

UNIVERSITE DE BORDEAUX II
U.F.R. DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

Année 1992

Thèse n°

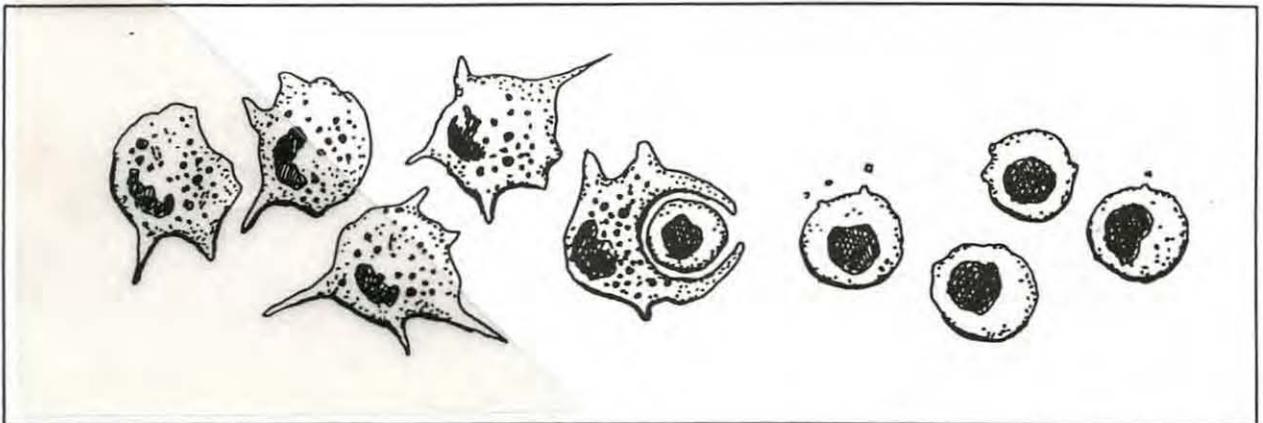
THESE POUR LE
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II
MENTION SCIENCES DE LA VIE, OPTION BIOLOGIE-SANTE

présentée et soutenue publiquement le 26 Octobre 1992

par

Danièle NOEL

ETUDE DES HEMOCYTES
ET D'UNE NEOPLASIE HEMOCYTAIRE
CHEZ LES MOULES *MYTILUS EDULIS*
ET *MYTILUS TROSSULUS* (MOLLUSCA, BIVALVIA)



Membres du jury :

J. BOVE
B. DELAY
B. GUILLEMAIN
E. MIALHE
R. PIPE

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Je dédie cette thèse à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

En premier lieu, je remercie Monsieur Maurice Héral, responsable du Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins d'IFREMER, La Tremblade, de son soutien et des moyens qu'il m'a accordés pour mener à terme ce travail, au sein de l'équipe de l'URPIGM.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur Joseph Bové, Professeur à l'Université de Bordeaux II, d'accepter la présidence de ce jury.

Je suis reconnaissante à Monsieur Bernard Delay, Professeur à l'Université de Montpellier II, qui a accepté avec beaucoup de gentillesse de faire partie de ce jury.

Monsieur Bernard Guillemain, Directeur de Recherches à l'Unité INSERM 117 de Bordeaux, a su percevoir le caractère pionnier des recherches sur les néoplasies d'Invertébrés. Je le remercie pour son intérêt et les conseils qu'il a pu me prodiguer.

Je suis très heureuse de compter dans ce jury Monsieur Richard Pipe, Docteur au Plymouth Marine Laboratory, National Environmental Research Council, Grande-Bretagne, qui m'a accueillie chaleureusement et m'a initiée aux techniques d'immunomarquage à l'or colloïdal.

Monsieur Ralph Elston, Directeur du Laboratoire de Pathologie du Marine Research Laboratory, BATTELLE, USA, n'a pu participer à ce jury. J'aimerais lui exprimer ma profonde reconnaissance pour ses conseils avisés et sa lecture critique du manuscrit. Sans son aide pour l'envoi du matériel biologique, ce travail n'aurait pu être que partiellement réalisé. Enfin, je garde un souvenir particulièrement agréable des deux mois passés au sein de son équipe.

Je suis également reconnaissante à Monsieur Francis Paolucci, responsable du Laboratoire d'Immunodiagnostic de SANOFI-DIAGNOSTIC PASTEUR, Montpellier, et à son équipe pour m'avoir enseigné les bases de la technique d'hybridation lymphocytaire.

J'aimerais remercier Messieurs Philippe Jeanteur et Marc Piéchaczyk et leur exprimer ma gratitude pour m'avoir fait confiance et m'accueillir dans leur laboratoire de l'Institut Jeanteur, dans le cadre d'un post-doctorat.

Je tiens à exprimer ici tout le plaisir que j'ai eu à travailler avec les amis que sont devenus les permanents et les stagiaires de l'équipe de l'URPIGM. Je voudrais mentionner leur disponibilité, leur compétence, leur bonne humeur et surtout leur humour.

Je n'oublie pas Stein Mortensen et Sylvie Taillade qui m'ont prêté leur concours avec gentillesse et amitié, pour l'illustration de la couverture et pour la mise en page finale du rapport.

En dernier lieu, je remercie tout particulièrement et très sincèrement Eric Mialhe qui a assuré la responsabilité de directeur scientifique et sans qui, ce travail n'aurait pas été initié. Il a su me faire partager sa passion pour la Recherche et m'a assuré d'un soutien autant varié qu'inépuisable. L'amitié n'a pas de frontières.

A Thierry et à Maxime.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	4
Anatomopathologie//Etiologie/Epidémiologie	4
Caractérisation antigénique des cellules tumorales/diagnostic	8
Caractérisation morphologiques et fonctionnelles des cellules immunitaires/phénomènes de reconnaissance	11
Caractérisation génétique des tumeurs	16
MATERIELS ET METHODES	21
• 1. Animaux et prélèvements d'hémolymphe	21
1.1. Animaux sains	21
1.2. Animaux néoplasiques	21
1.3. Prélèvement d'hémolymphe	21
1.4. Identification des animaux néoplasiques	21
• 2. Techniques histologiques	22
2.1. Microscopie photonique	22
2.2. Microscopie électronique à transmission	23
• 3. Production d'anticorps spécifiques	24
3.1. Obtention et épuration d'anticorps polyclonaux	24
3.2. Préparation d'anticorps monoclonaux par la technique d'hybridation lymphocytaire	24
• 4. Techniques immunologiques	30
4.1. Immunofluorescence indirecte	30
4.2. Immunoperoxydase indirecte	30
4.3. Immunomarquage à l'or colloïdal	31
4.4. Electrophorèse de protéines et détermination des poids moléculaires	33
4.5. Immunodosage enzymatique	37
5. Recherche d'activités enzymatiques	38
6. Evaluation de la phagocytose	39
6.1. Chimiluminescence	39
• 6.2. Primocultures d'hémocytes en suspension	41
7. Techniques de biologie moléculaire	42
7.1. Extraction d'ADN	42
7.2. Extraction d'ARN	43
7.3. Transcription reverse	44
7.4. Synthèse et purification des oligonucléotides	45

7.5. Amplification de séquences par PCR ("Polymerase Chain Reaction")	46
7.6. Purification de fragments d'ADN à partir de gels d'agarose	47
7.7. Clonage de fragments d'ADN	47
7.8. Minipréparation d'ADN plasmidique	50
7.9. Maxipréparation d'ADN plasmidique	50
7.10. Séquençage	51
7.11. Southern blot	51
7.12. Utilisation du système d'exploitation BISANCE	52

RESULTATS - CHAPITRE I : 53

- TRANSMISSIBILITE ET ETIOLOGIE DE LA NEOPLASIE

1. Transmissibilité et anatomopathologie	53
2. Histologie des hémocytes normaux et néoplasiques	55
2.1. Caractéristiques morphologiques des cellules normales et néoplasiques	55
2.2. Caractéristiques ultrastructurales des cellules normales et néoplasiques	56
3. Essais d'induction de particules virales	57
4. Discussion	58

RESULTATS - CHAPITRE II : 53

CARACTERISATION ANTIGENIQUE DES HEMOCYTES

1. Préparation d'anticorps polyclonaux contre des hémocytes néoplasiques	63
2. Préparation d'anticorps monoclonaux	63
2.1. Etat d'immunisation des souris	63
2.2. Résultats de la fusion cellulaire	64
2.3. Clonage	66
2.4. Isotypage	67
3. Caractérisation des anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes normaux	67
3.1. Spécificité des anticorps monoclonaux	67
3.2. Profils de marquage obtenus par la technique d'immunoperoxydase indirecte	67
3.3. Localisation ultrastructurale des épitopes	68
3.4. Détermination des poids moléculaires des protéines reconnues par les anticorps monoclonaux	69
3.4.1. Séparation électrophorétique des protéines des hémocytes et de l'hémolymphe	69
3.4.2. Western blotting	69
3.5. Spécificité des anticorps monoclonaux dirigés contre les hémocytes normaux de <i>M. edulis</i>	70
3.5.1. Immunoréactivité des AcMs vis-à-vis des hémocytes d'autres espèces de Mytilidae	70

3.5.2. Immunoréactivité des AcMs vis-à-vis des hémocytes de différents Mollusques bivalves	70
4. Caractérisation des AcMs spécifiques des hémocytes néoplasiques ou réagissant vis-à-vis des hémocytes néoplasiques et normaux	70
4.1. Spécificité des AcMs en fonction de la ploïdie des hémocytes néoplasiques ou de la localisation des moules <i>M. trossulus</i>	70
4.1.1. Immunoréactivité des AcMs testée sur coupes paraffine	70
4.2.2. Réactivité des AcMs testée sur des hémocytes préparés par cytocentrifugation	71
4.3. Localisation ultrastructurale des épitopes	72
4.3.1. Comparaison des techniques de "pre-embedding" et de "post-embedding"	72
4.3.2. Localisation des sites antigéniques par la technique de "post-embedding"	73
4.4. Détermination des poids moléculaires des protéines reconnues par les anticorps monoclonaux	74
4.4.1. Comparaison des profils électrophorétiques des deux types d'hémocytes néoplasiques	74
4.4.2. Western blot	74
5. Application à la mise au point d'un immunodiagnostic enzymatique de type ELISA	75
5.1. Choix des anticorps de capture et de détection	75
5.2. Traitement de l'échantillon	76
5.3. Protocole de l'immunodosage enzymatique	77
5.4. Etablissement d'une courbe de référence	77
5.5. Etude clinique	77
6. Application des AcMs spécifiques des hémocytes de <i>M. trossulus</i>	79
6.1. Recherche de réactivités des AcMs spécifiques des hémocytes néoplasiques de <i>M. trossulus</i> avec des néoplasies hémocytaires d'autres provenance	79
6.2. Spécificité des AcMs réagissant avec les hémocytes de <i>M. trossulus</i> vis-à-vis des hémocytes d'autres espèces de Mytilidae	79
7. Discussion	79
RESULTATS - CHAPITRE III : CARACTERISATION FONCTIONNELLE DES HEMOCYTES	89
1. Capacités de phagocytose d'hémocytes normaux de <i>M. edulis</i>	89

1.1. Analyse du burst respiratoire des hémocytes normaux par mesure de la chimioluminescence	89
1.1.1. Détermination et optimisation des paramètres expérimentaux	89
1.1.2. Mesure de l'activité de LDCL sur des échantillons individuels d'hémolymphe	90
1.1.3. Mesure de l'activité de LDCL de sous-populations hémocytaires	90
1.2. Effet de différents inhibiteurs sur l'activité de LDCL	91
1.2.1. Mobilisation de l'ion superoxyde	91
1.2.2. Inhibition de la peroxydase	92
1.2.3. Inhibition de la NADPH oxydase	92
1.3. Effet des anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes de <i>M. edulis</i>	92
2. Capacités de phagocytose des hémocytes néoplasiques de <i>M. trossulus</i>	93
2.1. Recherche d'une activité phagocytaire	93
2.2. Mesure de l'activité de LDCL	93
3. Caractérisation enzymatique des hémocytes normaux de <i>M. edulis</i> et néoplasiques de <i>M. trossulus</i>	94
4. Interactions <i>in vitro</i> des cellules néoplasiques de <i>M. trossulus</i> avec les hémocytes normaux de <i>M. edulis</i> ou de <i>M. trossulus</i>	94
4.1. Etude du processus de reconnaissance des cellules néoplasiques	94
4.2. Recherche d'une activité de LDCL associée à la phagocytose des cellules néoplasiques par les hémocytes normaux	96
5. Discussion	96
RESULTATS - CHAPITRE IV : CARACTERISATION GENETIQUE DES HEMOCYTES	102
1. Recherche de séquences de type rétroviral	102
2. Recherche de séquences de proto-oncogènes chez la moule	103
2.1. Recherche de séquences de type <i>abl</i>	103
2.1.1. Analyse des séquences des gènes <i>abl</i>	103
2.1.2. Choix des amorces	104
2.1.3. Amplification de séquences de type <i>abl</i>	105
2.1.4. Clonage et séquençage des fragments amplifiés à l'aide des amorces <i>abl</i>	106
2.1.5. Recherche d'homologies de séquences à l'aide du système d'exploitation des banques de données BISANCE	106

2.2. Recherche de séquences de type <i>rho</i>	106
2.2.1. Analyse des séquences des gènes <i>rho</i>	106
2.2.2. Choix des amorces pour le gène <i>rho</i>	107
2.2.3. Expériences d'amplification par PCR de séquences de type <i>rho</i>	108
2.2.4. Clonage et séquençage des fragments amplifiés à l'aide des amorces <i>rho</i>	109
2.2.5. Recherche d'homologies de séquences à l'aide du système d'exploitation des banques de données BISANCE	109
2.2.6. Southern blot	110
3. Discussion	110
CONCLUSIONS - PERSPECTIVES	113
BIBLIOGRAPHIE	117

PUBLICATIONS - COMMUNICATIONS

Le travail présenté dans cette thèse a été l'objet des publications et communications suivantes :

Publications :

1. Noël D., Boulo V., Chagot D., Mialhe E., Paolucci F., Clavies C., Hervaud E., Elston R. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against neoplastic hemocytes of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Dis. aquat. Org.* 10 : 51-58, 1991.

2. Noël D., Moore J., Mialhe E., Boulo V., Elston R. Study of neoplastic hemocytes in the bivalve mollusc *Mytilus*. Proceedings of the Eighth Conference on Invertebrate and Fish Tissue Culture, *Tissue Culture Association Publication*, 47-55, 1991.

3. Noël D., Pipe R., Elston R., Bachère E., Mialhe E. Antigenic characterization of hemocyte sub-populations in the mussel *Mytilus edulis* using monoclonal antibodies. submitted in *Dev. comp. Immunol.*

4. Noël D., Bachère E., Elston R., Mialhe E. Chemiluminescence activity of normal and neoplastic hemocytes in *Mytilus* (Bivalvia). submitted in *Dev. comp. Immunol.*

Communications :

1. Elston R., Bonar D., Brooks K., Gee A., Mialhe E., Moore J., Noël D., Stephens L. Studies on pathogenesis and etiology of circulating sarcomas in *Mytilus*. PAMAQ 4 : Fourth International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture, Vigo, Spain, September 17-21, 1990.

2. Noël D., Boulo V., Elston R., Mialhe E. Preparation and use in a diagnosis of monoclonal antibodies specific for neoplastic hemocytes of *Mytilus*. International Conference Aquaculture Europe'91, Dublin, Ireland, June 10-12, 1991.

3. Noël D., Mialhe E., Boulo V., Moore J., Elston R. Study of neoplastic hemocytes in the bivalve mollusc *Mytilus*. 1991 World Congress on Cell and Tissue Culture, Anaheim, California, June 16-20, 1991.

4. Moore J., Noël D., Elston R. Diagnosis of systemic neoplasia in the bivalve mollusc *Mytilus*. 14th Annual AFS-FHS Meeting/32nd Annual Western Fish Disease Conference, Newport, Oregon, July 31-August 3, 1991.

5. Noël D., Bachère E., Elston R., Mialhe E. Study on cytotoxic activities of hemocytes forward hemic neoplasia in the mussel *Mytilus*. International Congress on Research for Aquaculture : Fundamental and Applied Aspects, Antibes-Juan les Pins, France, Octobre 6-10, 1991.

6. Noël D., Moore J., Elston R., Mialhe E. Pentaploid or tetraploid form of *Mytilus* hemic neoplasia determination using monoclonal antibodies. PAMAQ5 : Fifth International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture, Montpellier, France, Avril 2-4, 1992.

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNase :	désoxyribonucléase
ADNc :	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN :	acide ribonucléique
ARNase :	ribonucléase
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ARNt :	acide ribonucléique de transfert
ATPr :	adénosine 5'-triphosphate
BSA :	albumine sérique de boeuf
CSF :	colony-stimulating factor
CPG :	billes de verre à pores contrôlés
cpm :	coup par minute
DAB :	diamino benzidine
DEPC :	diéthyl pyrocarbonate
DM :	double-minute
DMF :	diméthyl formamide
DMSO :	diméthyl sulfoxyde
DMT :	diméthoxytrityl
dNTP :	désoxyribonucléosides 5' triphosphate
DO :	densité optique
DTT :	dithiothréitol
EDTA :	acide éthylène diamine tétraacétique
EGF :	epidermal growth factor
EMFA :	eau de mer filtrée autoclavée
FGF :	fibroblast growth factor
GM-CSF :	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HAT :	hypoxanthine aminoptérine thymidine
HSR :	homologous staining region
HT :	hypoxanthine thymidine
HGPRT :	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase
IF :	immunofluorescence
IIF :	immunofluorescence indirecte
IFN :	interféron
IL1 à 6 :	interleukine 1 à 6
IPTG :	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

kDa :	kiloDalton
LAK :	lymphokine-activated killer
LDCL :	chimiluminescence dépendante du luminol
LTR :	longues répétitions terminales
MAK :	macrophage activated killer
M-CSF :	macrophage-colony stimulating factor
MOPS :	acide sulfonique morpholinopropane
NK :	natural killer
NKCF :	natural killer colony stimulating factor
PAH :	hydrocarbures polycycliques aromatiques
pb :	paire de bases
PBS :	tampon phosphate salin
PCR :	réaction de polymérisation en chaîne
PDGF :	platelet-derived growth factor
PEG :	polyéthylène glycol
PMA :	phorbol myristate acétate
PMN :	neutrophile polymorphonucléaire
qsp :	quantité suffisante pour
Rb :	rétinoblastome
RFLP :	polymorphisme de longueur des fragments de restriction
ROI :	radical intermédiaire de l'oxygène
SDS :	dodecyl sulfate de sodium
SDS-PAGE :	électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS
SOD :	superoxyde dismutase
SVF :	sérum de veau foetal
TE :	tampon Tris-EDTA (voir composition en Annexe 2.3)
TEAA :	acétate de triéthylammonium
TFA :	acide trifluoroacétique
TIL :	lymphocyte infiltrant la tumeur
TNF :	facteur de nécrose tumoral
vol :	volume
X-Gal :	5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactoside

INTRODUCTION

La mytiliculture représente une ressource importante au sein de l'aquaculture marine mondiale, avec 900 milliers de tonnes produits annuellement (Héral *et al.*, 1990). En France, cette activité concerne *Mytilus edulis* et en moindre proportion *Mytilus galloprovincialis* et correspond à la deuxième production aquacole, fluctuant entre 45 et 73 milliers de tonnes par an (Kiesel, 1992).

Après une progression de l'exploitation des ressources marines au cours des vingt dernières années liée à d'importants progrès zootechniques, la production conchylicole tend à se stabiliser. En effet, l'intensification des cultures s'est généralement accompagnée d'une augmentation des densités et d'une surexploitation des stocks provoquant une insuffisance des ressources alimentaires des bassins (Héral, 1985). Cette situation qui conditionne un affaiblissement et une sensibilité accrue des espèces cultivées est particulièrement propice à l'explosion d'agents pathogènes latents. Ainsi, des mortalités d'origine infectieuse sont apparues pour lesquelles tous les principaux groupes de parasites ont été identifiés : virus, bactéries, protozoaires, métazoaires, en particulier chez les Mytilidae (Annexe 1.1).

Outre ces pathologies infectieuses, des mortalités à étiologie inconnue se produisent dans diverses régions du globe chez les principales espèces de Mollusques cultivées. Il s'agit de proliférations cellulaires anormales ayant différents tissus d'origine, les néoplasies hémocytaires étant cependant les plus souvent rencontrées (Annexe 1.2).

Chez les moules, le premier cas de néoplasie hémocytaire a été décrit en 1969 en Orégon, sur la côte ouest des Etats-Unis (Farley, 1969 ; Farley and Sparks, 1969). Depuis, ce type de prolifération cellulaire a été mis en évidence en Grande-Bretagne (Moore and Lowe, 1979), au Canada (Cosson-Mannevy, 1984), en Espagne (Gutierrez and Sarasquete, 1986) et épisodiquement en France (données IFREMER). Ces études sont essentiellement descriptives ou épidémiologiques et les taux de prévalence sont généralement faibles bien que, dans certaines conditions, ils puissent atteindre 20 % (Mix, 1983).

Actuellement, ce type de maladie provoque des mortalités à caractère endémique chez les moules de la baie du Puget Sound (Etat de Washington ; USA) où la prévalence peut atteindre 44 % (Elston, comm. pers.). Historiquement, considérées *Mytilus edulis* sur la base de critères morphologiques, des travaux récents laissaient supposer que ces moules puissent appartenir à l'espèce *M. trossulus* (Mc Donald and Koehn, 1988) et des analyses isoenzymatiques les ont effectivement classées dans cette espèce (Brooks, 1991). Cependant, les deux espèces *M. edulis* et *M. trossulus* restent extrêmement voisines puisqu'elles sont interfécondes (Elston, comm. pers.). Etant donnée la nature

transmissible de la maladie au sein de cette espèce (Elston *et al.*, 1988b) et l'étroite parenté de celle-ci avec *M. edulis*, il était important pour la mytiliculture française et européenne de prendre en compte cette pathologie tumorale en raison des risques potentiels de propagation lors de transferts internationaux de coquillages. C'est pourquoi, un programme de collaboration a été développé entre le Laboratoire de Biologie Marine de BATTELLE, aux USA (Dr Ralph Elston) et l'Unité de Recherche en Pathologie, Immunologie et Génétique Moléculaire de l'IFREMER pour étudier cette néoplasie hémocytaire. Dans le cadre de cette thèse, l'étude des hémocytes normaux et néoplasiques a été entreprise, chez les deux espèces de moules *M. edulis* et *M. trossulus*, d'un point de vue :

- histologique et étiologique
- antigénique et diagnostique
- fonctionnel et immunologique
- génomique

Ce travail a été développé, en grande partie de façon comparative entre les hémocytes normaux chez *M. edulis* et les hémocytes néoplasiques, afin d'appréhender les diverses modifications consécutives au processus de transformation hémocytaire. L'objectif étant de contribuer à l'acquisition de données sur les tumeurs d'Invertébrés marins, un rappel des connaissances acquises dans ce domaine est donné en introduction.

