité à discriminer des déterminants antigéniques peu différents. La production, quasi illimitée de ces Ac Mc repose sur l'immortalisation et le clonage de lymphocytes sécréteurs d'anticorps. Cette immortalisation est le plus souvent réalisée selon la technique d'hybridation lymphocytaire (KOLHER et MILSTEIN, 1975), qui consiste à fusionner des lymphocytes B producteurs d'anticorps avec des cellules myélomateuses à multiplication illimitée. Les hybridomes résultant présentent les 2 types de caractères parentaux : sécrétion d'Ac, d'une part, et multiplication illimitée, d'autre part.

Figure b : Les deux voies de synthèse de nucléotides de l'ADN.

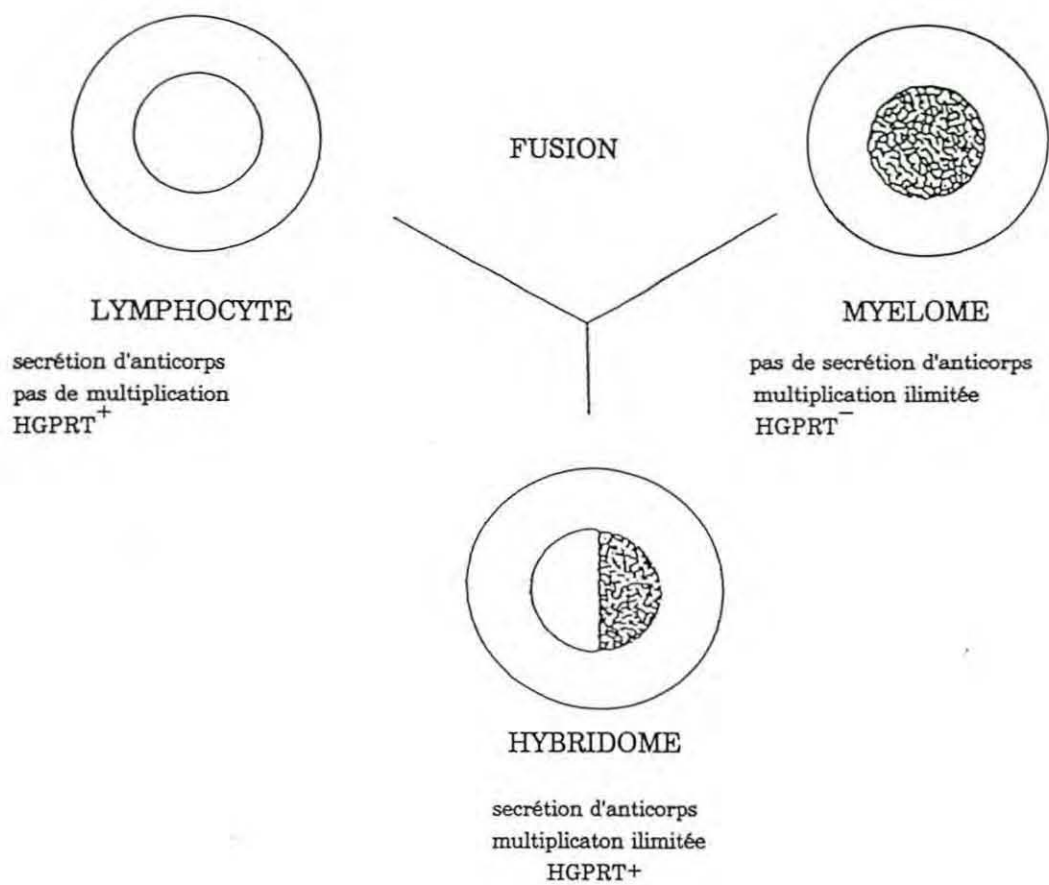


FIGURE a: Principe de l'hybridation lymphocytaire

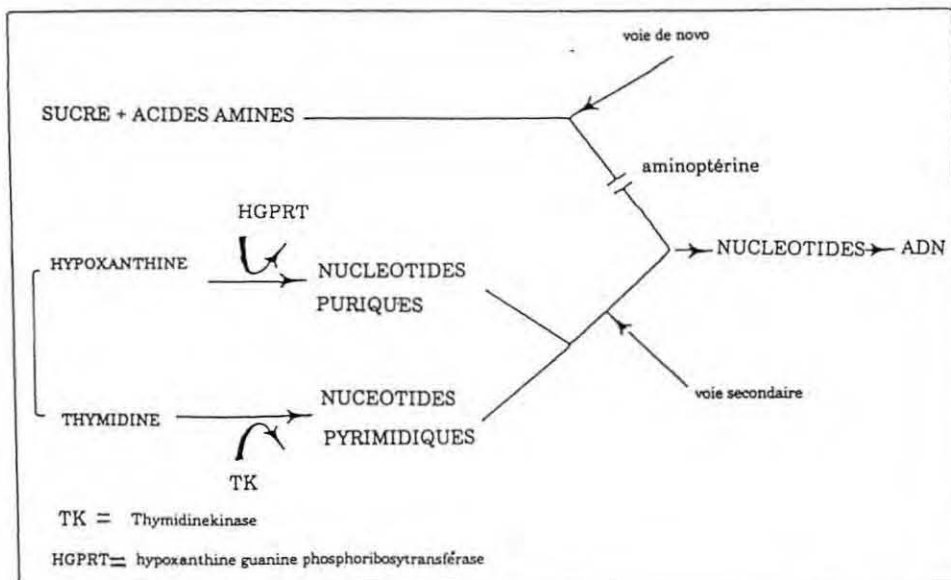


FIGURE b : Voies de synthèse de nucléotides de l'ADN

ANNEXE 3

GTC TTG GTT GGC GTC AAC AGC CGG TAC GTG CTC GTT GAA GAG CCT GGT TAC TAT GAC AAA CAG TAC GAG GAA
VAL LEU VAL GLY VAL ASN SER ARG TYR VAL LEU VAL GLU GLU PRO GLY TYR TYR ASP LYS GLN TYR GLU GLU
pCP517

CAG CCG CAG CAG TGG GTC AAC TCC AGA GTA CGT CGG CAA GCG GGT GCT CTC ACT ATC AAC TCT GAC GGT ACC
GLN PRO GLN GLN TRP VAL ASN SER ARG VAL ARG ARG GLN ALA GLY ALA LEU THR ILE ASN SER ASP GLY THR
pCP521 Basic Attacin
ASP ALA HIS GLY ALA LEU THR LEU ASN SER ASP GLY THR
GAC GCG CAC GGA GCC CTT ACG CTC AAC TCC GAT GGT ACC 10
Acidic Attacin

TCA GGT GCT GTG GTC AAG GTA CCT ATA ACT GGG AAT GAA AAC CAC AAG TTC AGT GCT CTT GGC TCC GTT GAT