Un premier point a consisté à vérifier le caractère infectieux de cette néoplasie sur des moules *M. edulis*, parallèlement aux expériences de Elston *et al.* (1988b) qui ont mis en évidence une étiologie infectieuse par transmission de la maladie à l'aide de broyats cellulaires chez *M. trossulus*. L'anatomopathologie de ces proliférations hémocytaires a été abordée et la recherche d'un agent pathogène causal a été entreprise en microscopie électronique. La 5-bromo-2-désoxyuridine a ensuite été utilisée *in vivo* pour tenter d'induire la formation de particules de rétrovirus dont la possible implication dans l'étiologie de cette néoplasie était suggérée par les travaux de Oprandy *et al.* (1981).

La deuxième partie de ce travail a concerné la caractérisation antigénique des hémocytes néoplasiques comparativement aux cellules normales. Dans ce but, des anticorps polyclonaux et monoclonaux ont été préparés et leur spécificité vis-à-vis des hémocytes normaux d'une part, et des hémocytes néoplasiques d'autre part, a été vérifiée. Les anticorps monoclonaux (AcMs) spécifiques des hémocytes normaux ont été utilisés pour définir des sous-populations hémocytaires. Les modifications antigéniques associées à la transformation ont été analysées par rapport aux deux types d'hémocytes néoplasiques polyploïdes, caractérisés par Elston *et al.* (1990). Ces AcMs ont été également utilisés pour la mise au point d'immunodiagnostic susceptibles d'être appliqués aux contrôles épidémiologiques des cheptels de moules.

La troisième partie a été focalisée sur la caractérisation fonctionnelle des hémocytes en tant que cellules immunitaires afin d'identifier des anomalies fonctionnelles chez les hémocytes néoplasiques. En effet, la perte des capacités de phagocytose des hémocytes néoplasiques a été supposée chez quelques individus (Kent *et al.*, 1989), ce qui suggérait une immunodéficience des animaux pouvant expliquer, au moins partiellement, les mortalités. Dans ce but, l'activité phagocytaire associée à de la chimioluminescence a été étudiée respectivement chez les hémocytes normaux et néoplasiques. Sur la base d'expériences *in vitro*, les interactions entre hémocytes normaux et néoplasiques ont été ensuite analysées, notamment pour mettre en évidence des phénomènes de reconnaissance et de cytocidie, susceptibles d'expliquer les phénomènes de rémission des tumeurs observés *in vivo* (Elston *et al.*, 1988a).

Enfin, la caractérisation génomique des hémocytes normaux et néoplasiques a été abordée afin de mettre en évidence des différences complémentaires aux anomalies de ploïdie détectées par cytométrie de flux (Elston *et al.*, 1990), deux types de cellules néoplasiques étant identifiés : une forme tétraploïde (3,8 n) et une forme pentaploïde (4,9 n) (Moore *et al.*, 1991a). Des séquences de proto-oncogènes ont été recherchées par PCR à partir d'ADN génomique ou d'ADNc, les amorces oligonucléotidiques ayant été déterminées en exploitant les informations relatives aux séquences d'oncogènes disponibles dans les banques de données.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

**ETATS ACTUELS DES CONNAISSANCES SUR LES TUMEURS
D'INVERTEBRES MARINS
ET PRESENTATION DES AXES DE RECHERCHE
PAR REFERENCE AUX DONNEES ACQUISES CHEZ LES VERTEBRES**

1. ANATOMOPATHOLOGIE/ETIOLOGIE/EPIDEMIOLOGIE

De nombreux cas de tumeurs ont été répertoriés dans le monde chez la plupart des espèces de Mollusques bivalves marins d'intérêt économique (Mix, 1986 ; Peters, 1988). Il s'agit essentiellement de néoplasies hémocytaires mais des néoplasmes gonadiques, des papillomes et des carcinomes ont également été décrits (Annexe 1.2). La mise en évidence histologique de ces syndromes au cours de contrôles épidémiologiques a souvent été conjoncturelle et a été limitée généralement à une étude en microscopie photonique.

Des pollutions ont été fréquemment incriminées dans ces cas de néoplasies (Yevich et Barszcz, 1977 ; Moore and Lowe, 1979 ; Reinisch *et al.*, 1984). Ainsi, des corrélations ont été trouvées entre des concentrations en hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAHs) et la fréquence des tumeurs chez les moules de la baie de Yaquina (Orégon ; USA) (Mix and Schaffer, 1979). Cependant, des études *in vivo* tendent à infirmer cette hypothèse puisque l'induction de néoplasies chez les Mollusques suite à une exposition à du pétrole ou des PAHs n'a pu être démontrée (Couch *et al.*, 1979 ; Craig *et al.*, 1989).

Par ailleurs, les résultats de certains travaux soutiennent l'hypothèse d'une étiologie virale. Des cas de granulocytomes, observés chez la moule *Mytilus edulis* au Danemark, ont été associés à une infection par des picornavirus (Rasmussen, 1986). Auparavant, chez la praire *Mya arenaria*, Oprandy *et al.* (1981) ont isolé à partir d'hémocytes néoplasiques, des particules virales assimilées à des rétrovirus de type B qui, inoculées à des animaux sains ont induit la tumeur. De plus, l'induction de la néoplasie et l'activation des particules virales ont été observées après addition de 5-bromo-2-désoxyuridine (Oprandy and Chang, 1983).

Le diagnostic des tumeurs de mollusques est généralement réalisé sur coupes histologiques et dans le cas des néoplasies hémocytaires, il peut être effectué soit sur des préparations fraîches d'hémolymphe, soit préférentiellement sur des frottis d'hémolymphe colorés (Cooper *et al.*, 1982). Cette méthode s'étant révélée représentative du degré de tumorigénèse, elle a été largement appliquée à des études épidémiologiques évaluant la présence et la prévalence de ce type de maladie (Farley *et al.*, 1986 ; Elston *et al.*, 1988a ; Brousseau and Baglivo, 1991). Les limites de ces techniques histologiques (relative lenteur de lecture des lames, difficultés d'identification fiable) a conduit dès 1983 à la préparation d'anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes néoplasiques

chez *Mya arenaria* (Reinisch *et al.*, 1983) et à la mise au point d'un diagnostic de cette tumeur par une technique d'immunoperoxydase indirecte (Smolowitz and Reinisch, 1986). Cette méthode est depuis couramment mise en oeuvre pour des suivis épidémiologiques des stocks de ce mollusque (Craig *et al.*, 1989 ; Leavitt *et al.*, 1990).

Chez les Crustacés marins, les données sont encore plus limitées et très peu de cas de tumeurs ont été recensés : les plus anciennes données concernent une croissance de type papilliforme chez la crevette *Penaeus aztecus* (Sparks and Lightner, 1973), une tumeur musculaire chez des post-larves de *P. aztecus* et *P. setiferus* (Overstreet and van Devender, 1978) et des proliférations anormales chez le homard *Homarus americanus* et le crabe *Carcinus maenus* (revue de Sparks, 1985). Plus récemment, un sarcome hématopoiétique chez la crevette *P. vannamei* (Lightner and Brock, 1987) et un néoplasme épithélial chez le crabe *Paralithodes camtschatica* (Sparks and Morado, 1987) ont été observés. Ces études restent essentiellement descriptives basées sur des observations histopathologiques lors de contrôles de routine. Une induction par des polluants a été supposée dans un cas de néoplasme (Overstreet and van Devender, 1978). Aucune donnée ne concerne une étiologie infectieuse de ces néoplasies qui restent ponctuelles et n'ont pas fait l'objet d'études plus approfondies.

Les tumeurs chez les Insectes et notamment chez la drosophile sont comparativement mieux étudiées, en ce qui concerne les étiologies virales. En effet, un certain nombre de proliférations cellulaires et en particulier des cas de granulomes ont été observés dès 1975 (Vago) et plusieurs types de virus identifiés. Ainsi, chez *Sibine fusca*, un parvovirus (Amargier *et al.*, 1979) et chez *Drosophila melanogaster*, un réovirus et un parvovirus ont été séparément isolés de deux lignées cellulaires néoplasiques établies à partir de mutants récessifs létaux provoquant des tumeurs du système hématopoiétique larvaire (Gateff *et al.*, 1980). Des particules de type rétroviral contenant de l'ARN homologue à l'élément transposable *copia* ont également été isolées et purifiées chez *Drosophila melanogaster* (Shiba and Saigo, 1983).

Chez les Vertébrés, les poissons ont suscité un vif intérêt dans le cadre de la recherche sur le cancer (Masahito *et al.*, 1988). De nombreux travaux ont porté sur des modèles biologiques utilisables pour la mesure et la compréhension des effets de divers polluants dans les milieux aquatiques. Du point de vue histologique, les tumeurs de poissons ne diffèrent fondamentalement pas de celles rencontrées chez les autres vertébrés, ce qui permet de les classer selon les mêmes critères et les mêmes nomenclatures. Ainsi, chez de nombreuses espèces de poissons, des néoplasmes ont été mis en évidence dans tous les types cellulaires et les organes majeurs, à l'exception du

cerveau. L'apparition de tumeurs chez les animaux aquatiques inférieurs a été associée à des sites pollués et de nombreux travaux ont démontré l'impact de différentes substances cancérigènes sur la formation et l'incidence de ces néoplasies (Kimura *et al.*, 1984 ; Mix, 1986 ; Hawkins *et al.*, 1986). Contrairement aux mollusques, l'induction expérimentale de tumeurs chez les poissons a été obtenue avec différents cancérigènes, ce qui a pour conséquence de généraliser leur utilisation en tant que système modèle (Sinnhuber *et al.*, 1977). Un poisson d'aquarium, *Oryzias latipes*, est l'objet d'un grand nombre d'études concernant les mécanismes de cancérogénèse, du fait de la rapidité de formation des tumeurs et de sa haute susceptibilité à divers cancérigènes (Aoki and Matsudaira, 1977 ; Hyodo-Taguchi and Matsudaira, 1984 ; Hawkins *et al.*, in press). Dans quelques cas de néoplasmes de poissons, une étiologie virale a été établie : un rétrovirus de type C, associé à une activité transcriptase réverse, a été mis en évidence dans le cas de lymphosarcomes chez *Esox lucius* (Papas *et al.*, 1976 ; 1977). Un autre rétrovirus de type C a également été associé à un lymphome lymphoblastique chez le medaka *Oryzias latipes* (Harada *et al.*, 1990). Deux herpèsvirus : OMV (*Onchorhynchus masou virus*) et YTV (Yaname tumor virus) ont été isolés respectivement, d'une tumeur de saumon coho *Onchorhynchus kisutch* (Kimura *et al.*, 1981) et du yamame *Onchorhynchus masou* (Sano *et al.*, 1983). Jusqu'à présent, l'identité de ces deux virus ou des tumeurs induites n'ont pu être confirmées.

Chez les Vertébrés supérieurs, les cancers sont au premier rang des maladies. Chez l'homme, ils correspondent à la deuxième cause de mortalités dans les pays industrialisés et cette importance explique le très grand nombre d'équipes de recherche travaillant sur l'anatomopathologie, l'étiologie, le diagnostic et le traitement des cancers.

D'un point de vue anatomopathologique, le cancer est une forme maligne de tumeur, caractérisée par la prolifération de cellules morphologiquement anormales, l'infiltration des tissus environnants et la formation de métastases (Klein, 1982). Le processus de transformation cellulaire s'accompagne d'un certain nombre de modifications fonctionnelles et biologiques : perte de l'inhibition de contact, perte de la capacité d'adhésion à un support, croissance indéfinie, faible exigence en facteurs de croissance et formation de tumeur chez l'animal.

Selon sa nature infectieuse ou non infectieuse, le développement d'une tumeur maligne implique des interactions diverses et complexes entre plusieurs facteurs externes (environnementaux) et endogènes (hormonaux, génétiques,...). Le processus de cancérogénèse non infectieuse se déroule souvent en plusieurs étapes : initiation, promotion et progression (Weinstein, 1988). L'étape d'initiation peut correspondre à une altération de la structure de l'ADN par des agents chimiques (amines aromatiques hydrocarbures polycycliques aromatiques,...) ou des radiations (ultraviolets,

ionisation,...), alors que la promotion nécessite des expositions multiples à des agents (TPA, téléocidine,...) qui ne dégradent pas directement l'ADN. Cette étape consiste en une activation de protéines membranaires (protéine kinase C,...) impliquées dans la voie secondaire de transduction du signal. La progression d'une tumeur bénigne en une tumeur maligne est un mécanisme qui reste encore à éclaircir bien qu'il semble faire appel à une amplification de séquences spécifiques d'ADN et à l'instabilité du caryotype (Bradshaw, 1986).

Dans le cas des tumeurs d'origine virale, les virus à ARN et les virus à ADN sont classiquement distingués (Vasseur, 1989 ; Fields, 1990). Ces derniers peuvent être classés en cinq familles majeures dont les principales caractéristiques sont reportées en Annexe 1.3. Brièvement, certains membres des familles des Polyomaviridae et des Adenoviridae peuvent induire des tumeurs expérimentales chez les animaux et transformer des cellules *in vitro* mais ils ne jouent aucun rôle significatif dans les cancers animaux et humains. Par contre, des représentants des genres papillomavirus (Polyomaviridae), herpèsvirus (Herpesviridae) et virus de type hépatite-B (Hepadnaviridae) sont à l'origine de cancers (Green , 1985).

Les membres de la famille des Retroviridae (virus à ARN) induisent une grande variété de maladies et sont largement distribués chez les Vertébrés. Ils sont classiquement divisés en trois sous-familles et seuls certains membres des oncovirus sont doués d'un pouvoir oncogène :

- les membres de la sous-famille des *spumavirus* provoquent des infections chroniques sans pathologie particulière mais *in vitro*, ils produisent des syncytia renfermant des vacuoles d'aspect caractéristique.

- la sous-famille des *lentivirus* est responsable de maladies inflammatoires ou dégénératives évoluant très lentement et irréversiblement. Récemment, cette famille s'est enrichie des virus du SIDA qui induisent une immunodéficience des individus atteints.

- la sous-famille des *oncovirus* est la plus importante en nombre et comporte des représentants dans de nombreuses espèces animales, chez les Vertébrés et les Invertébrés. Ils sont la cause de différents types de néoplasies tels que des sarcomes, carcinomes, lymphomes et leucémies.

Les membres de la famille des Retroviridae sont caractérisés par leur génome constitué d'ARN et leur activité transcriptase réverse (ADN polymérase dépendante de l'ARN matrice) qui intervient au niveau du cycle de multiplication virale (Annexe 1.4A). Cette activité enzymatique est particulièrement importante au moment de la réplication des virus qui se caractérise par trois étapes : transcription réverse de l'ARN génomique viral en ADN, duplication des séquences LTR (l'ADN viral est plus long que l'ARN génomique) et intégration de l'ADN viral au sein du génome hôte (Annexe 1.4B)

(Vasseur, 1989). Au cours de la réplication virale, plusieurs protéines sont synthétisées, notamment des glycoprotéines membranaires qui jouent un rôle important dans les phénomènes de reconnaissance et de cytocidie des cellules infectées.

2. CARACTERISATION ANTIGENIQUE DES CELLULES TUMORALES/ DIAGNOSTIC

Très peu d'informations sont disponibles sur les processus de transformation et les modifications antigéniques qu'ils entraînent chez les Invertébrés. Les premiers anticorps monoclonaux spécifiques de cellules tumorales d'Invertébrés marins ont été préparés contre des hémocytes néoplasiques chez *Mya arenaria* (Reinisch *et al.*, 1983). Ces anticorps ont été ensuite utilisés pour un diagnostic de la néoplasie, selon une technique d'immunoperoxydase (Craig *et al.*, 1989 ; Leavitt *et al.*, 1990). Bien qu'une protéine de 200 kDa spécifique des hémocytes néoplasiques ait été mise en évidence après séparation électrophorétique et "Western-blot", sa nature et sa fonction restent encore inconnues (Miosky *et al.*, 1989).

Chez les Crustacés, aucune donnée sur la caractérisation antigénique des cellules tumorales n'est, à notre connaissance, disponible.

L'antigénicité des cellules tumorales a été bien étudiée chez les Vertébrés et en particulier chez l'homme, d'une part, pour aider au diagnostic et à la compréhension du processus tumoral et d'autre part, dans une perspective d'immunothérapie.

La transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse s'accompagne de l'apparition d'antigènes associés à la tumeur. Ceux-ci sont essentiellement générés par la synthèse de nouvelles molécules codées par les gènes du virus lors d'une oncogénèse virale ou par les gènes de l'hôte, activés durant le processus de transformation (Klein, 1982). Dans d'autres cas, des modifications structurales (nouvelle distribution ou perte de composants membranaires) sont responsables de l'immunogénicité nouvelle des cellules néoplasiques.

Ces antigènes peuvent être de deux types :

– les *vrais antigènes associés à la tumeur* ne peuvent pas être détectés sur les cellules normales et correspondent à des protéines codées par les oncogènes activés pendant la tumorigénèse ou à des protéines virales. Ils ont des caractéristiques différentes suivant l'origine, chimique ou virale, de la tumeur. Ainsi, les tumeurs induites par un même produit cancérigène peuvent posséder des antigènes distincts d'une tumeur à l'autre. Par contre, les tumeurs initiées par des virus oncogènes

présentent des antigènes communs au virus infectieux mais certaines peuvent aussi exposer des antigènes spécifiques, comme dans le cas des tumeurs d'origine chimique.

- *Les antigènes qui sont anormalement exprimés* sont en fait habituellement associés à un stade de différenciation cellulaire et absents dans les cellules normales différenciées. Ils rassemblent des constituants du cytosquelette, récepteurs hormonaux, enzymes ou constituants membranaires et deux groupes principaux d'antigènes sont reconnus :

- les *antigènes oncofoetaux* sont synthétisés durant certains stades de l'embryogénèse mais sont absents dans les cellules adultes ou présents à de très faibles concentrations. La liste de ces molécules associées à des tumeurs est longue mais les plus connues sont la foetoprotéine α (α -FP) et l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) (Klein, 1982).

- les *antigènes de différenciation* sont localisés dans certains tissus adultes et réapparaissent inopportunément dans certaines tumeurs. Dans ce cas, les cellules tumorales expriment des antigènes qui sont absents chez le type cellulaire normal ou qui subissent une modification quantitative. L'antigène de la leucémie du thymus (T1a) et l'antigène G1X en sont deux exemples. Une perte d'expression comme dans le cas des antigènes d'histocompatibilité peut également être observée (Klein, 1982). Des antigènes associés à la différenciation ont été identifiés chez différentes cellules tumorales hématopoïétiques humaines, tels que Mac-1 ou F4/80 et différents anticorps monoclonaux sont disponibles (Tomida, 1985). Certains de ceux-ci sont spécifiques de cellules myéloïdes, d'autres de cellules monocytiques ou de ces deux types de cellules. Ces AcMs sont utilisés dans le diagnostic de la leucémie myéloblastique sévère.

La nature immunogène des cellules tumorales a permis fréquemment de préparer des réactifs spécifiques des tumeurs : anticorps monoclonaux et polyclonaux. Bien qu'auparavant les immunosérums aient été largement utilisés, les anticorps monoclonaux se sont généralisés en raison d'une part, de leur large disponibilité et d'autre part, de leur stricte spécificité pour un seul déterminant antigénique. Deux classes d'AcMs sont disponibles : ceux qui réagissent avec les vrais antigènes spécifiques de la tumeur et ceux qui sont dirigés contre des antigènes anormalement exprimés. La liste de ces derniers est importante : plus de 180 anticorps monoclonaux sont associés aux mélanomes (Ordonez *et al.*, 1988 ; Tousignant et Grossin, 1990), plus de 100 sont liés aux carcinomes (Thor *et al.*, 1988 ; Shaw *et al.*, 1988) et dans le cas des tumeurs de type lymphoïde, les anticorps monoclonaux ont été regroupés en classe de différenciation ou "CD" (Jaffe, 1988 ; Delsol *et al.*, 1989). De nombreux AcMs dirigés contre des oncoprotéines ont été également préparés, notamment grâce au développement des

techniques de biologie moléculaire qui permettent d'obtenir des quantités importantes de protéines en utilisant des vecteurs d'expression bactériens (Ferré *et al.*, 1986). Un certain nombre d'anticorps monoclonaux réagissant avec les oncoprotéines les plus fréquemment associées à des tumeurs sont ainsi utilisables (Kuzumaki *et al.*, 1986 ; Sorrentino *et al.*, 1989 ; Masuko *et al.*, 1989 ; Ishikawa *et al.*, 1991).

La disponibilité de ces anticorps monoclonaux et leur production commerciale a permis des progrès décisifs dans le diagnostic de nombreuses tumeurs. En effet, dans certains cas, un examen histopathologique ne permet pas d'aboutir à un diagnostic précis, celui-ci repose alors sur les caractéristiques antigéniques des cellules tumorales. Les anticorps monoclonaux peuvent ainsi aider à déterminer non seulement le type mais aussi le stade pathologique des tumeurs et leur pronostic, une corrélation entre l'amplification de certains oncogènes et la diminution de la survie dans des cas de cancer ayant été démontrée (Myers *et al.*, 1989). Les méthodes de détection les plus courantes sont l'immunofluorescence directe ou indirecte et des techniques immunoenzymatiques qui permettent de réaliser les diagnostics sur des bases histologiques et immunologiques (Thor *et al.*, 1988). Une estimation quantitative du taux d'expression des antigènes associés à la tumeur peut être également réalisée en couplant ces techniques à un système d'analyse d'images (Richmond *et al.*, 1988 ; Czerniak *et al.*, 1990) ou à la cytométrie de flux (Freedman et Auersperg, 1986). La radioimmunosciintigraphie est aussi possible, cette technique consistant à injecter au patient des anticorps couplés à des radioisotopes qui vont se fixer au site tumoral où ils sont ensuite localisés (Britton and Granowska, 1987). Bien qu'encore à l'étude, cette nouvelle méthodologie devrait permettre une localisation précise de petites masses de cellules tumorales à un stade précoce de leur développement.

Outre l'intérêt que ces anticorps suscitent pour le diagnostic, ils ont représenté un apport fondamental dans l'analyse des protéines codées par les oncogènes et dans les fonctions qu'elles occupent dans la croissance des cellules normales et tumorales. Ainsi, le rôle de l'oncoprotéine *ras* dans le développement de néoplasmes thyroïdiens chez l'homme (Papadimitriou *et al.*, 1988) et celui de la protéine *c-myc* dans la transformation maligne des cellules épithéliales métaplasiques du sein ont pu être démontré au cours d'études immunohistologiques (Papamichalis *et al.*, 1988). Le taux d'expression d'une oncoprotéine variant au cours du processus de transformation, son analyse immunohistochimique dans des tissus à divers stades de cancérisation permet de préciser son rôle dans l'initiation, la promotion ou la progression tumorale (Lanza, 1988).

Enfin, l'immunothérapie est un domaine de recherche qui connaît un vif intérêt en raison des espoirs qu'elle suscite dans la thérapie des cancers, cet axe de travail étant évidemment inconcevable chez les Mollusques. Pour empêcher la prolifération des cellules tumorales, quatre voies sont essentiellement à l'étude (Fridman, 1991) :

- les *anticorps nus* spécifiques de la tumeur, injectés chez un malade, vont se fixer sur les cellules cancéreuses et en activant le système immunitaire du patient, contribuent à la destruction de ces cellules (Funke *et al.*, 1989).

- les *anticorps couplés à des substances chimiques toxiques* (toxines bactériennes, médicaments cytostatiques, radioisotopes) vont permettre de concentrer la substance destructrice dans la tumeur et produire une chimiothérapie ou une radiothérapie locale.

- les *anticorps bispécifiques* sont capables de reconnaître un déterminant spécifique à la cellule tumorale et à une structure d'activation d'une cellule cytotoxique.

- les *anticorps reconnaissant des facteurs de croissance*, par leur fixation sur ces molécules, empêchent la multiplication des cellules cancéreuses.

3. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET FONCTIONNELLE DES CELLULES IMMUNITAIRES/ PHENOMENES DE RECONNAISSANCE

Chez les Mollusques, la fréquence des néoplasies hémocytaires par rapport aux autres types de tumeurs est à rappeler (Annexe 1.2). A ce jour, peu de travaux ont été effectués sur ce type de néoplasies. Seules, l'étude des capacités phagocytaires et la recherche de certaines activités enzymatiques de type lysosomal ont été réalisées chez les hémocytes d'animaux fortement malades (Kent *et al.*, 1989 ; Beckmann *et al.*, 1992). La signification de l'importance des tumeurs hémocytaires semble s'expliquer par l'immunodéficience observée lors de la transformation de ces cellules immunitaires. De plus, des cas de rémission ayant été observés chez la moule (Elston *et al.*, 1988a), il semblerait qu'un processus de reconnaissance et de cytodie se produise, au moins chez certains individus. Ces informations restent cependant descriptives et aucune étude expérimentale n'a été réalisée jusqu'à présent.

L'immunité chez les Invertébrés est essentiellement non spécifique, des anticorps ou un système de type complément n'ayant pas été identifiés. L'immunité humorale existe cependant puisqu'un certain nombre de facteurs humoraux ont été mis en évidence, la majorité étant produite par les hémocytes. Plusieurs facteurs ont été identifiés : lysozyme (Takahashi *et al.*, 1986), bactéricidines (Mori *et al.*, 1984), enzymes

lysosomiales plasmatiques (Cheng, 1983), activité sérine-protéase (Bachère *et al.*, 1990), lectines (Renwranztz, 1986), cytolysines plasmatiques (Leippe et Renwranztz, 1988). Par ailleurs, la présence de molécules de type cytokine dans l'hémolymphe de *M. edulis* a été suspectée suite à la mise en évidence en ELISA d'une immunoréactivité avec des anticorps polyclonaux spécifiques du TNF- α et de l'IL1 recombinants humains (Hughes *et al.*, 1990 ; 1991a ; 1991b).

A côté de ces médiateurs solubles, les effecteurs cellulaires semblent jouer un rôle primordial dans la réponse immunitaire, chez les Mollusques (Sminia and van der Knaap, 1987). Outre le fait que le site d'hématopoïèse et la cellule souche hématopoïétique sont toujours non identifiés, des controverses existent sur la filiation, la classification et le nombre de types hémocytaires. Selon le schéma proposé par Cheng (1981), deux grands types morphologiques semblent retenus : les granulocytes caractérisés par un petit noyau et contenant des granules cytoplasmiques ; les hyalinocytes, cellules à rapport nucléocytoplasmique élevé, sans granules. Des types intermédiaires sont également reconnus mais selon l'espèce, leur nombre peut varier notablement. Essentiellement basées sur des critères morphologiques et ultrastructuraux, ces études révèlent une grande disparité selon les espèces (Cheng, 1981). Cependant, l'utilisation des seuls critères morphologiques se révèle insuffisante pour identifier des sous-populations hémocytaires. Récemment, différents marqueurs de membrane ont été identifiés tels que les lectines et leurs déterminants carbohydrates spécifiques (Yoshino, 1983 ; Renwranztz *et al.*, 1985). Le développement de marqueurs antigéniques apparaît indispensable, à l'instar des travaux réalisés chez les mollusques gastéropodes *Biomphalaria glabrata* et *Lymnaea stagnalis* (Yoshino and Granath, 1983 ; Dikkeboom *et al.*, 1985), chez lesquels des anticorps monoclonaux spécifiques d'hémocytes ont été préparés et ont permis d'identifier des sous-populations.

La fonction des hémocytes est variée : transport du calcium et des protéines nécessaires à la réparation de la coquille, cicatrisation des blessures, transport et digestion des substances nutritives, excrétion et, bien sûr, ils jouent un rôle important dans la défense interne (Cheng, 1981). Cette fonction de défense semble essentiellement assurée par la phagocytose des particules étrangères ou encapsulation si ces dernières sont trop grosses pour être phagocytées. Le mécanisme de phagocytose a été bien étudié en microscopie photonique et électronique (Mohandas *et al.*, 1985 ; Kroschinski and Renwranztz, 1988). Il fait appel à différentes étapes (Renwranztz, 1990) :

- le *chimiotactisme* des hémocytes circulants vers le site inflammatoire ou lésé a été démontré bien que la(les) substance(s) chimioattractante(s) ne soit(ent) pas identifiée(s).

- La *phase de reconnaissance* semble être médiée notamment par des lectines qui ont un effet opsonisant. Elles stimulent la phagocytose lorsqu'elles se lient simultanément à la cellule cible et à la cellule effectrice.

- Après contact, la *phase d'internalisation* consiste en la formation de pseudopodes qui vont progressivement entourer et finalement ingérer la particule.

- La dernière phase de *digestion intracellulaire* est assurée par deux types de processus : un mécanisme oxydatif ou "burst respiratoire" et un mécanisme oxygène-indépendant faisant intervenir les enzymes lysosomiales.

Les enzymes lysosomiales sont libérées dans la vacuole de phagocytose ou phagosome, l'ensemble formant un phagolysosome. Des phosphatases acides et alcalines, des estérases non spécifiques, peroxydase, aminopeptidase, phospholipase C, β -glucuronidase, ATPase et α -naphthylacétate estérase ont été détectées dans tous les types cellulaires, des variations quantitatives existant au niveau sub-cellulaire (Adema *et al.*, 1991).

Le métabolisme oxydatif associé à la phagocytose peut être analysé par la mesure de la chimioluminescence émise lors d'une attaque microbienne. Elle correspond à l'émission de lumière générée lors de la formation de radicaux oxygène et peut être détectée après amplification à l'aide de luminol (Annexe 1.5). La chimioluminescence dépendante du luminol (LDCL) permet de mettre en évidence, de manière quantitative, la formation des réactifs intermédiaires de l'oxygène (ROIs) tels que l'ion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyl ($OH\cdot$) et des ions hypohalides (OCl^-) (Trush *et al.*, 1978). Cette technique d'analyse a été adaptée à l'étude de la phagocytose des hémocytes de gastéropodes (Dikkeboom *et al.*, 1987 ; Dikkeboom *et al.*, 1988) et récemment de Mollusques marins (Bachère *et al.*, 1991 ; Le Gall *et al.*, 1991).

La mise en évidence d'un certain nombre d'enzymes de type lysosomal, d'un métabolisme oxydatif ainsi que des caractéristiques morphologiques a permis d'assimiler les hémocytes de Mollusques à des macrophages (Adema *et al.*, 1991) mais cette assimilation est encore peu documentée.

Chez les Vertébrés, des tumeurs de macrophages, spontanées ou induites expérimentalement, ont conduit à l'établissement d'un certain nombre de lignées cellulaires (Blasi *et al.*, 1987). Klebanoff and Clark (1978) ont passé en revue un certain nombre de travaux concernant l'altération des fonctions de phagocytose et de cytocidie intracellulaire, liée aux cellules leucémiques. Il en ressort que dans plusieurs types de leucémies, l'activité de phagocytose des granulocytes et des cellules mononucléaires est réduite. D'autre part, les leucocytes de patients atteints de différents désordres lympho- et myélo-prolifératifs ont un métabolisme oxydatif diminué, notamment lié à une activité plus faible de la NADPH oxydase. Plusieurs activités enzymatiques contenues

dans les granules des cellules myéloïdes leucémiques sont également réduites, voire absentes. D'autres caractéristiques, telles que la perte d'adhérence ou la réduction du chimiotactisme ont été rapportées.

Le rôle du système immunitaire dans l'élimination des cellules cancéreuses a été largement étudié chez l'homme, à partir des années cinquante. La preuve fut apportée par une équipe américaine qui en injectant une quantité limitée de cellules tumorales à des souris les a rendues résistantes à la greffe ultérieure de la tumeur immunisante alors qu'elles restaient sensibles à d'autres types de tumeurs (Foley *et al.*, 1953). De très nombreuses cellules tumorales sont ainsi reconnues comme "non-soi" suite à l'apparition d'antigènes spécifiques à la tumeur et éliminées par le système immunitaire. La formation d'une tumeur primaire et de métastases dépend donc de la capacité des cellules néoplasiques à échapper aux mécanismes de défense de l'hôte (Gorelik *et al.*, 1988).

Les systèmes de défense cellulaire non spécifiques (indépendants des anticorps), notamment ceux impliqués dans la réponse anti-tumorale, sont liés principalement à trois classes de cellules immunitaires : les macrophages activés, les neutrophiles polymorphonucléaires et les lymphocytes tueurs naturels activés (Annexe 1.6).

Les macrophages activés tueurs (MAK) ont un rôle important dans l'immunité anti-tumorale (Drysdale *et al.*, 1988). Le processus d'activation nécessite la liaison de certaines lymphokines, en particulier l'IFN- γ , aux récepteurs membranaires des macrophages et leur internalisation. Cette activation peut aussi être obtenue par contact avec des microorganismes ou leurs produits. L'effet tumoricide résulte de l'interaction entre le macrophage et la cellule cible qui précède le transfert des enzymes lysosomiales et des réactifs intermédiaires de l'oxygène, responsables de la lyse des cellules tumorales. Cependant, un contact direct ne serait pas nécessairement indispensable et d'autres produits excrétés par les macrophages (toxines, produits inhibant la croissance tumorale comme des protéases) pourraient expliquer le phénomène de lyse (Esgro *et al.*, 1990 ; Schwamberger *et al.*, 1991). Des monokines, telles que l'IL1 et le TNF, sont également produites par les macrophages activés et possèdent une activité cytolytique, soit sous forme libre, soit sous forme liée à la membrane.

Les granulocytes ou neutrophiles polymorphonucléaires (PMNs) sont souvent les premières cellules à infiltrer les tumeurs et contribuent à une première réaction de défense contre les cellules tumorales (Lichtenstein, 1990). Une étape d'activation est cependant nécessaire pour générer des PMNs tumoricides et différentes cytokines peuvent jouer ce rôle d'activateurs : l'IFN- γ , le TNF, l'IL1 et le GM-CSF. Les granulocytes possèdent deux mécanismes d'action : libération de cytotoxines

lysosomiales ou production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROIs). Parmi ceux-ci, l'ion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les ions halides ont été proposés comme participants à la cytotoxicité des polymorphonucléaires vis-à-vis des cellules cancéreuses (altération de l'ADN, perte de l'intégrité membranaire, perte de l'homéostasie cellulaire). Les cellules tumorales peuvent se défendre contre ces ROIs notamment par l'activité d'enzymes intracellulaires telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathione peroxydase. Les cytotoxines contenues dans les granules des neutrophiles et possédant un fort pouvoir tumoricide sont la cathepsine G et les défensines qui semblent avoir un effet synergique avec le peroxyde d'hydrogène (Lichtenstein *et al.*, 1988). Outre leur rôle tumoricide précoce, les PMNs attireraient les autres types cellulaires impliqués dans le contrôle anti-tumoral et participeraient probablement à leur activation (Lichtenstein, 1990 ; Ackermann *et al.*, 1989). Bien que l'activité anti-cancéreuse de ces cellules soit étudiée depuis peu, à la fois *in vitro* et sur des modèles animaux, leur participation dans le rejet des tumeurs semble réelle mais la possibilité de les activer *in vivo* par l'action de différentes cytokines reste à démontrer.

Le rôle des lymphocytes tueurs naturels ("Natural Killers", NK) et des lymphocytes tueurs activés par l'IL2 qui en dérivent ("Lymphokine Activated Killers", LAK) a été très étudié, leur capacité à inhiber la croissance tumorale et à détruire les cellules néoplasiques *in vivo* ayant été largement démontrée (Salup and Herberman, 1988 ; Wang *et al.*, 1991). Après contact avec la cellule cible, celle-ci est lysée par le relargage direct de médiateurs solubles tels que le TNF, l'IFN- γ ou le NKCF ou par l'exocytose d'éléments perforants tels que des perforines et des sérines estérases, bien que le rôle de ces dernières soit encore controversé (Ojcius *et al.*, 1991). Il semble que l'activité cytotoxique des cellules LAK soit essentiellement assurée par un effet synergique du TNF et de l'IFN (Chong *et al.*, 1989). Quoique leur effet cytolytique sur les cellules de la tumeur primaire soit important, elles ont une activité préférentielle de destruction intravasculaire des cellules tumorales et donc de prévention de formation de métastases (Herberman and Gorelik, 1989).

L'impact des cellules endothéliales dans ce processus reste à préciser bien qu'elles puissent être activées *in vitro* par incubation avec l'IFN- γ et le TNF- α pour lyser directement un grand nombre de cellules tumorales par un mécanisme indépendant de ces lymphokines. Des études récentes ont permis de suggérer que le mécanisme impliqué dans leur cytotoxicité anti-tumorale soit l'oxyde nitrique (Li *et al.*, 1991). Il semble donc important de tenir compte du rôle de ces cellules dans les réactions de défense anti-cancéreuse.

A côté de leur rôle primordial dans l'immunité anti-tumorale non spécifique, les macrophages et les lymphocytes tueurs naturels possèdent également des récepteurs à la portion Fc des immunoglobulines (Schwamberger *et al.*, 1991). A ce titre, ils participent

à la cytotoxicité cellulaire spécifique, dépendante des anticorps qui est essentiellement assurée par les lymphocytes T cytotoxiques. Ces derniers vont reconnaître spécifiquement les cellules néoplasiques grâce aux anticorps dirigés contre les antigènes associés à la tumeur, infiltrer la masse tumorale et lyser les cellules. Le mécanisme de cytolyse semble être identique à celui des lymphocytes tueurs naturels, c'est-à-dire, sécrétion de perforines, de sérine estérases et de cytokines.

Bien que certaines cytokines aient un effet cytotoxique sur les cellules tumorales (Wadler and Schwartz, 1990), leur rôle semble être essentiellement indirect en impliquant la participation d'autres cellules et d'autres produits de l'hôte. Ainsi, outre leur activité cytocide à l'encontre des cellules cancéreuses, le TNF et l'IL1 activent les macrophages et les PMNs. Par contre, l'IL2 qui est classiquement utilisé en thérapie induit les lymphocytes LAK et l'IFN- γ joue essentiellement un rôle d'activation des macrophages en collaboration avec d'autres cytokines. L'IL6 pourrait avoir un rôle dans la défense anti-tumorale mais le mécanisme reste obscur (Schreiber *et al.*, 1990).

4. CARACTERISATION GENETIQUE DES TUMEURS

Chez les Mollusques bivalves, l'étude du génome a été limitée à l'analyse de séquences mitochondriales (Blot *et al.*, 1990 ; Fisher and Skibinski, 1990) et à la mesure des distances inter-génériques basée sur l'analyse des polymorphismes de longueurs des fragments de restriction (RFLP) et la détection de séquences répétitives (Brock, 1989). En ce qui concerne les oncogènes, aucune information n'est disponible. Un gène *rho* ("*ras-homologue*") montrant 35 % d'homologie au niveau acides aminés avec *H-ras* a été identifié chez le Mollusque gastéropode marin *Aplysia californica* (Madaule and Axel, 1985). Il faut noter que la mise en évidence de ce gène a été fortuite puisque les auteurs criblaient une banque d'ADNc avec des sondes correspondant à des hormones peptidiques de mammifères.

A l'instar des travaux réalisés chez les Vertébrés (Kitabayashi *et al.*, 1990), la recherche d'oncogènes a été entreprise chez des Invertébrés en exploitant la conservation des séquences de proto-oncogènes et en appliquant des techniques d'hybridation moléculaire. Ainsi, Walker *et al.* (1992) ont cloné et séquencé le premier gène *myc* mis en évidence chez un échinoderme, l'étoile de mer (*Asteria vulgaris*), la présence de ce gène ayant été préalablement rapportée chez l'oursin (Mifflin and Robinson, 1988). Aucun oncogène spécifiquement impliqué dans un processus de tumorigénèse n'a été cependant identifié, chez ces organismes.

Chez les Crustacés, la recherche de séquences de type oncogène se limite à l'identification du gène *ras* d'*Artemia* sp. qui a ensuite été séquencé (Diaz-Guerra *et al.*, 1989). Cette séquence présente 75-80 % d'homologie avec les gènes homologues de *D. melanogaster* ou de mammifères (*Ha-ras*, *Ki-ras*, *N-ras*) et seulement 50-60 % avec ceux d'eucaryotes inférieurs (*Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*).

Chez les Insectes, l'importance des études sur la biologie moléculaire du développement a été à l'origine de la mise en évidence d'un certain nombre de séquences de type oncogène, notamment chez la drosophile. Ainsi, de nombreuses séquences ont été identifiées dans un premier temps, en tant que gènes indispensables pour un développement embryonnaire harmonieux, puis assimilées à divers oncogènes décrits chez les Vertébrés, en particulier *ras*, *abl* (Shilo and Weinberg, 1981). Chez un autre diptère *Calliphora erythrocephala*, le gène *abl* a également été séquencé (Durica *et al.*, 1987). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, des séquences homologues de plusieurs oncogènes ont été détectées par hybridation avec des oncogènes de virus de mammifères mais seul le gène *abl* a été caractérisé et séquencé (Goddard *et al.*, 1986).

Le premier oncogène à avoir été cloné chez les Vertébrés inférieurs fut le gène *ras* chez *Carassius auratus* (Nemoto *et al.*, 1986). Au même moment, van Beneden et ses collègues (1986) séquençaient le gène *c-myc* de la truite arc-en-ciel. Depuis, plusieurs oncogènes ont été isolés chez *Xiphophorus* (Schartl *et al.*, 1990) et leur expression a été suivie dans des tissus embryonnaires, adultes et transformés (Mäueler *et al.*, 1988). Il est intéressant de noter que des tumeurs chez *Microgadus tomcod* (Wirgin *et al.*, 1989) et chez *Pseudopleuronectes americanus* (Mac Mahon *et al.*, 1988) ont été associées à l'oncogène *Ki-ras*, activé par mutation ponctuelle dans la seconde base du douzième codon, comme cela a été mis en évidence chez les Vertébrés supérieurs (Barbacid, 1990).

Chez les Vertébrés supérieurs, l'analyse génétique des cancers a été réalisée à l'échelle du génome mais aussi à l'échelle des gènes pour essayer de comprendre le mécanisme d'activation. Ainsi, dans le cas de tumeurs malignes et notamment de tumeurs solides humaines, des anomalies de ploïdie, incluant l'aneuploïdie et l'hyperploïdie, sont fréquentes, surtout dans des cellules de type indifférencié (Taya *et al.*, 1987). La technique de cytométrie de flux s'est généralisée pour des analyses quantitatives de l'ADN, au détriment de la caryologie ou de l'autoradiographie, car elle permet l'étude rapide de nombreuses cellules (Braylan *et al.*, 1984). Cette méthode a une valeur pronostique majeure dans l'évaluation de la survie de patients atteints de divers types de cancer (Cornelisse *et al.*, 1987 ; Lundberg *et al.*, 1987 ; Rodenburg *et al.*, 1987).

De plus, elle a un intérêt plus fondamental dans l'étude de l'hétérogénéité des cellules tumorales en terme de degré de ploïdie, la présence de multiclonalité et le profil de prolifération (Braylan *et al.*, 1984).

A l'échelle des gènes, les oncogènes cellulaires ou proto-oncogènes ont été mis en évidence en 1976 par la découverte de leur homologie avec les gènes transformants des rétrovirus (Stéhelin *et al.*, 1976). Ces proto-oncogènes présents dans les cellules normales montrent une conservation au cours de l'évolution des espèces, ce qui amena à penser que ces gènes étaient impliqués dans des processus fondamentaux de la vie cellulaire (Brison, 1986).

Les produits de ces gènes peuvent être classés en cinq familles selon leur localisation dans différents compartiments cellulaires et leur appartenance aux chaînes de transduction des signaux mitotiques entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule (Annexe 1.7). L'initiation et la progression de la prolifération des cellules quiescentes sont ainsi contrôlées par une série de signaux transmis par l'intermédiaire des protéines codées par les proto-oncogènes. Leur nombre est évalué à plus de 80, suivant la définition précise qui leur est attribuée (Tambourin, 1990). Une liste regroupant les principaux proto-oncogènes et oncoprotéines est présentée dans l'annexe 1.8.

Le rôle des proto-oncogènes dans le développement a été précisé initialement sur la base des travaux indiquant une forte homologie entre ceux-ci et un certain nombre de gènes impliqués dans le développement chez la drosophile (Rijsewijk *et al.*, 1987 ; Caudy *et al.*, 1988 ; Ambrosio *et al.*, 1989). Par la suite, les rôles des proto-oncogènes dans les processus du développement chez les Vertébrés ont été largement étudiés (Müller *et al.*, 1982 ; Martin-Zanca *et al.*, 1990), les profils d'expression spatio-temporelle de ces gènes étant régulés au cours du développement et de l'embryogénèse (Méchali *et al.*, 1989 ; Vize *et al.*, 1990 ; Boulter *et al.*, 1991). Certains proto-oncogènes sont préférentiellement exprimés durant les stades de différenciation tels que *src*, *fos*, *mos* ou *ras* (Simons *et al.*, 1990a ; Garrett, 1986), alors que d'autres sont plus directement associés à la prolifération cellulaire : *c-myc*, *p53* (Robert-Lézénès *et al.*, 1988).

Les proto-oncogènes ont été impliqués dans le développement et la progression de tumeurs humaines ou animales, pour lesquelles le processus de transformation résulte d'altérations d'un ou plusieurs de ces gènes (Stéhelin, 1988). Les mécanismes d'activation des proto-oncogènes en oncogènes sont variés, ils peuvent être qualitatifs ou quantitatifs :

- les *mutations ponctuelles* dont l'exemple le mieux connu est celui du gène *ras*. Différents agents inducteurs (cancérogènes chimiques, ultra-violets, rayons X) peuvent être responsables de l'activation de ce gène en provoquant la mutation d'un

seul nucléotide en des sites préférentiels correspondant aux codons 12, 13, 59 ou 61 (Barbacid, 1990).