SER GLY ALA VAL VAL LYS VAL PRO ILE THR GLY ASN GLU ASN HIS LYS PHE SER ALA LEU GLY SER VAL ASP
SER GLY ALA VAL VAL LYS VAL PRO PHE ALA GLY ASN ASP LYS ASN ILE VAL SER ALA ILE GLY SER VAL ASP
TCT GGT GCT GTG GTT AAA GTA CCC TTT GCT GGT AAC GAC AAG AAT ATA GTA AGC GCT ATC GGT TCC GTA GAC
20 30

CTT ACT AAC CAA ATG AAA TTG GGA GCT GCT ACA GCT GGA TTG GCT TAT GAC AAC GTC AAC GGA CAC GGA GCG
LEU THR ASN GLN MET LYS LEU GLY ALA ALA THR ALA GLY LEU ALA TYR ASP ASN VAL ASN GLY HIS GLY ALA
LEU THR ASP ARG GLN LYS LEU GLY ALA ALA THR ALA GLY VAL ALA LEU ASP ASN ILE ASN GLY HIS GLY LEU
TTA ACT GAT AGG CAG AAA CTA GGC GCT GCA ACC GCT GGA GTG GCA CTG GAT AAT ATA AAC GGT CAC GGA CTA
40 50 60

ACC CTA ACA AAA ACT CAT ATC CCT GGG TTC GGT GAC AAG ATG ACG GCT GCC GGC AAA GTA AAT CTC TTC CAT
THR LEU THR LYS THR HIS ILE PRO GLY PHE GLY ASP LYS MET THR ALA ALA GLY LYS VAL ASN LEU PHE HIS
SER LEU THR ASP THR HIS ILE PRO GLY PHE GLY ASP LYS MET THR ALA ALA GLY LYS VAL ASN VAL PHE HIS
AGT CTC ACG GAT ACA CAC ATC CCC GGG TTC GGA GAC AAG ATG ACA GCA GCC GGC AAA GTG AAT GTC TTC CAC
70 80

AAC GAC AAC CAC GAT TTC AGT GCC AAA GCA TTC GCC ACT AAA AAC ATG CCA AAT ATT CCT CAA GTT CCG AAC
ASN ASP ASN HIS ASP PHE SER ALA LYS ALA PHE ALA THR LYS ASN MET PRO ASN ILE PRO GLN VAL PRO ASN
ASN ASP ASN HIS ASP ILE THR ALA LYS ALA PHE ALA THR ARG ASN MET PRO ASP ILE ALA ASN VAL PRO ASN
AAT GAT AAC CAC GAC ATC ACA GCG AAG GCT TTC GCC ACC AGA AAC ATG CCG GAT ATT GCT AAT GTA CCT AAT
90 100