- les *translocations chromosomiques* occasionnent le rapprochement de deux gènes normalement séparés dont l'un, constitutivement exprimé, active la transcription du second, qui devient sous la dépendance des séquences de promotion et d'activation du premier. Le lymphome de Burkitt dans lequel les réarrangements chromosomiques mettent le gène *myc* sous la dépendance des promoteurs de gènes d'immunoglobulines en est une illustration (Guillermo-Suarez, 1989).

- les *amplifications géniques* résultent de la réplication d'un même segment d'ADN des dizaines de fois et, en entraînant l'accumulation surabondante des produits du gène, donnent naissance à des chromosomes "DM" (double-minute) ou à des régions "HSR" ("homologous staining region"), comme dans le cas du neuroblastome humain (Schwab and Amler, 1990).

- la *transduction* d'oncogènes par des rétrovirus dans un génome hôte correspond à un événement hautement cancérogène (Bradshaw, 1986).

- l'*activation insertionnelle* de proto-oncogènes est provoquée par l'intégration de rétrovirus dont les promoteurs forts activent leur transcription.

- d'autres altérations telles que des *truncations* et la *perte* ou l'*inactivation d'anti-oncogènes* tels que le gène p53 ou le gène Rb (rétinoblastome) peuvent également jouer un rôle de promotion de tumeur (Garrett, 1986 ; Studzinski, 1989).

S'il est vrai qu'une seule de ces modifications peut changer le phénotype cellulaire, plusieurs altérations génétiques, dans le même proto-oncogène ou le plus souvent dans plusieurs proto-oncogènes différents, sont nécessaires pour qu'une cellule devienne cancéreuse.

La disponibilité de séquences d'oncogènes a permis leur utilisation dans le diagnostic de différents types de tumeur, par hybridation moléculaire. La mise au point récente de la technique de polymérisation en chaîne (PCR) a grandement facilité et amélioré la sensibilité de la détection de séquences d'oncogènes activés (Kumar and Barbacid, 1988 ; Kawasaki *et al.*, 1988 ; Mac Cormick, 1989). L'hybridation *in situ* se révèle une méthode privilégiée car elle permet aussi bien l'analyse de l'expression spatio-temporelle des proto-oncogènes (Koji *et al.*, 1988 ; Szentirmay *et al.*, 1990) que la détection de séquences d'oncogènes, notamment dans le cas d'amplifications géniques (Cohen *et al.*, 1988 ; Monden *et al.*, 1988).

L'expression expérimentale d'oncogènes cellulaires (certains gènes de la famille *myc*,...) ou viraux (séquences grand T du polyome, E1A d'adénovirus,...) peut permettre l'immortalisation de cellules normales. Différentes méthodes ont été utilisées :

cancérogénèse chimique, radiations ou obtention de lignées à partir de cellules tumorales. Actuellement, l'intégration d'oncogènes par transfection cellulaire ou infection rétrovirale est privilégiée (Kelekar and Cole, 1987 ; Roberson and Walker, 1988) et a permis l'établissement de nombreuses lignées cellulaires (Annexe 1.9). La transfection peut être réalisée sur des cellules foetales ou adultes et différenciées. Le choix de la séquence transfectée est important, notamment la nature du promoteur, car il est possible d'orienter une expression du gène et de limiter ses effets à un type cellulaire ciblé. Par ailleurs, certains oncogènes ont un pouvoir transformant alors que d'autres sont uniquement immortalisants (Guillouzo et Gugen-Guillouzo, 1991). Pour pallier à l'efficacité souvent faible des techniques de transfection *in vitro*, plusieurs équipes pratiquent une oncogénèse ciblée, *in vivo*, basée sur la création d'animaux transgéniques. Le principe est de placer des oncogènes sous le contrôle de promoteurs et de régions régulatrices de gènes dont l'expression est restreinte à certaines phases du développement ou à certains tissus (Kahn et Briand, 1991). Cette approche permet l'étude fine des processus de tumorigénèse (Berns *et al.*, 1989) et de pathogénèse à l'échelle de l'organisme (Lassam *et al.*, 1989).

MATERIELS ET METHODES

1. ANIMAUX ET PRELEVEMENT D'HEMOLYMPHE

1.1. Animaux sains

Les moules *Mytilus edulis* proviennent du bassin de Marennes-Oléron.

Les huîtres *Crassostrea gigas*, les palourdes *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* sont collectées dans le bassin de Marennes-Oléron. Les huîtres *Ostrea edulis* sont originaires de l'étang de Thau, en Méditerranée et les coquilles Saint-Jacques *Pecten maximus* sont issues de la baie de Saint-Brieuc, en Bretagne.

1.2. Animaux néoplasiques

Les moules sont originaires du Puget Sound, Etat de Washington (USA). Elles ont historiquement appartenu à l'espèce *Mytilus edulis* selon des caractéristiques morphologiques. Cependant, de récentes analyses d'isozymes ont permis de les classer *Mytilus trossulus* (Brooks, 1991).

La maladie n'étant pas identifiée en France, ces animaux sont maintenus dans une salle d'élevage dont l'accès est rigoureusement contrôlé. Ils sont placés dans des bacs dont l'eau de mer est refroidie à 5°C et recyclée en circuit fermé par filtration sur charbon actif. Cette eau est traitée à l'hypochlorite de sodium (3 % vol/vol NaOCl 48°C, 48 h) avant rejet dans un circuit d'évacuation d'eau douce dirigé vers une station d'épuration.

1.3. Prélèvement d'hémolymphe

A l'aide d'une lime, une entaille est pratiquée à la jonction des deux valves près du muscle adducteur postérieur. Une aiguille "23 G" montée sur une seringue est introduite au travers du muscle adducteur dans le sinus intramusculaire et 500 à 1500 µl d'hémolymphe sont ponctionnés.

1.4. Identification des animaux néoplasiques

Les moules néoplasiques sont identifiées par observation à l'état frais d'un prélèvement d'hémolymphe. Une goutte est déposée sur une lame de verre, incubée 15 à 30 min en chambre humide et examinée en utilisant un microscope inversé, équipé d'un

dispositif de contraste interférentiel. Les hémocytes néoplasiques sont caractérisés par leur incapacité à adhérer et à s'étaler sur la lame de verre ainsi qu'à s'agréger entre eux.

2. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

2.1. Microscopie photonique

2.1.1. Préparation des échantillons

. Préparation d'hémocytes

Deux techniques sont utilisées pour obtenir les préparations d'hémocytes :

- *la technique de primoculture* consiste à laisser s'étaler spontanément les cellules d'une goutte d'hémolymphe diluée dans une goutte d'eau de mer sur une lame de verre pendant 15 à 30 min. Après séchage, la préparation est fixée à l'acétone pendant 10 min. Les échantillons ainsi préparés peuvent être immédiatement utilisés ou conservés à -20°C .

- *la technique de cyto centrifugation* permet de réaliser des préparations avec un nombre défini de cellules. L'hémolymphe est prélevée directement (1 vol/3 vol) dans une solution d'Alsever (glucose : 20,8 g ; citrate de sodium : 8 g ; EDTA : 3,36 g ; NaCl : 22,3 g ; H₂O : 1000 ml) et la concentration cellulaire dénombrée à l'aide d'une cellule de Malassez. Les hémocytes sont alors dilués, de manière à obtenir une concentration de 100.000 cellules/ml/lame, et centrifugés (100 g, 5 min) à l'aide d'une cyto centrifugeuse (Miles). Les préparations sont ensuite fixées 10 min à l'acétone avant d'être stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

. Préparation de tissus

La moule vivante est entièrement enlevée de sa coquille après section des muscles adducteurs et fixée dans une solution de Carson (NaH₂PO₄, 2H₂O : 23,4 g ; NaOH : 5 g ; H₂O : 900 ml ; formaldéhyde 40 % : 100 ml ; pH 7,3). Après la coupe transversale du corps, un échantillon de 2 à 3 mm d'épaisseur est déshydraté par des bains successifs de Carson, éthanol 95°, éthanol 100° et xylène avant d'être imprégné de paraffine à l'aide d'un automate à inclusion Tissue-Tek (Miles). L'échantillon est alors inclus dans

un bloc de paraffine et des coupes de 3 μm d'épaisseur sont réalisées au moyen d'un microtome (LKB). Ces dernières sont prélevées sur une lame de verre à la surface d'un bain d'eau distillée, maintenu à 45°C, puis séchées à l'étuve à 50°C, 30 min.

2.1.2. Colorations

Les préparations d'hémocytes peuvent être colorées aussitôt alors que les préparations de tissus nécessitent d'être réhydratées avant coloration. Dans ce but, les lames sont placées dans des bains successifs de xylène, éthanol absolu et eau distillée.

Deux colorations sont utilisées :

- la coloration du kit *Hémacolor* (Merck) qui est une variante rapide de la coloration de May-Grünwald Giemsa et consiste en trois bains successifs de quelques secondes dans du méthanol, une solution A puis une solution B.

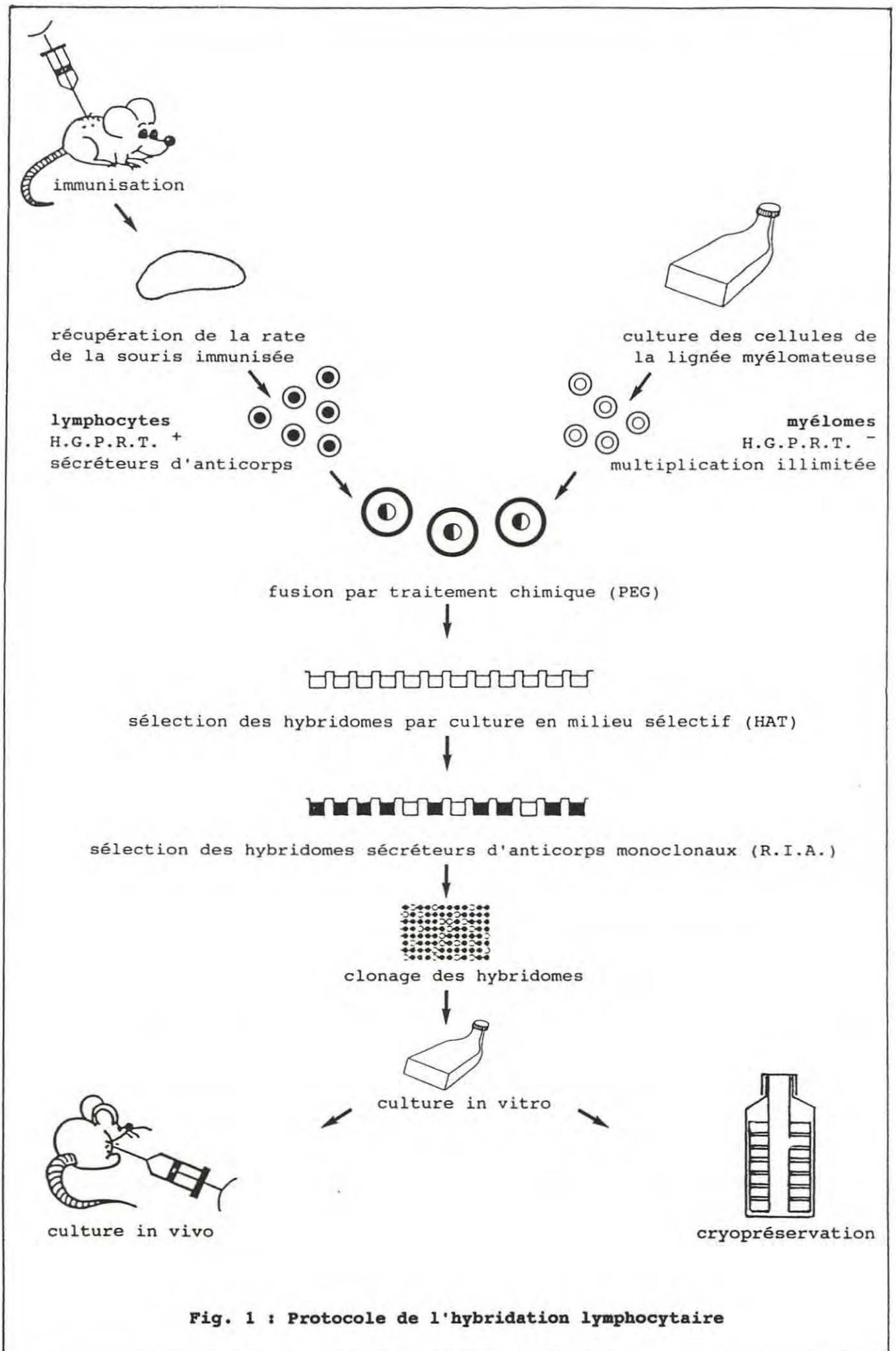
- la coloration à l'hématoxyline-éosine consiste à immerger successivement les lames dans :

. hématoxyline d'Ehrlich	8 min
. éthanol 100°, HCl 2 %	10 sec
. eau du robinet	coloration mauve
. éosine	5 min
. eau du robinet	10 sec
. éthanol 100°	2 X 10 sec
. xylène	2 X 2 min

Les lames encore humides sont montées à l'Eukitt.

2.2. Microscopie électronique à transmission

Les hémocytes sont dilués (vol/vol) au moment du prélèvement dans la solution de fixation : glutaraldéhyde 2,5 % dans un tampon cacodylate de sodium-HCl 0,1 M dont l'osmolarité est ajustée à 1000 mOsm avec du saccharose. Après lavage dans du tampon cacodylate 0,1 M-saccharose pendant 12 h et centrifugation (200 g, 10 min), les cellules sont post-fixées au tétraoxyde d'osmium à 1 % en tampon cacodylate 0,1 M-NaCl 0,05 M pendant 30 min. Un lavage des hémocytes dans ce tampon précède leur inclusion dans de l'agarose à 1 % (Low Melting Point, Sigma). Après centrifugation (200 g, 10 min), le bloc d'agarose contenant les cellules est successivement déshydraté, puis imprégné dans l'Epon 812 (Fluka) à l'aide d'un automate à inclusion (Ultroprocesseur, LKB).



Après polymérisation de la résine (3 à 4 jours à 60°C), des coupes ultra-fines d'une épaisseur de 60 à 90 nm sont réalisées à l'aide d'un couteau en diamant, prélevées sur une grille de cuivre et contrastées à l'acétate d'uranyl aqueux (30 min à 40°C) et le citrate de plomb (30 min à 40°C) au moyen d'un automate de type Carlsberg (Ultrastainer, LKB). Les grilles sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission de type Jeol 1200 CX.

3. PRODUCTION D'ANTICORPS SPECIFIQUES

3.1. Obtention et épuration d'anticorps polyclonaux

3.1.1. Immunisation

Les souris BALB/c reçoivent une injection intraveineuse d'environ 300 μ l d'hémolymphe néoplasique (*M. trossulus*) diluée au 1/4 (approximativement 3.10^6 cellules) dans un mélange d'eau de mer et d'eau distillée de manière à obtenir une suspension isoosmotique au sérum de souris. Les inoculums sont préalablement congelés puis décongelés afin de rompre les cellules. Quatre injections de rappel identiques sont effectuées à environ quinze jours d'intervalle.

3.1.2. Epuisement des anticorps polyclonaux

Le sang est prélevé au niveau du sinus rétroorbital de souris immunisées puis centrifugé (900 g, 20 min, 8°C) pour récupérer le sérum. Celui-ci est incubé pendant 3 h à température ambiante, puis 12 h à 4°C avec des hémocytes normaux (50.000 cellules) qui ont été préalablement déposés sur la membrane des puits d'une microplaque GV (Millipore). Le sérum épuré est ensuite prélevé et immédiatement testé.

3.2. Préparation d'anticorps monoclonaux par la technique d'hybridation lymphocytaire

Le protocole utilisé est une variante de la méthode de Kohler et Milstein (1975) et est résumé dans la figure 1.

3.2.1. Immunisation

. Immunisation active

L'hémolymphe de moules néoplasiques (*M. trossulus*) est diluée au 1/8^e (approximativement 2.10^6 cellules) dans un mélange isoosmotique d'eau de mer et d'eau distillée stérile, puis soumise à une série de congélation-décongélation avant d'être injectée (300 μ l) par voie intraveineuse à des souris BALB/c. Deux semaines plus tard, une injection de rappel identique est effectuée.

. Immunisation passive

Des souris BALB/c reçoivent 4 fois à 3 jours d'intervalle, environ 300 μ l d'hémolymphe de moules *M. edulis*, diluée (1/3) dans un mélange d'eau de mer et d'eau distillée. Une semaine après le dernier rappel, les souris sont saignées et leur sérum est récupéré. Il est ensuite incubé avec des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* pendant 2 h à 37°C. Après centrifugation (3200 g, 30 min), les hémocytes sont remis en suspension dans une solution de NaCl 0,2 M puis congelés à -20°C. 300 μ l de cette suspension sont injectés à 4 reprises et à intervalles de 3 jours, à des souris BALB/c.

. Rappel d'immunisation

Trois jours avant la date prévue pour l'hybridation lymphocytaire, un dernier rappel consiste en l'injection de 300 μ l d'une suspension isoosmotique d'hémolymphe néoplasique de *M. trossulus* ($2,5.10^6$ cellules/souris). L'injection est effectuée selon le protocole suivant, pour éviter une éventuelle réaction d'hypersensibilité :

- 1/10^e de la dose (30 μ l) par voie sous-cutanée
attendre 45 min
- 1/10^e de la dose (30 μ l) par voie sous-cutanée
attendre 45 min
- 2/10^e de la dose (60 μ l) par voie sous-cutanée
attendre 30 min
- 200 μ l d'une solution de prométhazine à 0,5 mg/ml de tampon phosphate stérile par voie intrapéritonéale (soit 5 mg/kg de souris)
attendre 15 min
- 6/10^e de la dose (180 μ l) par voie péritonéale

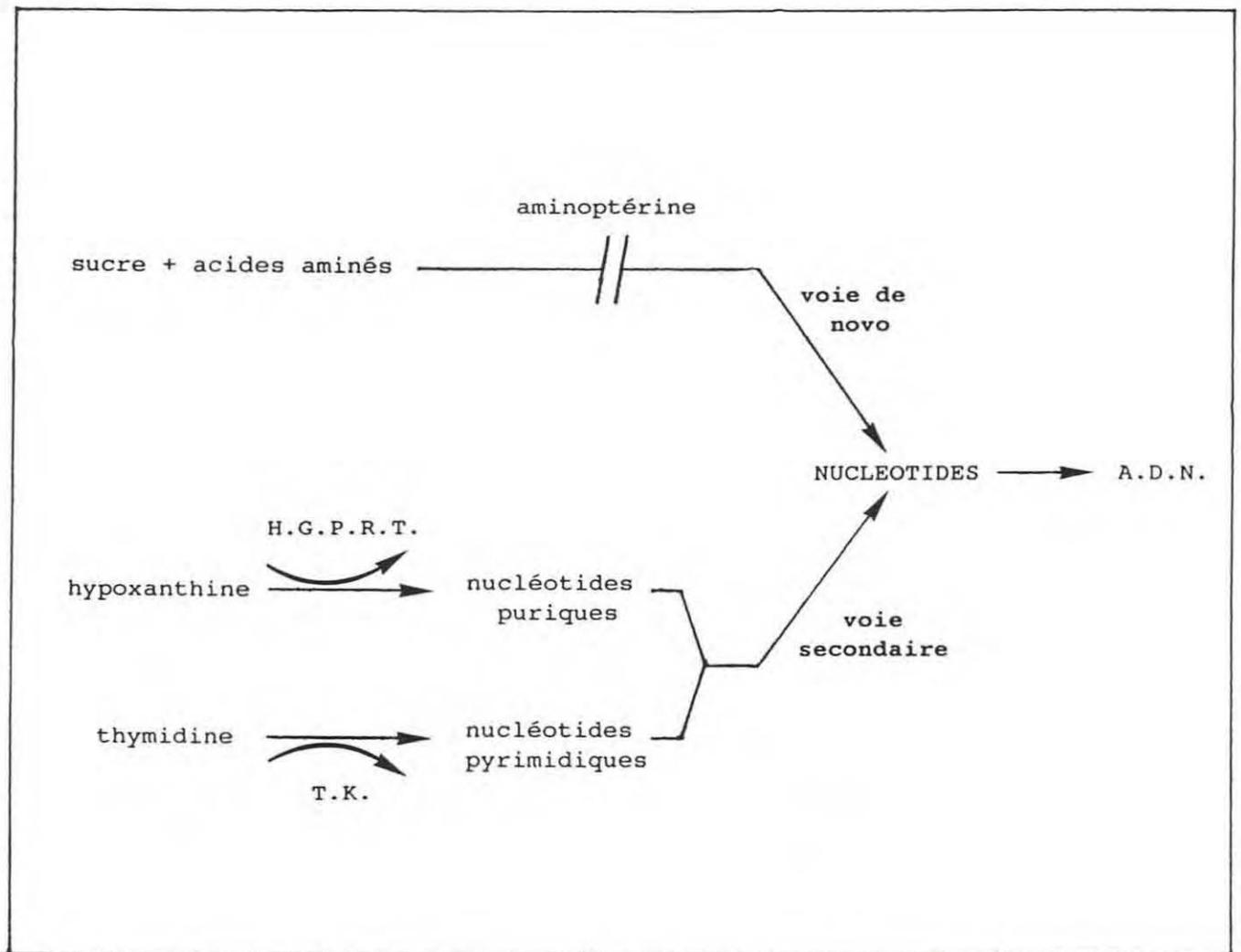


Fig. 2 : Les deux voies de synthèse des nucléotides de l'A.D.N.
 (H.G.P.R.T.: hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase;
 T.K.: thymidine kinase)

3.2.2. Préparation des cellules

Les macrophages répartis au fond des puits de culture ont pour rôle d'une part, de phagocyter les cellules mortes et les éventuels microorganismes et d'autre part, de métaboliser le milieu de culture.

Des souris OF1 sont tuées par élévation et rupture de la colonne vertébrale. Après avoir ouvert la peau de l'abdomen, 5 ml de milieu RPMI 1640 (Gibco) sans SVF (sérum de veau foetal) sont injectés dans la cavité péritonéale qui est rincée par aspiration et refoulement successifs. Les macrophages péritonéaux sont recueillis dans ce milieu, centrifugés (250 g, 10 min, 4°C) et remis en suspension dans 10 ml de milieu RPMI 1640 sans SVF. Ils sont alors distribués à raison de 100 µl de suspension (1 à 3.10⁶ cellules/10 ml) dans chaque puits d'une microplaque et placés à 37°C dans un incubateur à 5 % de CO₂. L'incubation se fait pendant la nuit précédant la fusion.

Les cellules de la lignée myélomateuse P3X63Ag8-653 sont déficientes en HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase), enzyme intervenant dans la voie de synthèse secondaire des nucléotides (Fig. 2).

Ces cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 sans SVF additionné de 8-azaguanine 0,13 mM, un analogue létal de l'hypoxanthine. Le jour précédant la fusion, une concentration de 50.000 cellules/ml est nécessaire afin de se situer dans la phase exponentielle de croissance (temps de doublement cellulaire : 18 h dans les conditions de culture).

Les lymphocytes sécréteurs d'anticorps sont récupérés après décapitation de la souris immunisée et prélèvement de la rate. Celle-ci est rincée dans du milieu RPMI 1640 sans SVF et broyée dans un homogénéisateur de tissus de type Dounce dans 10 ml de milieu RPMI 1640. Ces opérations sont pratiquées sur de la glace pilée. Le broyat est alors filtré sur une gaze stérile et le filtrat est centrifugé (150 g, 10 min, 4°C). Le culot est repris dans 10 ml de milieu RPMI 1640 et les splénocytes sont dénombrés à l'aide d'une cellule de Malassez après coloration vitale au bleu trypan (les lymphocytes ne doivent pas être confondus avec les globules rouges qui sont de taille inférieure).

3.2.3. Fusion cellulaire

Les cellules myélomateuses sont dénombrées (N1), centrifugées (200 g, 5 min, 4°C), le culot est dilué dans du milieu RPMI 1640 et à nouveau centrifugé. Ce culot est repris

dans 5 ml de milieu RPMI et les cellules sont une nouvelle fois comptées (N2), le rapport N2/N1 servant à estimer la condition physiologique des cellules.

Ces cellules sont alors ajoutées dans le tube contenant les splénocytes selon un rapport de 5 splénocytes pour 1 myélome. Cette suspension est centrifugée (200 g, 10 min, température ambiante) et le culot est remis en suspension par simple agitation du tube.

Les étapes suivantes sont alors rigoureusement suivies :

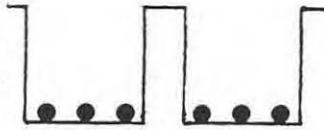
- t0 : ajouter 1 ml de polyéthylène glycol 1540 (PEG) à 37°C
en tapotant le tube, les dix premières gouttes étant additionnées
en 30 sec
- t0'30 : mettre au bain-marie à 37°C
- t1'30 : centrifuger (200 g, 20°C)
- t3'00 : arrêter rapidement la centrifugeuse
- t4'30 : mettre au bain-marie à 37°C sans agiter
- t6'30 : ajouter aussitôt 6 ml de milieu RPMI 1640 + 15 % SVF à 37°C,
à raison de 100 µl toutes les 5 sec puis additionner 9 ml de
milieu RPMI 1640 + 15 % SVF

La suspension est centrifugée (150 g, 10 min, 20°C) et le culot repris dans 10 ml de milieu RPMI 1640 + 15 % SVF. Les cellules sont ensuite diluées de manière à obtenir 15.10⁶ cellules/10 ml/plaque dont 12,5.10⁶ splénocytes, puis elles sont réparties dans les puits de culture (100 µl) contenant les macrophages dont le surnageant a été éliminé auparavant. L'incubation des plaques de culture est réalisée à 37°C dans un incubateur à 5 % de CO₂.

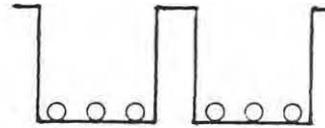
3.2.4. Sélection des hybridomes

Un jour après la fusion, 100 µl de milieu RPMI 1640 + 15 % SVF + HAT 2X (Hypoxanthine 0,2 mM, Aminoptérine 0,8.10⁻³ mM, Thymidine 0,032 mM). Au quatrième jour, 100 µl de surnageant de culture sont remplacés par 100 µl de milieu RPMI 1640 + 15 % SVF + HAT 2X, puis au neuvième et dixième jour, 150 µl de surnageant sont à nouveau remplacés par le même volume de milieu RPMI 1640 + 15 % SVF + HT 1X (Hypoxanthine, Thymidine).

hémodocytes
néoplasiques



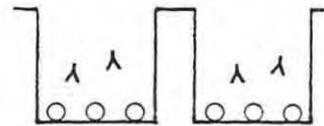
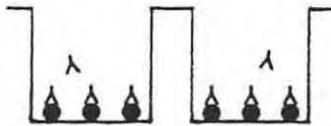
hémodocytes
normaux



1. dépôt de l'antigène (50.000 cellules/100 μ l seasalts/puits)
et aspiration immédiate

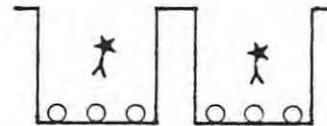
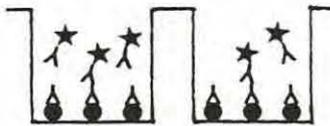
2. lavage NaCL 0,5 M (2 fois) et filtration sous vide

3. séchage des plaques à 37°C



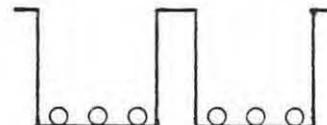
4. dépôt de 50 μ l de surnageant de culture/puits
incubation 1 h, température ambiante

5. lavage P.B.S. (5 fois)



6. dépôt de l'anticorps anti-Ig de souris, couplé à l'I¹²⁵
(200.000 cpm/100 μ l P.B.S. + 0,5 % B.S.A./puits)
incubation 1 h, température ambiante

7. lavage P.B.S. + Tween 20 0,5 % (5 fois)



8. séchage à 37°C

9. comptage au compteur à scintillation

Fig. 3 : Protocole du dosage radioimmunologique (R.I.A.)

3.2.5. Criblage des hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques

Au moment du criblage, 130 μ l de surnageant de culture sont prélevés et remplacés par 150 μ l de milieu RPMI 1640 + 10 % SVF + HT 1X.

La sélection des hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques est basée sur la comparaison de l'activité des surnageants de culture vis-à-vis d'une part, des hémocytes néoplasiques et d'autre part, vis-à-vis des hémocytes normaux. Ainsi, ces deux types de cellules (50.000 cellules/puits) sont adsorbés par aspiration à la surface d'une membrane durapore (0,22 μ m) d'une plaque de microtitration de type GV (Millipore). La fixation des anticorps sur ces cellules est révélée à l'aide d'une technique radioimmunologique indirecte dont les différentes étapes sont résumées dans la figure 3.

Les hybridomes sont retenus selon leur spécificité vis-à-vis des hémocytes néoplasiques ou des hémocytes normaux ou des deux types de cellules à la fois. Ils sont alors transférés et cultivés dans les puits de plaques de culture contenant 5 ml de milieu RPMI 1640 + 10 % SVF + HT 1X, puis congelés dans l'azote liquide.

3.2.6. Cryopréservation et décongélation des hybridomes

Lorsque la concentration cellulaire est suffisante, les hybridomes sont centrifugés (250 g, 10 min, 4°C) et repris dans du SVF + 7,5 % DMSO (diméthylsulfoxyde) à raison de 3 à 5.10⁶ cellules/ml. Cette suspension cellulaire (1 ml) est répartie en ampoules qui sont placées dans un container isotherme à l'intérieur d'un congélateur à -80°C. Au bout de 48 h de refroidissement progressif, les ampoules sont transférées dans un container à azote liquide où elles sont conservées à -196°C.

La décongélation s'opère en plongeant rapidement les ampoules dans un bain-marie à 37°C. La suspension cellulaire est immédiatement aspirée dans une seringue contenant 5 ml de milieu RPMI 1640 + 10 % SVF et diluée aussitôt dans un volume de 15 ml de ce même milieu. Elle est ensuite soumise à une centrifugation (250 g, 5 min, 20°C) pour éliminer le DMSO. Le culot est repris dans 5 ml de milieu et transvasé dans un puits de microplaque contenant des macrophages.

3.2.7. Clonage d'hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques

Après décongélation et remise en culture des hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques, leur clonage est réalisé par la technique des dilutions limites. Les cellules



1. dépôt de l'antigène 50.000 cellules/100 μ l seasalts/puits) et aspiration immédiate

2. lavage NaCl 0,5 M (2 fois) et filtration sous vide

3. séchage à 37°C



4. dépôt de 50 μ l de surnageant de culture/puits incubation 1 h, température ambiante

5. lavage NaCl 0,1 M + Tween 20 0,05 % (7 fois)



6. dépôt de l'anticorps couplé à la phosphatase alcaline (1/4000^e dans tampon IF (Dignostics Pasteur)/100 μ l) incubation 2 h, 20°C

7. lavage NaCl 0,1 M + Tween 20 0,05 % (7 fois)



8. addition du substrat: 200 μ l de nitro phényl phosphate (NPP) (1 mg NPP/ml tampon diéthanolamine 20 %, pH 9,8) incubation 1 h, température ambiante

9. lecture à 405 nm au lecteur de plaques

Fig. 4 : Protocole de l'immunodosage enzymatique de type ELISA

sont réparties en microplaques à raison de 1 cellule/2 ou 3 puits/200 μ l milieu RPMI 1640 + 10 % SVF.

La spécificité des anticorps produits par ces hybridomes est à nouveau testée après une à deux semaines de culture. Ce criblage ayant été effectué en plusieurs fois, les techniques utilisées sont la méthode de radiomarquage indirect (Fig. 3), un immunodosage indirect de type ELISA (Fig. 4) ou une technique d'immunofluorescence indirecte sur lames (cf paragraphe 4.1.). Les hybridomes retenus sont cultivés dans du milieu RPMI 1640 + 10 % SVF en fiole de 50 cm² puis cryopréservés.

3.2.8. Production des anticorps monoclonaux en ascites

Après centrifugation des hybridomes en culture (250 g, 5 min, 20°C), une suspension de 3 à 5.10⁶ cellules sous 0,5 à 1 ml de milieu RPMI 1640 sans SVF est injectée dans le péritoine d'une souris. Cette dernière a reçu deux semaines auparavant une injection de 0,5 ml de pristane pour favoriser la formation d'une tumeur liquide. Le liquide d'ascite contenant les anticorps dont la concentration est de l'ordre de quelques mg/ml est ponctionné une à quatre semaines plus tard. Une centrifugation (250 g, 5 min, 4°C) permet d'éliminer les cellules et l'ascite est conservée à -20°C.

3.2.9. Isotypage et purification des anticorps monoclonaux

. Isotypage

Les classes et les sous-classes des anticorps monoclonaux sont déterminées selon la méthode d'immunodiffusion d'Ouchterlony, à l'aide du "Mouse Monoclonal Typing Kit" (ICN ImmunoBiologicals).

. Chromatographie d'affinité sur protéine A-Sépharose

La protéine A-Sépharose (Pharmacia) adsorbe spécifiquement les IgG des sérums, les autres protéines étant éliminées par simple lavage à différents pH. Les liquides d'ascite sont préalablement filtrés sur une toile à blutter puis sur filtre de 8 μ m afin d'éviter l'obstruction de la colonne. Le volume de gel dépend de la quantité d'anticorps à purifier (approximativement 22 ml pour 20 ml d'ascite). Après passage de l'ascite, les anticorps

sont élués grâce à un tampon citrate de sodium 0,1 M à différents pH (pH 5,5 : IgG1 ; pH 4,5 : IgG2a ; pH 4 : IgG3 ; pH 3,5 : IgG2b).

4. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

4.1. Immunofluorescence indirecte

Les solutions d'anticorps primaires correspondent soit à des surnageants de culture, soit à des anticorps purifiés et dilués à raison de 25 $\mu\text{g/ml}$ dans du tampon immunofluorescence (IF, Diagnostics Pasteur). 50 μl de la solution d'anticorps sont déposés sur les échantillons, puis incubés en chambre humide, 15 min, à température ambiante. Les préparations sont ensuite rincées trois fois et incubées 10 min dans du tampon IF. L'anticorps secondaire anti-Ig de souris, couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine est dilué au 1/100^e dans du tampon IF contenant 1 % de bleu d'Evans (50 $\mu\text{l/lame}$). Après incubation en chambre humide (30 min, à l'obscurité) les préparations sont à nouveau lavées avant d'être montées dans du tampon glyciné et examinées au microscope à épifluorescence.

4.2. Immunoperoxydase indirecte

Les échantillons fixés à l'acétone sont plongés dans un bain de méthanol renfermant 1 % H_2O_2 pendant 20 min afin d'inhiber toute activité peroxydase endogène. Les préparations sont ensuite rincées à l'eau du robinet pendant 10 min et à l'eau distillée pendant 10 autres min. La solution d'anticorps primaire (50 μl de surnageant de culture ou d'anticorps purifiés à la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ dans du tampon IF) est alors déposée sur les lames et incubée pendant 30 min dans une chambre humide. Deux lavages de 2 min sont effectués dans du tampon IF avant de déposer la solution d'anticorps secondaire anti-Ig de souris, couplé à la peroxydase et dilué au 1/100^e dans du tampon IF. Après une incubation de 30 min, les échantillons sont à nouveau rincés deux fois dans du tampon IF et une fois dans du tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6. Le substrat (diaminobenzidine : 0,5 mg/ml de tampon précédent contenant 5 $\mu\text{l/ml}$ d' H_2O_2 30 %) est additionné pendant 2 fois 10 min à l'obscurité pour éviter son oxydation. Enfin, les préparations sont rincées dans le même tampon, contre-colorées à l'hématoxyline-éosine et montées dans de l'Eukitt.

4.3. Immunomarquage à l'or colloïdal

4.3.1. Préparation de la protéine A-or

La solution d'or colloïdal est préparée par réduction de l'ion Au^{3+} au moyen d'un mélange citrate-acide tannique (Slot and Gueuze, 1985), la taille des particules d'or étant inversement proportionnelle à la quantité d'acide tannique à 1 %.

Deux solutions sont préparées :

. *Solution A (chlorure d'or) :*

HAuCl ₄ 1 %	1 ml
H ₂ O	79 ml

. *Solution B (mélange réducteur) :*

citrate de tri-sodium à 1 %	4 ml
acide tannique à 1 %	1 ml
H ₂ O	15 ml

Les solutions A et B sont chauffées à 60°C avant d'ajouter B dans A sous agitation magnétique. A l'apparition d'une couleur rouge, le mélange est porté à ébullition pendant 1 min. La plus faible concentration de protéine A nécessaire pour stabiliser la solution d'or colloïdal est alors déterminée (Horisberger et Rosset, 1977). Le pH de la solution d'or est ajusté à 6,00 et le couplage avec la protéine A est réalisé sous agitation magnétique en ajoutant la concentration de stabilisation déterminée précédemment et 0,1 % d'une solution de BSA à 10 %. Le complexe protéine A-or colloïdal est ensuite purifié par centrifugation (pour des billes d'or d'une taille de 6 nm : 125.000 g, 45 min ; pour des particules de 9 nm : 50.000 g, 45 min). Le culot est remis en suspension dans un tampon PBS (1/25^e du volume initial) contenant 0,02 % d'azide de sodium. La suspension est conservée à 4°C pendant 6 mois.

4.3.2. Marquage en "pre-embedding"

. *Préparation des échantillons*

Les hémocytes sont prélevés (vol/vol) à l'aide d'une seringue contenant du paraformaldéhyde 4 % dans un tampon phosphate 1 M, pH 7,4 et fixés pendant 60 min à 4°C. Ils sont ensuite lavés trois fois dans du tampon phosphate PBS (NaCl : 8 g ; KCl : 0,2 g ; Na₂HPO₄, 2H₂O : 1,44 g ; NaH₂PO₄ : 0,23 g ; H₂O : 1000 ml) contenant de la

glycine 0,02 M afin de bloquer les groupements aldéhydes libres provenant de la fixation. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation (200 g, 10 min).

. Immunomarquage

Le culot cellulaire est alors resuspendu dans une solution d'anticorps monoclonaux à la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ dans un tampon PBS + 1 % de BSA qui empêche une fixation non spécifique. L'incubation dure une nuit à 4°C. Après quatre centrifugations et lavages dans du PBS contenant 0,1 % de BSA, la protéine A couplée à l'or colloïdal (taille des billes d'or : 9 nm) est diluée dans du PBS + 1 % BSA de manière à obtenir une densité optique de 0,15 à 520 nm. Cette solution est incubée avec les cellules pendant 45 min, à température ambiante. Quatre centrifugations suivies de lavages dans du PBS sont à nouveau effectuées.

. Microscopie électronique

Une post-fixation du culot d'hémocytes par l'acide osmique à 1 % en tampon cacodylate de sodium 0,1 M-NaCl 0,05 M est ensuite entreprise, suivie instantanément d'un lavage dans le tampon cacodylate de sodium-NaCl. Les cellules sont immobilisées dans une solution d'agarose à 1 % (Low Melting Point, Sigma). Après centrifugation (500 g, 10 min) et solidification de l'agarose, le culot cellulaire est déshydraté et imprégné dans l'Epon 812. Des coupes sont préparées et contrastées comme décrit dans le paragraphe 2.2.

4.3.3. Marquage en "post-embedding"

. Préparation des échantillons

Les hémocytes sont prélevés (vol/vol) dans la solution de fixateur (paraformaldéhyde 4 %, glutaraldéhyde 0,5 % dans un tampon PBS ajusté à 1000 mOsm) et incubés 1 h à 4°C. Les échantillons sont mis au culot (200 g, 10 min) et lavés trois fois dans un tampon PBS.

. Microscopie électronique

Les cellules sont alors immobilisées dans une solution d'agarose à 1 %, déshydratées par une série d'alcools (3 X 20 min dans l'éthanol 30 % ; 3 X 20 min dans l'éthanol 50 % ; 3 X 20 min dans l'éthanol 70 %) et imprégnées dans la résine LR-White (The London Resin Co LTD) à l'aide d'un automate à inclusion (Ultroprocesseur, LKB). La polymérisation de la résine requiert 24 à 48 h à la température de 50°C. Des coupes ultra-fines sont réalisées comme précédemment décrit et récupérées sur des grilles de nickel.

. Immunomarquage

Les grilles sont transférées, face portant les coupes vers le bas, à la surface de gouttes de réactifs déposées sur un ruban de parafilm. Dans un premier temps, les grilles sont incubées avec du PBS contenant de la glycine 0,02 M pendant 20 min. Elles sont ensuite lavées sous le flux d'une pissette renfermant du tampon PBS avant d'être déposées sur des gouttes de 25 µl de surnageant de culture (1 h, température ambiante). Un nouveau lavage précède l'incubation avec des anticorps anti-Ig de souris, couplés avec des billes d'or de 20 nm (dilués 1/50^e dans un tampon PBS) pendant 1 h. Les grilles sont lavées avec du tampon PBS puis de l'eau distillée et sont finalement séchées. Elles sont examinées sans avoir été contrastées avec un microscope électronique à transmission Philips 300.

4.4. Electrophorèse de protéines et détermination des poids moléculaires

4.4.1. Préparation des échantillons

Les hémocytes sont obtenus par centrifugation d'un prélèvement d'hémolymphe (350 g, 15 min), suivie de deux rinçages avec du PBS. Les cellules sont ensuite dissociées dans 100 µl de tampon de lyse (Annexe 2.1), maintenu sur de la glace. Un volume de 10 µl de suspension est recueilli pour quantifier les protéines totales.

4.4.2. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Lowry modifiée, à partir des 10 μl de la suspension réservée précédemment. Les solutions A et B (Annexe 2.1), ainsi qu'une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 1 mg/ml sont préparées. Une courbe étalon est alors réalisée selon le protocole décrit ci-après :

tube	0	1	2	3	4	5
eau distillée (μl)	400	190	180	150	100	0
BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0	10	20	50	100	200
solution A (ml)	2	1	1	1	1	1

Parallèlement, les échantillons à analyser sont préparés :

échantillon n°	1
eau distillée (μl)	190
extrait cellulaire (μl)	10
solution A (μl)	1

L'ensemble des tubes est incubé 10 min, à température ambiante. La solution B est alors additionnée à raison de 200 μl dans le tube témoin n°0 et 100 μl pour les autres tubes. Une nouvelle incubation de 30 min, à température ambiante précède la lecture de la densité optique de chaque tube à 750 nm, en cuve plastique. Une courbe étalon correspondant aux valeurs de DO obtenues en fonction de la concentration en BSA est ensuite réalisée et la concentration en protéines de l'échantillon en est déduite.

4.4.3. Techniques "classiques" d'électrophorèse et de transfert des protéines

Les lysats cellulaires sont dilués au demi dans du tampon de dépôt 2X (Annexe 2.1). La suspension est alors chauffée à 100°C au bain marie, pendant 10 min avant d'être rendue moins visqueuse par passage dans l'aiguille (23 G) d'une seringue. Une nouvelle centrifugation (7000 g, 10 min) permet de récupérer le surnageant protéique.

La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) en gradient 7,5-20 %.

Les solutions d'acrylamide/bis-acrylamide à 7,5 et 20 % (Annexe 2.1) sont utilisées pour réaliser un gel en gradient continu. Après polymérisation du gel pendant 1 h à température ambiante, il est surmonté d'un gel de tassement à 3 % (Annexe 2.1) qui polymérise en 30 min environ.

Les échantillons sont déposés à raison de 50, 20 et 10 μg de protéines totales/puits. Une concentration de 100 μg de protéines totales/puits est utilisée pour la détection ultérieure des protéines par Western blot. Des marqueurs de poids moléculaire sont utilisés selon les recommandations du fournisseur ("Electrophoresis calibration kit for molecular weight determination of high molecular weight proteins in SDS" and "Electrophoresis calibration kit for molecular weight determination of low molecular weight proteins", Pharmacia). Ils sont déposés en référence pour établir un étalonnage reliant la mobilité relative des protéines au logarithme de leur poids moléculaire. La migration se déroule dans une cuve à électrophorèse réfrigérée, pendant approximativement 6 h, à 30 mA/gel et une tension de 500 V.

La coloration à l'argent est réalisée après fixation du gel dans 400 ml d'une solution à 40 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique, pendant une nuit, sous agitation. Le gel est à nouveau fixé pendant 12 min, dans une solution fixante (Annexe 2.1), préchauffée à 50°C, avant d'être incubé deux fois 8 min, dans 200 ml d'une solution à 10 % d'éthanol et 5 % d'acide acétique à 50°C. Le gel est ensuite rincé dans deux bains de 400 ml d'eau distillée à 50°C, pendant 4 min. La coloration avec une solution de nitrate d'argent à 0,4 % (préparée extemporanément) s'effectue à 37°C pendant 13 min, sous agitation, suivie de deux rinçages de 30 sec à l'eau distillée (500 ml), à température ambiante. Puis, la révélation est réalisée dans 200 ml d'une solution de révélation (Annexe 2.1), à température ambiante : un bain de 30 sec, suivie d'un bain de 4 à 6 min. Le bruit de fond est réduit par deux bains de 4 min dans une solution "Background Reducer" (Annexe 2.1) avant de stopper la réaction dans une solution de glycérol à 10 %.