TTC AAC ACT GTC GGT GCC GGA GTG GAC TAT ATG TTC AAA GAT AAG ATT GGT GCA TCT GCG AAT GCC GCT CAC
PHE ASN THR VAL GLY ALA GLY VAL ASP TYR MET PHE LYS ASP LYS ILE GLY ALA SER ALA ASN ALA ALA HIS
PHE ASN THR VAL GLY GLY GLY ILE ASP TYR MET PHE LYS ASP LYS ILE GLY ALA SER ALA SER ALA ALA HIS
TTC AAC ACT GTC GGT GGC GGA ATA GAC TAT ATG TTC AAA GAT AAG ATT GGT GCA TCT GCG AGC GCC GCT CAC
110 120 130

ACC GAT TTC ATC AAC CGC AAC GAC TAC TCT CTG GGC GGG AAA CTG AAT CTC TTC AAG ACT CCG ACC ACA TCG
THR ASP PHE ILE ASN ARG ASN ASP TYR SER LEU GLY GLY LYS LEU ASN LEU PHE LYS THR PRO THR THR SER
THR ASP PHE ILE ASN ARG ASN ASP TYR SER LEU ASP GLY LYS LEU ASN LEU PHE LYS THR PRO ASP THR SER
ACG GAC TTT ATC AAT CGC AAC GAC TAC TCT CTT GAC GGG AAA CTG AAC CTC TTC AAG ACT CCT GAT ACC TCG
140 150

CTG GAC TTC AAC GCC GGT TGG AAG AAG TTC GAT ACG CCC TTC TTT AAG TCC TCG TGG GAA CCC AGC ACT AGT
LEU ASP PHE ASN ALA GLY TRP LYS LYS PHE ASP THR PRO PHE PHE LYS SER SER TRP GLU PRO SER THR SER
ILE ASP PHE ASN ALA GLY PHE LYS LYS PHE ASP THR PRO PHE MET LYS SER SER TRP GLU PRO ASN PHE GLY
ATT GAT TTC AAC GCC GGT TTC AAG AAG TTC GAT ACA CCT TTC ATG AAG TCC TCT TGG GAG CCT AAC TTC GGA
160 170 180

TTC TCG TTT TCT AAA TAT TTC
PHE SER PHE SER LYS TYR PHE TAA CTT AAA ACA GTC ATT AAC TTA AAA CGT AAA CTA ATT ATT ACA AAA CTT
PHE SER LEU SER LYS TYR PHE TGA TTA GTA TTT TAA TTT TAA TTC TAT ATA TAT AAA TTT AGA TGT ATA TGT
TTC TCA CTT TCT AAA TAT TTC
188

AAT GTT AAG GGA ACC ATT TTT CTT AAC ATA GTT AAT TGT TTG TAA ATA AAA TAT AAA GTT TTA ATA AAT TGT
ATA TAT ATA TAT TTT TTT TTT ATT AAT ATG ATA TCA CTA AAT GTA TTT ACT CCT TCG ATT ATT ATT ACT TTT

AGT TAC AAA TTG
TTT GTT TAA AGA AGT CCG CCT AAT AAA GAT AAT TTG

Séquences au niveau nucléotides et acides aminés de deux clones d'attacines (pCP 521., pCP 517) correspondant respectivement aux attacines acide et basique de *Hyalophora cecropia*. La ligne entre les séquences est interrompue quand les nucléotides diffèrent (D'après KOCKUM et al., 1984). Les deux amorces (en encart) ont été choisies dans des zones de fortes homologies.

ANNEXE 4

La technique d'amplification enzymatique par P.C.R (MULLIS et al, 1986) est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase. cette enzyme est capable de copier un brin d'ADN, utilisé comme matrice, en un brin complémentaire par élongation à partir de l'extrémité 3' OH libre d'une amorce oligonucléotidique. Cette technique consiste à effectuer n cycles successifs d'amplification de la séquence d'ADN double brin qu'ils encadrent. Un cycle d'amplification est composé de 3 étapes permettant de réaliser successivement la dénaturation de l'ADN (95°C), l'hybridation des amorces (37°C, 55°C) et l'extension des brins d'ADN par l'ADN polymérase. Pour éviter l'addition d'enzymes à chaque cycle, une ADN polymérase pouvant résister à 100°C est utilisée (Taq polymérase).