Le transfert semi-sec des protéines sur membrane est réalisé dans une unité de transfert électrophorétique (Multiphor II Novablot, LKB). Neuf feuilles de papier filtre, imbibées de tampon de transfert (Annexe 2.1) sont déposées sur la plaque de graphite inférieure (anode) en évitant de piéger des bulles d'air. Une membrane de nitrocellulose imbibée de tampon est ensuite déposée, puis le gel (sans la zone de tassement) et à nouveau 9 feuilles de papier filtre imbibées de tampon. L'ensemble est recouvert par la plaque de graphite supérieure (cathode). Le transfert s'effectue pendant 1 h, sous un ampérage de 0,8 mA/cm² de membrane.

4.4.4. Techniques d'électrophorèse et de transfert des protéines utilisant l'instrumentation "Phast System" (Pharmacia)

La séparation électrophorétique des protéines est effectuée sur gels SDS-PAGE et se déroule dans l'unité de séparation du Phast System. Les minigels, homogènes ou en gradient continu, ainsi que les mèches imbibées de tampon sont disponibles auprès du fournisseur. Les volumes d'échantillons, variant de 1 à 4 μl sont déposés à la surface du gel et l'électrophorèse horizontale est réalisée à 15°C selon les paramètres recommandés par le fabricant.

La coloration à l'argent des gels est effectuée dans l'unité de développement du Phast System qui contrôle la température et l'agitation. Les étapes et les temps de la coloration sont sensiblement les mêmes que ceux utilisés manuellement (cf paragraphe 4.4.3).

Le transfert semi-sec des protéines est réalisé à l'aide de l'unité Phast Transfer, selon les recommandations du fournisseur.

4.4.5. Western blot

Les membranes sont saturées par du tampon PBSm (Annexe 2.1) + 5 % de lait écrémé en poudre, pendant 1 h à température ambiante, sous agitation. L'anticorps primaire, dilué au 1/10^e dans le tampon PBSm + 5 % de lait écrémé, est incubé pendant 3 h à 25°C, sous agitation. Deux lavages de 10 min dans du tampon PFB (Annexe 2.1) + 5 % de lait écrémé + 0,05 % de Tween 20 précèdent l'incubation avec l'anticorps secondaire marqué à la phosphatase alcaline, dilué au 1/400^e dans le tampon PFB + 5 % de lait écrémé, pendant 1 h à température ambiante. Les membranes sont alors rincées, quatre fois 10 min, dans le tampon PFB + 0,05 % de Tween 20. Le substrat est préparé extemporanément en mélangeant 66 μl de la solution de NBT (Annexe 2.1) + 10 ml de tampon de l'enzyme (Annexe 2.1), puis 33 μl de la solution de BCIP (Annexe 2.1). La coloration est quasi-instantanée et la réaction est bloquée par un bain de PBSm additionné de 200 μl d'EDTA 0,5 M, pH 8.

4.4.6. Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation des protéines à l'aide des AcMs spécifiques est réalisée après incubation des anticorps avec des billes coupées à la protéine-A.

Les billes couplées à la protéine-A (Protein A Sépharose CL-4B, Pharmacia) sont rincées (10 min, 4°C, sous agitation) et centrifugées (3200 g, 5 min, 4°C), trois fois dans 1 ml de tampon TEN (Annexe 2.1). Un ml de surnageant de culture des hybridomes et 1 ml de tampon TEN sont ajoutés au culot de billes (volume initial : 20 μ l de billes) et incubés 1 h 30, à 4°C, sous agitation. Trois lavages de 10 min, identiques à ceux décrits précédemment, sont effectués. Les billes sont ensuite suspendues dans 2 ml de tampon TEN + PMSF 200 mM, contenant un volume de lysat cellulaire correspondant à 100 μ g de protéines totales. L'incubation pendant 1 h 30, à 4°C, sous agitation est suivie de trois nouveaux lavages. Des témoins consistent uniquement en des anticorps monoclonaux, couplés aux billes.

Les billes sont alors suspendues dans du tampon de lyse 1X (Annexe 2.1) et chauffées à 100°C, pendant 3 min. Une nouvelle centrifugation (7500 g, 5 min) permet la récupération du surnageant contenant les protéines dénaturées. Une électrophorèse SDS-PAGE précédant une coloration des protéines à l'argent sont effectuées à l'aide de l'unité de séparation et de développement PhastSystem (Pharmacia), selon les recommandations du fournisseur (cf paragraphe 4.4.4).

4.5. Immunodosage enzymatique

4.5.1. Marquage à la phosphatase alcaline

Le protocole de marquage nécessite de la glutaraldéhyde à 25 % en solution aqueuse (Sigma) et de la phosphatase alcaline à 10 mg/ml (Boehringer) en solution dans un tampon X (NaCl 3 M, MgCl₂ 1mM, ZnCl₂ 0,1 mM, triéthanolamine 30 mM, pH 7,6). Il consiste à mélanger dans un premier temps :

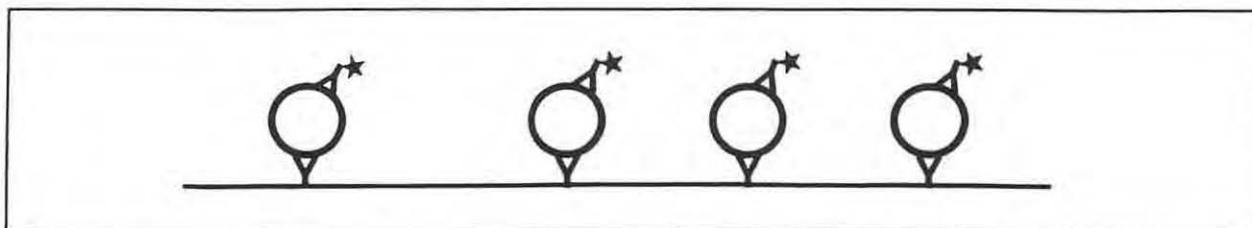
- glutaraldéhyde	5 μ l
- phosphatase alcaline (1,5 mg)	175 μ l
- tampon KH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7,2	600 μ l

Cette solution est mélangée à l'aide d'un vortex puis est incubée 50 min à 25°C en vortexant toutes les 10 min. Au bout de ce laps de temps, sont ajoutés 200 μ l de la solution d'IgG (0,75 mg dans le tampon X) et l'ensemble est à nouveau vortexé toutes les 10 min, pendant l'incubation qui dure 75 min à 25°C.

L'action du glutaraldéhyde est bloquée par l'addition de 20 μ l de glycine (1 mM en concentration finale) pendant 20 min, à 25°C. Enfin, 1 ml de glycérol (50 % en concentration finale) est ajouté pour permettre une meilleure conservation du conjugué à 4°C ou à -20°C.

4.5.2. Immunodosage enzymatique direct de type sandwich

Le protocole est extrapolé de celui mis au point et utilisé lors du clonage de certains AcMs (Fig. 4). Les modifications résident essentiellement dans le type d'immunodosage utilisé. La méthode utilisée à présent est dite "directe" de type sandwich. Elle permet la capture spécifique de l'antigène à l'aide d'un anticorps adsorbé sur une plaque, puis sa détection grâce à un anticorps couplé à une enzyme.



Principe de l'immunodosage direct de type sandwich

(un anticorps de capture, adsorbé à la surface d'un puits de microplaque, retient spécifiquement l'antigène qui est révélé par un anticorps de détection couplé à une enzyme)

Des changements ont été également apportés concernant les tampons de lavage et les tampons de dilution des anticorps et des conjugués (Annexe 2.2).

5. RECHERCHE D'ACTIVITES ENZYMATIQUES

La recherche d'activités enzymatiques est réalisée à l'aide du système API ZYM (Api System) qui consiste en une galerie de 20 microcuvettes comportant une trame fibreuse inerte où sont répartis les substrats qui permettent la détection qualitative et semi-quantitative de 19 activités enzymatiques, à partir de très faibles quantités d'échantillons.

L'hémolymphe est prélevée (1 vol/3 vol) dans une solution d'Alsever et le nombre d'hémocytes est évalué à l'aide d'une cellule de Malassez. Les cellules sont centrifugées (200 g, 10 min), remises en suspension dans 1,3 ml d'eau distillée et traitées aux ultrasons (Labsonic, 100 W, 60 sec). Chaque cupule d'une galerie est remplie avec 65 μ l de cette suspension dont la concentration est de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml. Après une incubation de 4 h à 37°C, les activités enzymatiques sont révélées à l'aide des réactifs fournis. L'intensité des réactions colorimétriques en relation avec la quantité d'enzymes présentes est estimée visuellement à l'aide de l'échelle de lecture fournie dans le kit.

6. EVALUATION DE LA PHAGOCYTOSE

6.1. Chimiluminescence

6.1.1. Préparation des hémocytes

. Population totale d'hémocytes

L'hémolymph est ponctionnée et diluée (1 vol/4 vol) dans la solution anti-agrégante d'Alsever de manière à empêcher une activation des hémocytes lors des contacts entre cellules ou avec la paroi de la seringue (Bachère *et al.*, 1991). Sauf indication contraire, les prélèvements issus de plusieurs moules sont rassemblés. Les hémocytes sont alors dénombrés à l'aide d'une cellule de Malassez.

. Hémocytes séparés

La séparation de sous-populations hémocytaires est obtenue par centrifugation isopycnique, selon un protocole extrapolé de Bachère *et al.* (1988). Différentes concentrations de Percoll, dilué dans l'Alsever : 10, 20, 30, 40 et 50 % (vol/vol) sont préparées. Un gradient de densité discontinu de Percoll est réalisé au moyen d'une pompe péristaltique, en utilisant 2 ml de chaque concentration. Une suspension cellulaire (5 ml) prélevée comme précédemment décrit, est déposée à la surface du gradient et l'ensemble est soumis à une centrifugation (500 g, 30 min, 4°C). Les cellules sédimentées à chaque interface sont recueillies séparément à la seringue. Les différentes fractions sont alors diluées 8 fois dans l'Alsever et à nouveau centrifugées (500 g, 10 min) pour éliminer le Percoll. Le culot est resuspendu dans l'Alsever et le nombre d'hémocytes est évalué.

6.1.2. Préparation des réactifs

Le zymosan est préparé de la façon suivante : 40 mg de parois de levures (Zymosan A, Sigma) sont suspendues dans de l'eau de mer stérile et chauffées à 100°C pendant 30 min. Cette suspension est rincée deux fois, centrifugée (800 g, 15 min) et resuspendue dans de l'eau de mer stérile. Des aliquots à la concentration de 640.10^6 cellules/ml sont préparés et stockés à -20°C.

Le PMA (phorbol myristate acétate, Sigma) est dissout dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde) à la concentration de 1 mg/ml et stocké à - 20°C.

Le luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione, Sigma) est préparé dans du DMSO à la concentration de 0,1 M et conservé à l'obscurité.

6.1.3. Protocole général de mesure de la chimioluminescence (LDCL)

L'émission de lumière est mesurée au moyen d'un compteur à scintillation liquide, utilisé selon le mode "out of coincidence" (Tri-Carb 2200CA, Packard). Des comptages de 30 sec à intervalles réguliers sont réalisés sur chaque échantillon pendant en moyenne 3 h. L'activité des hémocytes est exprimée en cpm (coups par minute).

Les hémocytes en suspension dans l'Alsever sont répartis à la concentration choisie dans des microtubes et soumis à centrifugation (50 g, 5 min). Le culot de cellules dans un volume de 50 μ l d'Alsever est laissé au fond du tube de manière à obtenir une concentration finale d'Alsever inférieure à 2,5 % de manière à diluer la concentration en EDTA et permettre le passage des hémocytes quiescents à un stade stimulé (Bachère *et al.*, 1991). Les hémocytes sont ensuite remis en suspension dans de l'eau de mer fraîchement filtrée (0,45 μ m) pour obtenir un volume final de 2 ml. La solution stock de luminol (0,1 M) est diluée extemporanément dans de l'eau de mer filtrée et 200 μ l sont ajoutés à la suspension cellulaire (concentration finale de 10^{-4} M). L'activité de base des hémocytes est enregistrée pendant deux séries de mesures puis les stimulants de l'activité de LDCL sont additionnés. Généralement, un échantillon témoin non stimulé est analysé en parallèle. Après mesure de la LDCL, les cellules sont préparées par cyto-centrifugation pour visualiser l'internalisation des particules.

6.1.4. Tests d'inhibiteurs de la LDCL

Les effets d'inhibiteurs de la LDCL sont analysés selon le protocole général décrit plus haut avec $2 \cdot 10^5$ hémocytes par fiole et 80 particules de zymosan par hémocyte. Les essais sont effectués en duplicats, les inhibiteurs étant introduits quand les signaux de LDCL atteignent le pic d'activité.

Les effets inhibiteurs de l'azide de sodium (NaN_3 , Sigma) et de la superoxyde dismutase (SOD, Sigma) sont testés aux concentrations finales respectives de 32 et 65 μ g/ml (NaN_3) et 10 et 80 μ g/ml (SOD).

Des solutions concentrées de cinq inhibiteurs de la NADPH oxydase sont préparées :

<i>acide protocatéchuique</i>	8 mg/ml
<i>acide cafféique</i>	8 mg/ml
<i>apocynine</i>	8 mg/ml
<i>acide vanillique</i>	40 mg/ml
<i>acide ferulique</i>	40 mg/ml

1 μ l de chaque solution est ajouté à la suspension hémocytaire au moment du pic d'activité.

6.1.5. Mesures de LDCL des hémocytes après incubation avec des anticorps spécifiques

Une suspension d'hémocytes est incubée pendant 30 min avec des surnageants de culture contenant les anticorps spécifiques dilués au 1/10^e dans de l'eau de mer filtrée stérile (1 ml). Les hémocytes sont ensuite centrifugés (50 g, 10 min) et les culots cellulaires repris dans de l'eau de mer filtrée. La chimioluminescence est alors mesurée selon le protocole général.

6.1.6. Mesures de LDCL d'hémocytes normaux "stimulés" par des hémocytes néoplasiques

La mesure de LDCL d'échantillons de $2 \cdot 10^5$ hémocytes normaux provenant, soit d'un seul individu, soit regroupés à partir de plusieurs individus, est effectuée comme précédemment décrit dans le protocole général. Dans ce cas, les stimuli utilisés sont des hémocytes néoplasiques provenant de moules fortement malades (nombre d'hémocytes néoplasiques > 95 %). Après mesure de l'activité de base de chaque échantillon pendant deux cycles de comptage, les hémocytes néoplasiques à différentes concentrations ($2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^4$ ou $1 \cdot 10^5$ cellules/fiole) sont ajoutés. Un échantillon témoin consiste en des hémocytes normaux stimulés par du zymosan (80 particules/cellule). Le comptage est enregistré pendant environ 6 h.

6.2. Primocultures d'hémocytes en suspension

Les hémolymphes d'une dizaine de moules normales *M. edulis* ou de moules normales *M. trossulus* sont prélevées dans l'Alsever (1 vol/4 vol). Seules, les hémolymphes

provenant de moules *M. edulis* sont rassemblées. La concentration cellulaire est ensuite dénombrée au moyen d'une cellule de Malassez et un million d'hémocytes normaux de *M. edulis* ou *M. trossulus* sont alors distribués dans chaque microtube stérile et centrifugés (50 g, 5 min). Parallèlement, 100.000 hémocytes néoplasiques (nombre d'hémocytes néoplasiques > 95 %) ou normaux de *M. trossulus* sont également répartis dans des microtubes stériles et soumis à centrifugation. Ceux-ci sont alors repris dans 1 ml d'eau de mer additionnée d'antibiotiques (150 µg/ml Pénicilline G, 150 µg/ml Bacitracine et 50 µg/ml Vancomycine) et stérilisée par filtration (0,22 µm). Ces suspensions cellulaires sont ensuite ajoutées aux hémocytes normaux de *M. edulis* ou de *M. trossulus* et incubées à 18°C pendant 24 h. Des aliquots de 100 µl de chaque suspension cellulaire sont prélevés à divers intervalles de temps : t₁, t₂, t₃, t₆, t₁₄, t₂₄ h de culture et cytocentrifugés (100 g, 5 min) avant d'être fixés au méthanol et colorés à l'aide du kit Hémacolor (Merck). Un tube témoin est constitué par la mise en présence de particules de levures et d'hémocytes normaux de *M. edulis* (5 zymosan/1 cellule). Un tube renfermant des hémocytes normaux de *M. edulis* sans stimulant est également préparé.

7. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

7.1. Extraction d'ADN

7.1.1. Extraction d'ADN de moule entière

L'ADN génomique de moule a été préparé selon le protocole de Jeanpierre (1987). Les tissus de moule sont dissociés au moyen d'un homogénéisateur de tissus de type Potter dans 16 ml de tampon d'extraction I (Annexe 2.3). Le broyat est incubé pendant 2 h à 60°C et 4 fois 50 µl de protéinase K à 10 mg/ml sont additionnés, toutes les 30 min. Les acides nucléiques sont alors précipités par l'éthanol absolu (1 vol échantillon/2 vol éthanol), rincés par l'éthanol 70 %, centrifugés (7000 g, 10 min) et repris dans du tampon TE (Annexe 2.3). Une nouvelle incubation (3 h à 42°C) est réalisée dans 15 ml d'une solution de Sarkosyl à 10 %, à laquelle sont rajoutés 50 µl de protéinase K à 10 mg/ml toutes les heures.

Trois extractions au phénol/chloroforme-alcool isoamylique (1 vol échantillon/1 vol phénol/1 vol chloroforme 98 %-alcool isoamylique 2 %) suivies d'une extraction au chloroforme-alcool isoamylique (1 vol échantillon/1 vol chloroforme) sont effectuées. Les acides nucléiques sont à nouveau précipités à l'éthanol 100 %, rincés à l'éthanol 70 % et remis en suspension dans 490 µl d'eau. 10 µl d'une solution de ribonucléases à 10 mg/ml

(ARNases sans ADNases, Boehringer) sont alors additionnés, pendant 3 h à 37°C, de manière à éliminer les ARN présents dans la solution.

Une nouvelle extraction au phénol/chloroforme-alcool isoamylique, suivie d'une précipitation à l'éthanol 100 % puis d'un rinçage à l'éthanol 70 % permet la récupération des ADN dans du tampon TE. La concentration en ADN de l'échantillon est déterminée par la mesure de la densité optique (DO) à 260 nm, sur la base d'une unité de DO équivalant à 50 µg d'ADN/ml. La pureté de l'échantillon est contrôlée par estimation du rapport des densités optiques mesurées à 260 et 280 nm.

7.1.2. Extraction d'ADN d'hémocytes

Le protocole est extrapolé de la technique d'extraction d'ADN à partir de cellules de mammifères (Sambrook *et al.*, 1989). Des hémocytes (50 millions) sont centrifugés (120 g, 10 min, 4°C) et incubés 1 h à 37°C dans 10 ml de tampon d'extraction II (Annexe 2.3). Puis, une solution de protéinase K à 20 mg/ml est ajoutée à raison de 12,5 µl, 4 fois toutes les 30 min, l'incubation durant au total 2 h à 60°C. Deux extractions au phénol/chloroforme-alcool isoamylique (1 vol échantillon/1 vol phénol/1 vol chloroforme 98 %- alcool isoamylique 2 %) sont suivies de centrifugations (1800 g, 10 min, 4°C) et d'une extraction au chloroforme-alcool isoamylique (vol/vol).

L'ADN est alors précipité par de l'éthanol absolu (1 vol échantillon/1 vol éthanol), additionné d'acétate de sodium à 0,25 M en concentration finale, pendant 1 h à -80°C. L'ADN est récupéré par centrifugation (3000 g, 10 min), rincé à l'éthanol 70 %, puis séché. Le culot d'ADN est repris dans du tampon TE et sa concentration est déterminée par mesure de la densité optique de la solution, comme précédemment décrit.

7.2. Extraction d'ARN

7.2.1. Obtention d'embryons de moules

L'émission des gamètes est stimulée par injection de 200 µl de KCl 0,5 M dans le muscle adducteur postérieur des moules (Cadoret, 1992), maintenues indépendamment les unes des autres. Les ovocytes et les spermatozoïdes sont ensuite mis en présence pendant 30 min, sous agitation, la fécondation se déroulant dans de l'eau de mer à 18°C. Les débris cellulaires sont grossièrement éliminés par filtration (100 µm) et les spermatozoïdes sont ensuite séparés des embryons par passage au travers d'un filtre de 45 µm. L'incubation des embryons, sous agitation, est poursuivie dans l'eau de mer à

16°C pendant une nuit. Les embryons au stade *morula* sont alors regroupés par centrifugation (200 g, 5 min).

7.2.2. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux a été pratiquée à partir d'hémocytes néoplasiques d'une part, et à partir d'embryons au stade *morula* d'autre part. Elle a été effectuée d'après les recommandations du kit "Superscript preamplification system" (BRL) et selon la technique décrite ci-dessous.

Les cellules mises au culot sont lavées avec 1 ml de PBS stérile, ajusté à 1000 mOsm, vortexées doucement pendant 15 à 20 sec et centrifugées (5000 g, 1 min, température ambiante). Les cellules sont alors dissociées par addition de 200 μ l d'une solution d'isothiocyanate de guanidium et de β -mercaptoéthanol (Annexe 2.3), 5 μ g d'ARNt de levure sont également ajoutés en tant que "carrier" (volume final 240 μ l). La dissociation est prolongée par passage de la solution dans l'aiguille fine (23 G) d'une seringue, jusqu'à ce qu'elle devienne visqueuse.

L'ARN est ensuite extrait par addition de 240 μ l de phénol saturé en eau, 48 μ l de chloroforme/alcool isoamylique (49 vol/1 vol) et 24 μ l d'acétate de sodium 2 M, pH 4. L'ensemble est vortexé rapidement avant d'être déposé sur de la glace pendant 15 min. Après centrifugation (6500 g, 30 min, 4°C), la phase aqueuse est transférée dans un microtube et l'ARN est précipité par 2 volumes d'éthanol absolu à -20°C pendant 1 h puis centrifugé (6500 g, 30 min, 4°C).

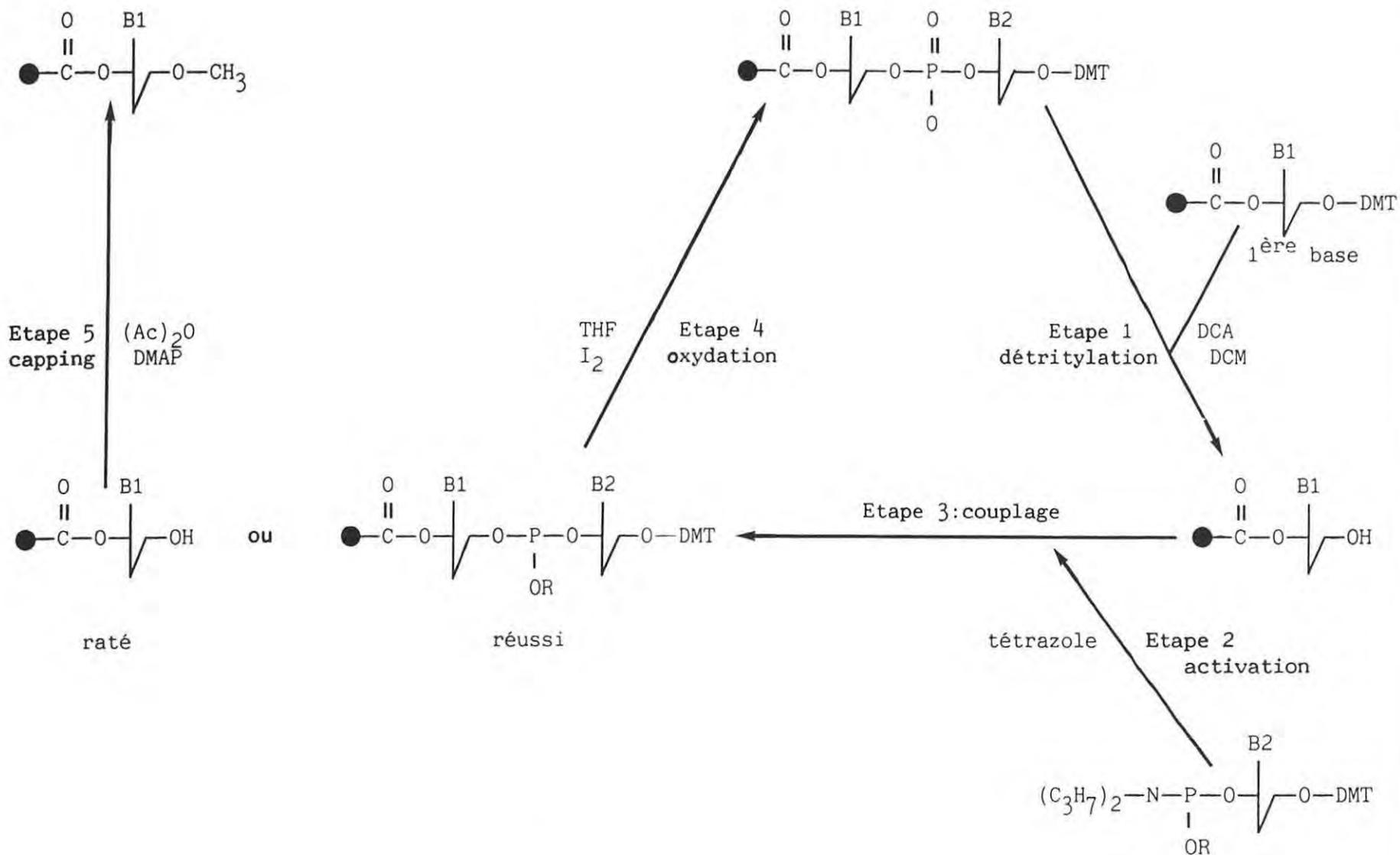
Le culot est alors dissous dans 100 μ l de solution d'isothiocyanate de guanidium (Annexe 2.3), précipité comme précédemment et repris dans 75 μ l d'eau distillée traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC). Il est à nouveau précipité et réhydraté par lavage à l'éthanol 70 %, puis centrifugé (6500 g, 30 min) et séché à l'air. Le culot d'ARN est remis en suspension dans 13 μ l d'eau traitée au DEPC et conservé une nuit à -20°C.

7.3. Transcription réverse

Le protocole de transcription réverse est celui fourni avec le kit "Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis" (BRL).

A partir des 13 μ l d'ARN totaux obtenus ci-dessus, seuls les ARNm vont être transcrits en ADNc grâce à 1 μ l d'amorces oligo dT. L'appariement de ces amorces sur la matrice polyA des ARNm s'effectue à 70°C pendant 10 min. L'ensemble est ensuite refroidi rapidement sur de la glace avant d'ajouter 1 μ l de transcriptase réverse

Fig. 5 : Cycle de synthèse des oligonucléotides par la méthode des phosphoramidites
 (● : CPG; billes de verre à pores contrôlés; B : base; DMT: diméthoxytrityl; DCA: acide dichloroacétique; DCM: dichlorométhane; THF: tétrahydrofurane; (Ac)₂O: anhydride acétique)



"Superscript" (200 U), 2 μ l de tampon 10X de synthèse, 1 μ l d'un mélange de dNTP 10 mM et 2 μ l de dithiothréitol (DTT) 0,1 M. Les solutions sont incubées 10 min à température ambiante, puis 50 min à 42°C. L'ARNm est désapparié du brin d'ADNc par chauffage à 90°C pendant 5 min et incubation sur de la glace pendant 10 min. Il est alors détruit par addition de 1 μ l d'ARNase H, 20 min, 37°C.

7.4. Synthèse et purification des oligonucléotides

7.4.1. Synthèse des oligonucléotides

Le procédé de synthèse chimique choisi utilise la méthode des β -cyanoéthyl phosphoramidites selon un procédé cyclique (Fig. 5). La première base à l'extrémité 3' est déjà fixée sur un support solide CPG ("controlled pore glass"). Ce nucléotide est protégé en 5' par un groupement DMT (diméthoxytrityl).

La première étape du cycle, *l'étape de détrytilation*, consiste à enlever ce groupement protecteur par un traitement à l'acide dichloracétique de manière à régénérer le groupement hydroxyl en 5'.

Lors de *l'étape d'activation*, la deuxième base phosphoramidite va être activée par du tétrazole.

L'étape de couplage va permettre à cette base activée de réagir avec le groupement 5'OH régénéré et d'allonger la chaîne oligonucléotidique en formation.

Pendant *l'étape d'oxydation*, la nouvelle liaison internucléotidique est oxydée avec une solution d'iode pour donner une liaison stable pentavalente.

Enfin, lors de *l'étape de "capping"*, le groupement 5'OH des chaînes qui n'ont pas réagi avec le nucléoside phosphoramidite est acétylé avec de l'anhydride acétique et du N-méthyl imidazole. Il ne sera donc plus fonctionnel à la prochaine étape d'oxydation. Cette étape empêche la formation d'une population hétérogène de sous-produits n-1 et facilite la purification du produit final.

Ces cinq étapes sont répétées successivement jusqu'à l'addition du dernier nucléotide en 5'. En fin de synthèse, l'oligonucléotide reste attaché de façon covalente à son support.

L'injection d'ammoniaque (NH₄OH à 33 %) dans la colonne de synthèse permet la récupération dans un microtube des oligonucléotides qui sont incubés dans cette solution à température ambiante pendant 24 h. Ce traitement libère les oligonucléotides de leurs

Volume	Réactif
6 μ l	A.D.N. (1 μ g)
1 μ l	amorce 3' (250 ng pour un oligonucléotide de 20 mers)
1 μ l	amorce 5' (250 ng pour un oligonucléotide de 20 mers)
x μ l	MgCl ₂ (de 2,5 à 5,5 mM en concentration finale)
5 μ l	tampon de réaction 10X (Annexe)
q.s.p. 50 μ l	eau distillée stérile
1^{ère} et 2^{ème} étape du 1^{er} cycle de P.C.R. <i>dénaturation: 92°C, 2 min; hybridation x °C, 2 min</i>	
1 μ l	dNTP (soit 100 mM de chaque désoxynucléotide)
0,5 μ l	enzyme Taq polymérase (Cétus) (soit 2,5 unités)
75 μ l	huile de paraffine
3^{ème} étape du 1^{er} cycle de P.C.R. <i>polymérisation: 72°C, 3 min</i>	
2^{ème} au 30^{ème} cycle de P.C.R.: <i>dénaturation: 92°C, 2 min;</i> <i>hybridation: x °C, 2 min, polymérisation: 72°C, 3 min</i>	
<i>élongation des brins inachevés: 72°C, 5 min</i>	

Fig. 6 : Constitution du mélange réactionnel de chaque tube de P.C.R. et déroulement des différents cycles d'amplification

supports CPG et enlève les derniers groupements protecteurs. L'ADN est alors biologiquement actif.

7.4.2. Purification des oligonucléotides

Les oligonucléotides sont purifiés sur colonne Oligo-Pack (Millipore). L'équilibrage de la colonne est réalisée par injection d'acétonitrile (3 fois 5 ml), puis du même volume d'acétate de triéthylammonium (TEAA) 1 M, pH 7. La suspension d'oligonucléotides est alors injectée doucement dans la colonne et l'éluat récupéré est à nouveau introduit. Celui-ci est ainsi réinjecté trois fois de manière à obtenir une fixation maximale des oligonucléotides couplés au DMT. Afin d'éliminer les séquences trop courtes et les groupements protecteurs, trois lavages sont effectués avec 5 ml d'hydroxyde d'ammonium à 3 %. Après un rinçage à l'eau bidistillée (3 fois 5 ml), un lavage avec 5 ml d'acide trifluoroacétique 2 % (TFA) permet de détrituler la liaison de l'oligomère avec son support. L'excès de TFA est éliminé par lavage à l'eau bidistillée (2 fois 5 ml). Enfin, le produit détritulé est élué avec de l'acétonitrile à 20 % (3 fois 5 ml), lyophilisé et repris dans 200 μ l de tampon TE.

7.5. Amplification de séquences par PCR ("Polymerase Chain Reaction")

La technique de PCR repose sur la disponibilité d'une enzyme thermorésistante, la Taq polymérase qui supporte des températures de 95°C sans dommage. Elle permet donc la succession de n cycles qui vont aboutir à l'amplification (2^n) d'un fragment d'ADN situé entre deux amorces oligonucléotidiques, orientées en sens opposé. Chaque cycle d'amplification comprend trois étapes :

- 1^{ère} étape : dénaturation de l'ADN 92°C, 2 min
- 2^{ème} étape : hybridation des amorces x °C, 2 min
- 3^{ème} étape : polymérisation du fragment d'ADN 72°C, 3 min

La température d'hybridation des amorces dépend à la fois de la longueur du fragment à polymériser et de sa composition en bases G + C.

Les différents essais ont été réalisés selon le protocole classique de Larzul (1989), résumé dans la figure 6. Les échantillons sont ensuite refroidis à température ambiante et l'huile de paraffine est enlevée par dissolution dans de l'étheroxyde. 10 μ l de chaque échantillon sont alors soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %.

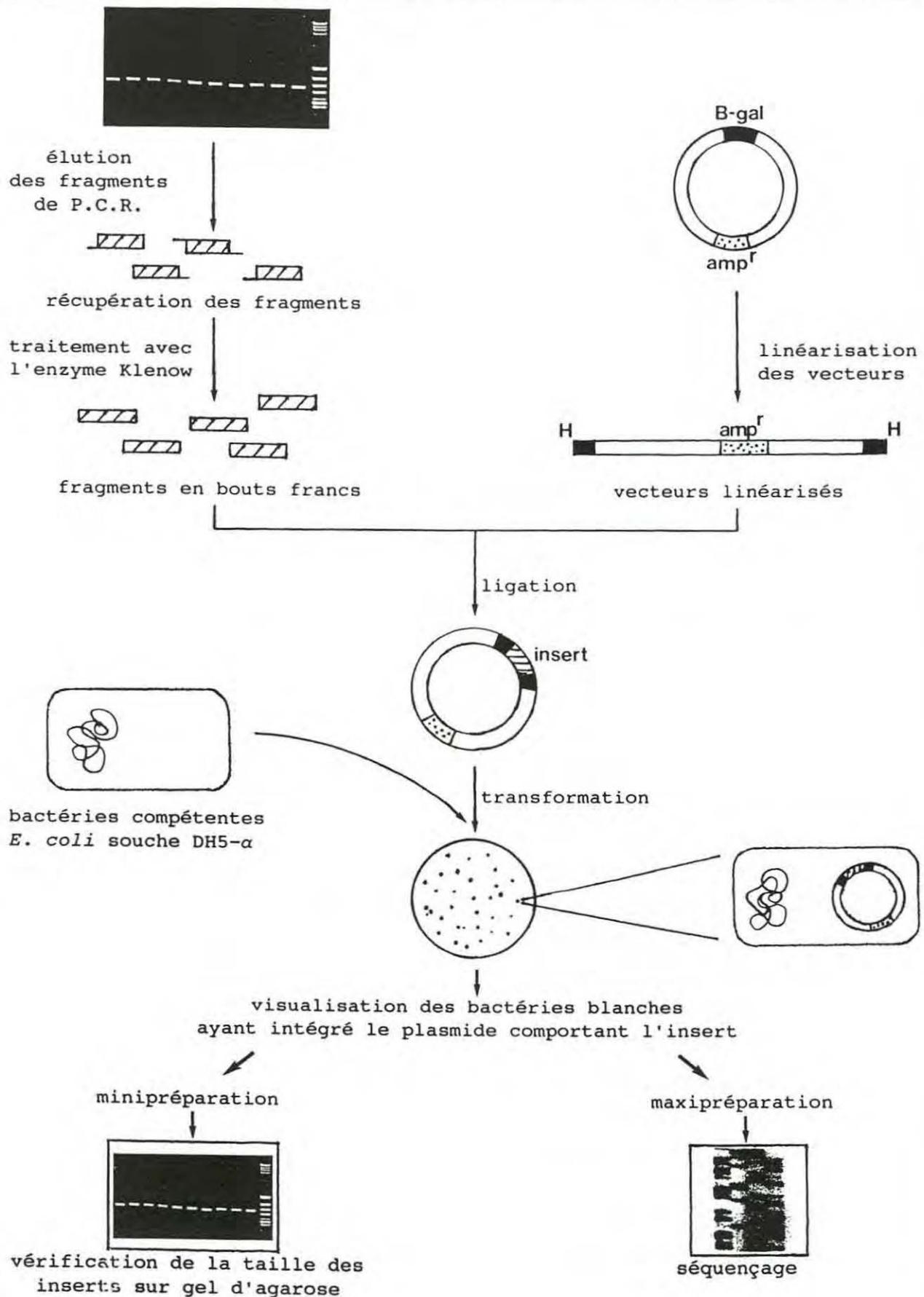


Fig. 7 : Protocole de clonage des fragments amplifiés par P.C.R.
 (H: enzyme Hind II, B-gal: gène codant pour l'enzyme β -galactosidase,
 amp^R: gène codant pour la résistance à l'ampicilline)

Les marqueurs de poids moléculaires ("DNA ladder 1kb", Boehringer) sont utilisés en référence.

7.6. Purification de fragments d'ADN à partir de gels d'agarose

7.6.1. Elution sur filtres Ultrafree-MC (Millipore)

Après électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation des bandes d'ADN par coloration au bromure d'éthidium, les morceaux de gel sont découpés et congelés à -20°C pendant 1 h avant d'être réchauffés rapidement à 37°C pendant 5 min. Après macération, l'agarose est transférée sur le filtre d'une unité Ultrafree-MC (Millipore) et centrifugée à 5000 g, 20 min. Une deuxième élution de l'ADN est effectuée en resuspendant l'agarose dans 200 μl de tampon TE, pH 8 à température ambiante. Une nouvelle centrifugation à 5000 g pendant 20 min permet de récupérer l'ADN dans le filtrat.

7.6.2. Purification à l'aide du kit "Gene Clean"

L'utilisation de ce kit (Ozyme) est limitée à la purification de fragments de taille supérieure à 200 paires de bases (pb). Les morceaux de gels d'agarose sont dissous dans 2 fois leur volume de NaI par chauffage à 50°C , 5 min. L'ADN est ensuite couplé à des billes de silice (1 μl de billes pour 100 μl de NaI), pendant 10 min sur de la glace. Une centrifugation (6500 g, 10 sec) précède trois lavages avec 5 ml de solution "Newwash" (fournie avec le kit) et trois centrifugations (6500 g, 30 sec). L'ADN couplé aux billes est repris dans 20 μl de tampon TE avant d'être incubé à 50°C pendant 5 min pour le décrocher. Une centrifugation (6500 g, 1 min) assure la mise au culot des billes et le surnageant contenant l'ADN est prélevé. La présence et la pureté des fragments peuvent être contrôlées sur gel d'agarose.

7.7. Clonage de fragments d'ADN

Le protocole de clonage des fragments d'ADN est résumé dans la figure 7.

7.7.1. Préparation de bactéries compétentes

La souche bactérienne utilisée est *Escherichia coli* DH5-alpha et le protocole est extrait de Hanahan (1983). Les bactéries sont cultivées dans 100 ml de milieu SOB liquide (Annexe 2.4) à 37°C, sous agitation. Les cellules sont alors incubées 15 min sur de la glace et centrifugées (1300 g, 15 min, 4°C). Le culot est remis en suspension (1 vol/3 vol initial) dans une solution RF1 (Annexe 2.3) en vortexant légèrement. Après incubation (15 min sur de la glace) et centrifugation (1300 g, 15 min, 4°C), le culot est resuspendu (1 vol/12,5 vol initial) dans une solution RF2 (Annexe 2.3) et incubé sur de la glace pendant 15 min. Les bactéries compétentes sont alors réparties en aliquots de 250 µl. Elles peuvent être utilisées immédiatement ou conservées à - 80°C. Elles seront alors décongelées lentement sur de la glace avant d'être utilisées pour une transformation.

7.7.2. Préparation des vecteurs

Les vecteurs utilisés sont des phagemides pBluescript II (Stratagène). Les vecteurs sont coupés par Hind II, une enzyme de restriction créant des extrémités franches. Pour ce faire, le vecteur est incubé (2 h, 37°C) dans le mélange réactionnel suivant :

vecteur (0,55 µg/µl)	10 µl
enzyme (4 unités/µl)	1,5 µl
tampon 10X	2 µl
eau distillée	6,5 µl

La suspension est ensuite soumise à deux extractions au phénol/chloroforme-alcool isoamylique (1 vol échantillon/1 vol phénol/1 vol chloroforme), centrifugée (3500 g, 4 min) et extraite à nouveau au chloroforme-alcool isoamylique (1 vol échantillon/1 vol chloroforme). Après une centrifugation (3500 g, 4 min), 10 µl de glycoène "carrier" sont ajoutés et l'ensemble est précipité à l'éthanol absolu pendant une nuit à -20°C. L'ADN du vecteur est mis au culot (3500 g, 5 min), lavé à l'éthanol 70 % et séché avant d'être remis en suspension dans 50 µl de TE.

7.7.3. Traitement des fragments d'ADN avec le fragment Klenow de la polymérase 1

Le fragment Klenow de la polymérase 1 va permettre d'ajouter les nucléotides éventuellement manquants de chaque côté des fragments d'ADN synthétisés par la Taq polymérase et reconstituer ainsi des bouts francs.

Les fragments d'ADN purifiés à partir des gels d'agarose qui sont en suspension dans environ 400 μl de TE sont extraits comme décrit dans le paragraphe précédent. Le culot est ensuite repris dans 7,5 μl d'eau distillée. L'incubation avec l'enzyme dure 30 min à température ambiante, dans les conditions suivantes :

enzyme (5 unités/ μl)	1 μl
tampon 10X	1 μl
dNTP 1 mM	0,5 μl
fragments de PCR	7,5 μl

Le mélange réactionnel (10 μl + 20 μl d'eau distillée) est ensuite microdialysé sur membrane série "V" 0,05 μm (Millipore) contre de l'eau distillée.

7.7.4. Ligature

La ligature est effectuée pendant 1 h à température ambiante sur la moitié des fragments dialysés, selon le protocole décrit ci-dessous :

fragments dialysés	16 μl
plasmides coupés par Hind II	0,25 μl
T ₄ ADN ligase (2 unités/ μl)	1 μl
tampon 5X	5 μl
rATP 10 mM	2,5 μl
eau distillée	0,25 μl

7.7.5. Transformation de bactéries compétentes

Les bactéries compétentes (250 μl) sont mises en présence des vecteurs contenant les inserts (12,5 μl) et incubées 30 min sur de la glace (Hanahan, 1983). Un choc thermique (1 min 30 à 42°C) suivi d'une incubation de 5 min à 0°C est alors réalisé pour permettre l'entrée des plasmides à l'intérieur des bactéries. Celles-ci sont ensuite incubées à 37°C, 1 h, sous agitation dans 250 μl de milieu SOC (Annexe 2.4) et environ 50 μl de cette suspension sont étalés à la surface de boîtes de pétri renfermant du milieu SOB/ampicilline/IPTG/X-Gal (Annexe 2.4). Après une incubation à 37°C pendant une nuit, les colonies blanches qui renferment les plasmides contenant les inserts sont repiquées sur une nouvelle gélose.

7.8. Minipréparation d'ADN plasmidique

Le protocole choisi consiste en une lyse des bactéries par chauffage (Sambrook *et al.*, 1989).

La veille, un tube de 2 ml de milieu SOB/ampicilline (Annexe 2.4.) estensemencé avec des colonies bactériennes, incubées une nuit, à 37°C, sous agitation. La suspension bactérienne est récupérée dans un microtube et centrifugée (6500 g, 30 sec). Le milieu de culture est enlevé par aspiration et est remplacé par 350 μ l de milieu STET (Annexe 2.3) et 25 μ l d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml dans du tampon Tris-HCL 10 mM, pH 8. L'ensemble est vortexé 3 sec puis placé 40 sec exactement dans un bain d'eau bouillante. Le lysat est alors centrifugé (6500 g, 10 min) et le culot prélevé. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est précipité avec 420 μ l d'isopropanol et 40 μ l d'acétate de sodium 2,5 M, pH 5,2. La suspension est vortexée et incubée 5 min à température ambiante. L'ADN précipité est ensuite mis au culot (6500 g, 5 min), rincé avec 1 ml d'éthanol 70 %, centrifugé (6500 g, 5 min) et séché. Il est finalement repris dans 50 μ l de TE contenant 20 μ g/ml de ARNase pancréatique et stocké à -20°C.

La présence d'un insert est contrôlée par coupure de l'ADN plasmidique pendant 1 h à 37°C, avec l'enzyme Hind II, suivant le protocole suivant :

ADN plasmidique	1 μ l
enzyme de restriction (1 unité)	1 μ l
tampon 10X	1 μ l
eau distillée	7 μ l

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % visualise la taille du fragment libéré par la coupure.

7.9. Maxi-préparation d'ADN plasmidique

Le protocole utilisé est extrapolé de Sambrook *et al.* (1989). Un erlenmeyer contenant 200 ml de milieu LB (Annexe 2.4) estensemencé avec un peu de colonie bactérienne et est incubé à 37°C, une nuit, sous agitation. La suspension bactérienne est ensuite transvasée et centrifugée (350 g, 10 min). Les étapes ultérieures seront effectuées sur de la glace. Le culot est dissous dans 3 ml de solution de lyse I (Annexe 2.3) en pipettant et vortexant simultanément. 500 μ l d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml puis 1 ml d'EDTA 500 mM, pH 8 sont ajoutés pour une incubation de 15 min. La lyse est complétée par l'ajout de 5 ml de solution II (Annexe 2.3) en agitant doucement la suspension qui devient visqueuse. Celle-ci est centrifugée (200.000 g, 1 h, 4°C) et la phase supérieure est transvasée en estimant le volume (environ 10 ml).