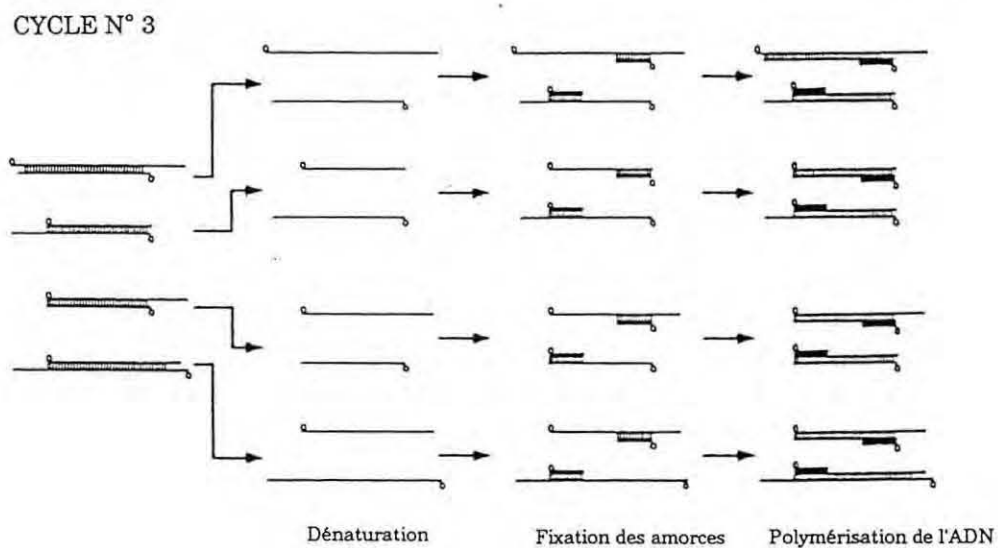
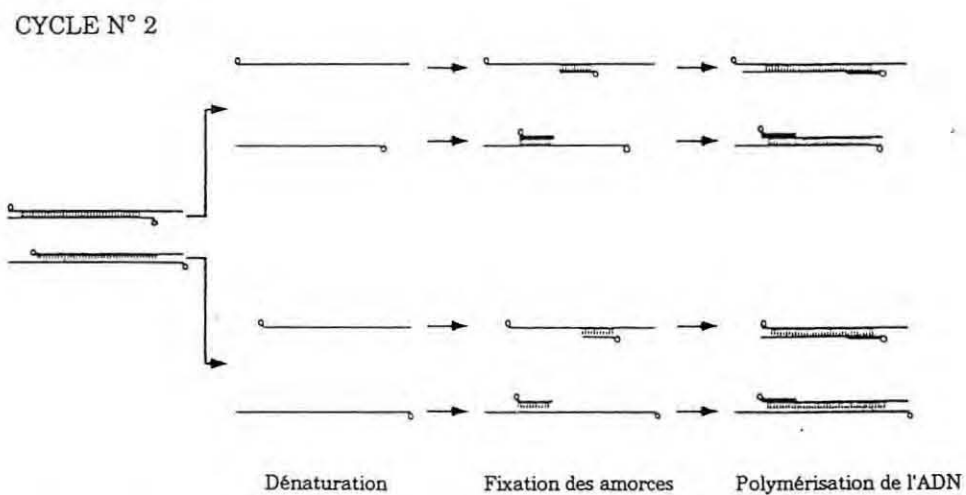
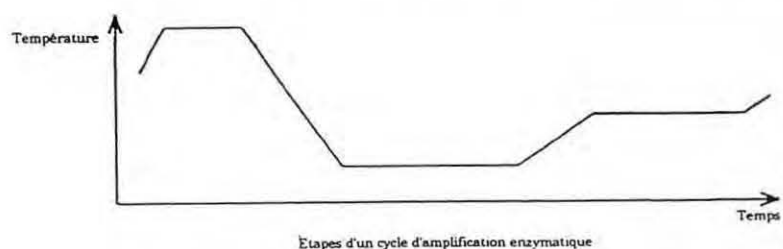
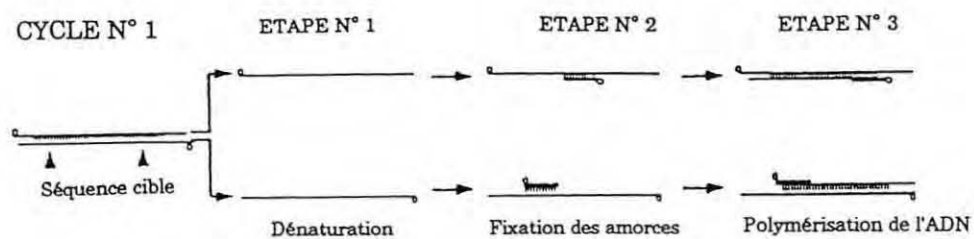


Schéma du principe de 3 cycles successifs d'amplification enzymatique.