Du chlorure de césium CsCl est additionné à raison de 1 g/ml et l'ensemble est vortexé. La solution est centrifugée à 800 g, 10 min pour éliminer les protéines qui se retrouvent à la surface du liquide. La phase aqueuse est déposée dans un tube d'ultracentrifugation et 250 μ l de bromure d'éthidium à 10 mg/ml sont ajoutés (pour un volume de 10 ml initial). Les tubes sont complétés avec du CsCl jusqu'à équilibration et sont centrifugés une nuit à 250.000 g, température ambiante. La bande d'ADN plasmidique est récupérée (volume X).

Le bromure d'éthidium est extrait par addition du même volume X d'isopropanol contenant 0,2 volume d'eau. Le mélange est centrifugé (800 g, 5 min, température ambiante) et l'opération est recommencée jusqu'à disparition de la couleur rouge dans l'isopropanol.

L'ADN plasmidique est alors précipité par un volume X d'eau et 2 volumes X d'isopropanol pur et centrifugé (6500 g, 10 min). Le culot est rincé à l'éthanol 70 %. Le surnageant est enlevé et le culot est séché à l'air libre avant d'être repris dans 400 μ l de TE. Une deuxième précipitation est effectuée avec de l'éthanol absolu (1 vol X échantillon/2,5 vol éthanol) et de l'acétate de sodium à 0,3 M en concentration finale. Le culot d'ADN sec est dissous dans du TE et la densité optique de l'échantillon est mesurée pour évaluer la concentration en acides nucléiques.

7.10. Séquençage

Les clones recombinants ont été séquencés selon la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) à l'aide du kit "T7 sequencing" (Pharmacia) et de radioisotopes ^{35}S -dATP (Amersham).

7.11. Southern blot

L'ADN génomique (10 μ g) est digéré par 10 unités de l'enzyme de restriction EcoR I pendant une nuit, à 37°C. Après migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1 %, l'ADN est transféré par capillarité avec du tampon SSC 20X (Annexe 2.3.) sur une membrane de nylon Hybond H⁺ (Amersham), selon le protocole détaillé dans le kit "ECL gene detection system" (Amersham). Après dénaturation de l'ADN par du NaOH 0,5 M, suivie d'un rinçage dans du SSC 5X, la membrane est hybridée avec une sonde pSH-RHO2 (Lee, comm. pers.) à 55°C pendant une nuit. La sonde est marquée par le radioisotope ^{32}P -dCTP, à l'aide du kit "random primers labelling system" (BRL), selon le protocole du fournisseur. La membrane est lavée dans du SSC 2X, 0,1 % de SDS (deux

fois 5 min, 60°C). Un film autoradiographique est déposé sur la membrane et révélé après un délai dépendant de l'intensité de la radioactivité.

7.12. Utilisation du système d'exploitation BISANCE

BISANCE est un système d'exploitation de banques de données (EMBL, GENBANK, NBRF) où sont répertoriées les séquences déjà connues d'acides nucléiques et de protéines dont la mise à jour est faite régulièrement. Il permet la consultation et l'utilisation des banques de séquences ainsi que des données personnelles. Notamment, des programmes d'homologies (FASTA) et d'alignement (KANEHISHA) entre une ou plusieurs séquences sont accessibles et sont utilisées pour identifier des séquences consensus.

RESULTATS - CHAPITRE I

**TRANSMISSIBILITE ET ETIOLOGIE
DE LA NEOPLASIE**

La nature endémique de la néoplasie hémocytaire chez les moules *Mytilus trossulus* de la baie du Puget Sound aux Etats-Unis a conduit à prendre en compte l'éventuelle transmissibilité à la principale espèce de moules cultivées en Europe, *M. edulis*. L'étude anatomopathologique et l'étiologie de cette maladie ont ensuite été abordées.

1. TRANSMISSIBILITE ET ANATOMOPATHOLOGIE

Plusieurs expériences de reproduction de la néoplasie chez des moules *M. edulis* ont été réalisées, les animaux étant conservés pendant une durée allant de 1 à 5 mois (Fig. 8). L'hémolymphe de moules *M. trossulus* fortement malades (>95 % d'hémocytes néoplasiques) a été prélevée et différents types d'inoculation ont été testés :

- injection d'hémolymphe dont la concentration cellulaire (10^6 cellules/50 μ l/animal) est ajustée avec de l'eau de mer filtrée autoclavée (EMFA). L'injection est réalisée au niveau du muscle adducteur postérieur.
- injection de surnageants de broyats hémocytaires, obtenus après dissociation des hémocytes à l'aide d'un homogénéiseur de tissus de type Potter et centrifugation (5000 g, 30 min, 8°C).
- injection de surnageants de broyats hémocytaires, obtenus comme précédemment et filtrés sur une membrane de porosité 0,45 ou 0,22 μ m.
- maintien de moules *M. edulis* et *M. trossulus* dans un même bac dans le but de tester la transmission par proximité.

Des lots témoins ont été préparés par injection de moules avec de l'EMFA. La température de l'eau des bacs est de l'ordre de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ou de $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Deux types de techniques ont été utilisées pour identifier les animaux présentant le syndrome : un examen à l'état frais d'un prélèvement d'hémolymphe (Fig. 10A) et l'observation de coupes histologiques (Fig. 10B).

La première expérience a consisté à vérifier la nature transplantable de la néoplasie à des moules *M. edulis*. Sur les vingt animaux analysés au bout de quatre mois, un seul présentait de nombreux hémocytes néoplasiques, sur coupes histologiques (Fig. 9C). Bien qu'il n'y ait eu qu'un seul animal montrant les symptômes de la néoplasie, la transplantabilité des hémocytes néoplasiques a donc semblé possible.

La deuxième et la troisième expérience ont eu pour but de confirmer la transplantabilité et de mettre en évidence le caractère infectieux, voire ultrafiltrable de la néoplasie. Tout d'abord, il faut noter le pourcentage important de mortalités liées essentiellement à la température de l'eau de mer qui favorise, après la mort d'une

Expérience (inoculum)	température de l'expérience	durée de l'expérience	nb d'animaux analysés / nb initial	nb d'animaux malades	
				état frais	histologie
Expérience 1 hémolymphe	20°C	4 mois	20/35	2 (10 %)	1 (5 %)
Expérience 2 hémolymphe broyat broyat (0,45 µm)	20°C 20°C 20°C	3 mois 3 mois 3 mois	6/207 2/134 4/164	0 (0 %) 2 (100 %) 0 (0 %)	0 (0 %) 2 (100 %) 0 (0 %)
Expérience 3 broyat broyat (0,45 µm) eau de mer	20°C 20°C 20°C	5 mois 5 mois 5 mois	8/147 32/134 8/109	0 (0 %) 1 (3 %) 0 (0 %)	0 (0 %) 1 (3 %) 0 (0 %)
Expérience 4 broyat broyat (0,22 µm) proximité eau de mer (témoin) <i>O. edulis</i> (broyat)	5°C 5°C 5°C 5°C 5°C	1 mois ½ 1 mois ½ 1 mois ½ 1 mois ½ 1 mois ½	74/100 91/100 34/100 79/100 8/20	8 (10 %) 7 (8 %) 3 (9 %) 4 (5 %) 0 (0 %)	ND ND ND ND ND

Fig. 8 : Expériences de transmission de la néoplasie à des moules *M. edulis* par injection d'hémolymphe néoplasique, de broyats d'hémocytes néoplasiques filtrés ou non (0,22 µm ou 0,45 µm) ou par proximité.
Essai de transmission par broyats d'hémocytes néoplasiques à l'huître plate *Ostrea edulis*
(Le pourcentage d'animaux malades est estimé par rapport au nombre d'animaux analysés ; ND : non déterminé).

moule, un développement microbien très rapide et provoque des mortalités en série. Ces mortalités n'ont pas pu être associées à la présence d'hémocytes néoplasiques en raison de la difficulté à établir un diagnostic sur une moule post-mortem.

A l'issue de la deuxième expérience, deux moules *M. edulis* inoculées par un broyat d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus*, ont présenté des infiltrations importantes d'hémocytes néoplasiques au niveau des différents tissus des animaux (Fig. 9A, B). Une moule *M. edulis*, ayant reçu une injection d'un filtrat (0,45 μm) d'hémocytes néoplasiques broyés, a montré les symptômes de la néoplasie, à la fin de la troisième expérience. Cependant, en raison du faible nombre d'animaux analysés, les pourcentages d'individus atteints n'ont qu'une valeur relative.

L'examen à l'état frais s'est avéré fiable par rapport à l'examen de coupes histologiques, en particulier lorsque de nombreuses cellules anormales ont été décelées dans le prélèvement d'hémolymphe.

Les degrés d'infection estimés après examen à l'état frais et analyse histologique correspondent à des stades avancés de la néoplasie, dans le cas des quatre moules diagnostiquées malades à l'issue des trois premières expériences (Fig. 9). Cependant, des animaux à des stades terminaux de la maladie (> 95 % d'hémocytes néoplasiques) n'ont jamais été observés chez l'espèce *edulis*.

Une quatrième expérience a été réalisée pour tenter de confirmer les observations des expériences précédentes. Dans cet essai, la température de l'eau de mer a été maintenue à 5°C pour éviter les mortalités rapides associées au développement microbien et pour se rapprocher des conditions hivernales, la plus forte prévalence de la néoplasie chez *M. trossulus* ayant été reportée pendant l'hiver (Mix, 1983). Cet essai n'a pu être mené à terme en raison d'une défaillance du système de refroidissement, le choc thermique ayant provoqué la mort de tous les animaux, deux mois après le début de l'expérience. Des cas de néoplasies ont pu être cependant diagnostiqués au cours d'un examen à l'état frais de l'hémolymphe des moules, réalisé à un mois et demi. Seuls les animaux dont l'hémolymphe renfermait un nombre de cellules anormales supérieur à 10 % ont été diagnostiqués malades. En effet, des hémocytes normaux peuvent présenter un aspect similaire aux hémocytes néoplasiques (cellules rondes, individuelles, non étalées) lorsqu'ils sont prélevés de moules en mauvaises conditions physiologiques.

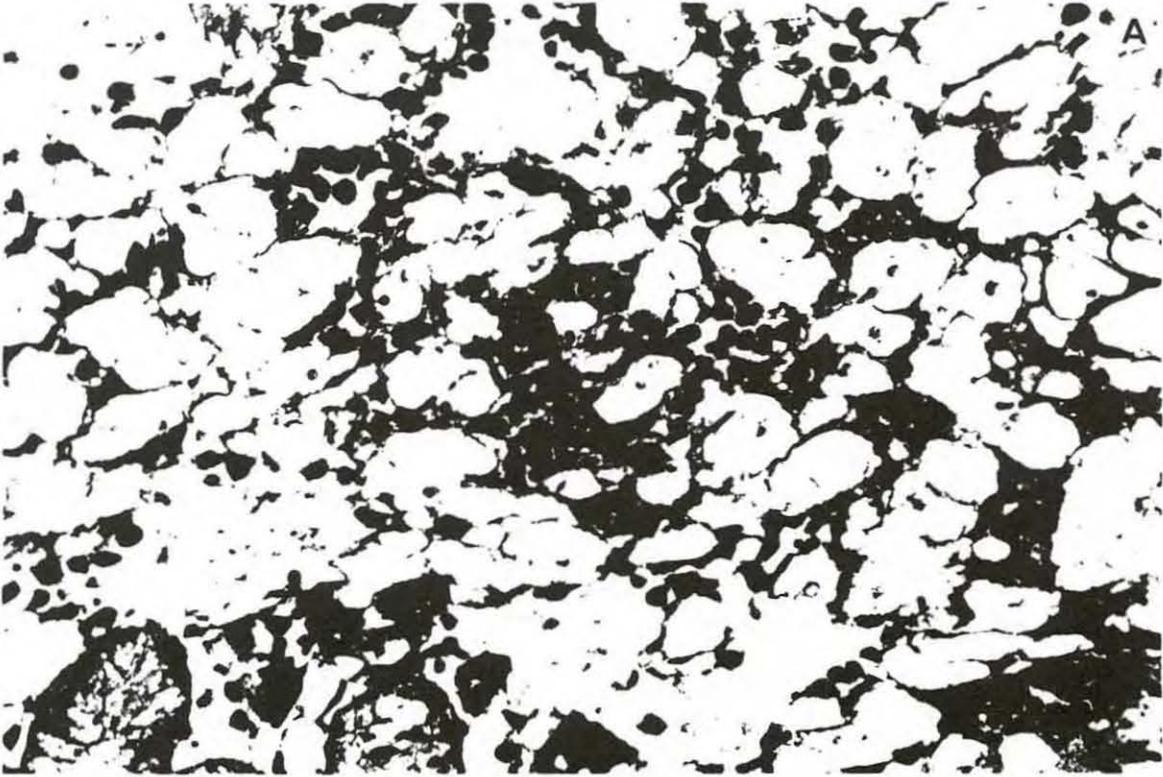
Dans ces conditions, il est apparu que le pourcentage d'individus atteints a varié entre 8 % (lots ayant reçu une injection de broyats cellulaires filtrés), 9 % (animaux sains à proximité d'animaux malades) et 10 % (individus injectés avec des broyats cellulaires). La proportion de cellules anormales dans les lots témoins a été estimée à 0 % (*O. edulis*) et 5 % (*M. edulis*). Ces résultats sont à prendre avec précaution dans la mesure où des examens sur coupes histologiques n'ont pu être effectués, la durée de

Fig. 9 : Etude anatomopathologique de moules *M. edulis*, lors des expériences de transmission de la néoplasie hémocytaire par injection de broyats d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* (A et B) ou d'hémolymphe néoplasiques (C)

A : présence d'hémocytes néoplasiques dans le tissu conjonctif de la glande digestive (X 66)

B : infiltration d'hémocytes néoplasiques au niveau des tubules digestifs. On note une importante vacuolisation (→) des tubules digestifs (X 132)

C : infiltration d'hémocytes néoplasiques au niveau du tissu conjonctif du manteau (X 66)



l'expérience a été relativement courte et le lot témoin de moules *M. edulis* a présenté un faible pourcentage de cellules atypiques pouvant être assimilées à des hémocytes néoplasiques. Ces observations ont soulevé le problème de la fiabilité du diagnostic à l'état frais pour des faibles degrés des cas de néoplasies hémocytaires et le risque d'infection d'un bac à l'autre.

Chez les moules *M. edulis* infectées expérimentalement, l'étude anatomopathologique a révélé la présence de nombreux hémocytes néoplasiques dans différents tissus tels que, le tissu conjonctif au niveau de la glande digestive (Fig. 9A, B) ou au niveau du manteau (Fig. 9C). L'infiltration des hémocytes néoplasiques s'accompagne de phénomènes de désorganisation tissulaire, en particulier d'une vacuolisation des tubules digestifs (Fig. 9B).

Chez des animaux indemnes à l'issue des expériences, une forte réaction inflammatoire ainsi qu'une mobilisation importante de granulocytes éosinophiles ont été observées.

2. HISTOLOGIE DES HEMOCYTES NORMAUX ET NEOPLASIQUES

Les caractéristiques morphologiques des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* ont été analysées en microscopie photonique et électronique, en prenant en référence les hémocytes normaux de *M. edulis*.

2.1. Caractéristiques morphologiques des cellules normales et néoplasiques

Trois types hémocytaires ont été décrits chez la moule *M. edulis* (Lowe and Moore, 1978 ; Cheng, 1981) :

- les hyalinocytes qui sont de petites cellules (4-6 μm), basophiles, sans granulations et à rapport nucléocytoplasmique élevé.
- les granulocytes basophiles dont la taille varie entre 7 et 10 μm et qui renferment un certain nombre de granules. La taille de leur noyau est hétérogène.
- les granulocytes éosinophiles qui sont caractérisés par leur grande taille (7-12 μm), un petit noyau souvent excentré et la présence de nombreux gros granules, à affinité éosinophile.

Ces différents types hémocytaires ont été régulièrement reconnus sur frottis et sur coupes de moules normales, *M. edulis* et *M. trossulus*.

Fig. 10 : Etude morphologique et ultrastructurale des hémocytes néoplasiques de *Mytilus trossulus*

A : Examen à l'état frais d'hémocytes néoplasiques (▶) et d'hémocytes normaux au microscope inversé, à contraste de phase (X 100)

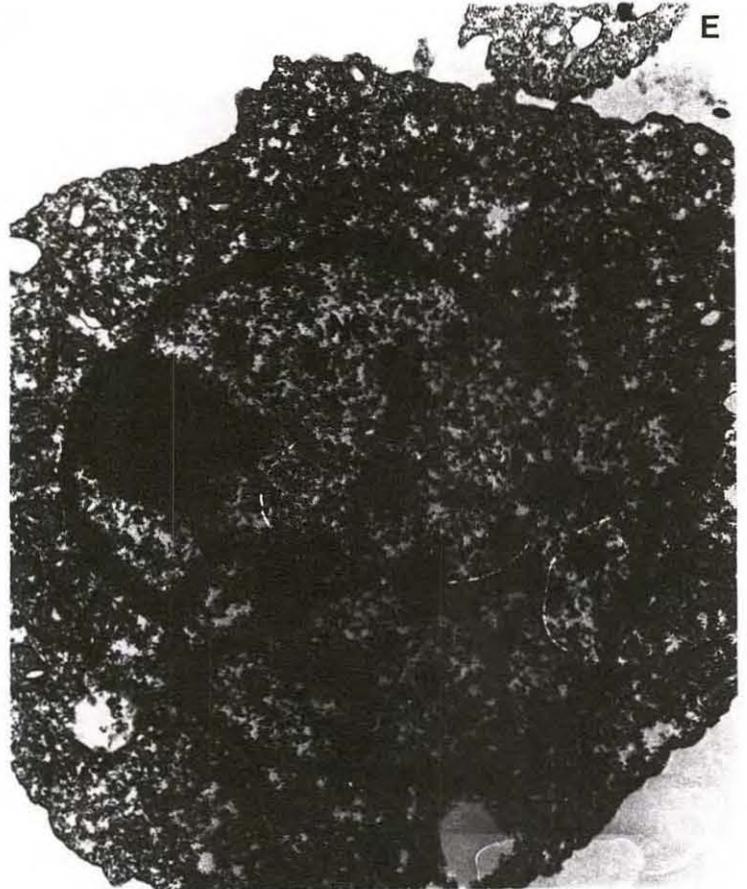
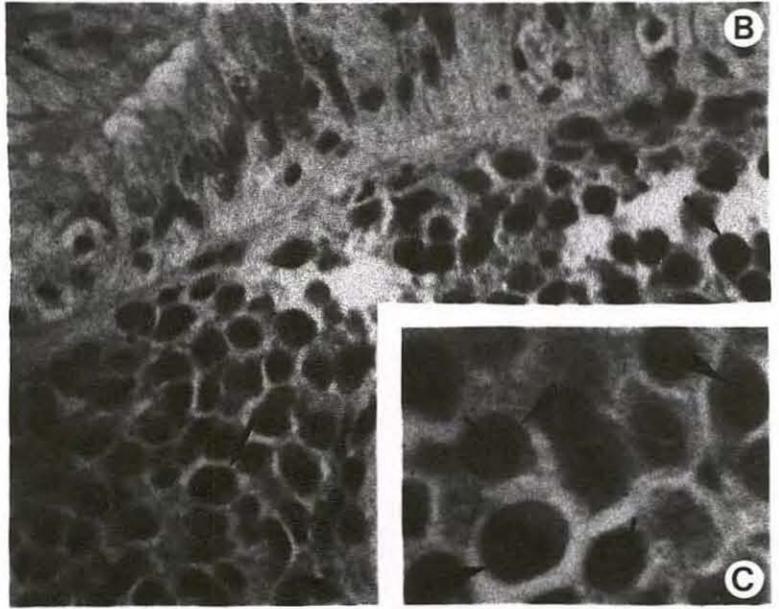
B : Infiltration des hémocytes néoplasiques au niveau du tissu conjonctif vésiculaire et des tubules digestifs de moule (TD), sur coupe histologique (X 100)

C : Hémocytes néoplasiques caractérisés par un gros noyau (▶), renfermant un ou plusieurs nucléoles (→). Des figures de mitose (→) sont fréquemment rencontrées (X 250)

D et E : Ultrastructure des hémocytes néoplasiques :

D : cellules à rapport nucléocytoplasmique élevé dont le cytoplasme contient parfois des granules amorphes (GA). Un granulocyte normal (G) est également observé (X 4000).

E : il faut noter le noyau volumineux (NO), la présence d'au moins un nucléole (NU) et l'invagination fréquente de la membrane nucléaire (I). Dans le cytoplasme, de nombreux ribosomes libres sont visualisés (X 10 000).



Un examen d'hémolymphe à l'état frais permet de différencier les hémocytes normaux (Fig. 10A), qui ont tendance à s'agréger et à s'étaler sur la lame de verre et les hémocytes néoplasiques qui ont perdu leur capacité d'agrégation et d'étalement sur un support (Fig. 10A). Ces cellules apparaissent réfringentes lorsqu'elles sont observées à l'aide d'un microscope à contraste interférentiel et du fait de la densité des hémocytes (jusqu'à 250.10^6 cellules/ml), l'hémolymphe d'un individu fortement malade apparaît colorée en jaune pâle.

Sur coupes histologiques de moules *M. trossulus*, les cellules néoplasiques sont caractérisées par leur grande taille (11–15 μm), un rapport nucléocytoplasmique élevé et la présence d'un ou plusieurs nucléoles. De plus, des figures de mitose sont fréquemment observées (Fig. 10B, C). Elles remplacent les hémocytes normaux dans l'hémolymphe et envahissent les différents tissus de l'animal provoquant leur désorganisation (Fig. 10B).

2.2. Caractéristiques ultrastructurales des cellules normales et néoplasiques

Une étude ultrastructurale récente a confirmé l'existence chez *M. edulis* de trois types hémocytaires : des hyalinocytes et deux types de granulocytes, différenciés par la taille de leur granules (Pipe, 1990a).

L'analyse ultrastructurale des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* a mis en évidence d'importantes modifications au niveau des noyaux dont la taille est accrue et qui apparaissent très polymorphes, souvent lobés ou renfermant de profondes invaginations. Un ou plusieurs nucléoles sont souvent observés. L'hétérochromatine est fréquemment localisée à la limite de la membrane nucléaire (Fig. 10D).

Le cytoplasme contient de nombreux ribosomes, rarement associés au réticulum endoplasmique et pas d'appareil de Golgi. Les mitochondries d'aspect normal sont généralement peu nombreuses. De gros granules amorphes, hétérogènes en taille et faiblement denses aux électrons sont caractéristiques de ces cellules. Ils ne sont pas limités par une membrane (Fig. 10E).

Aucune particule de type viral n'a pu être détectée lors de ces examens ultrastructuraux.

3. ESSAIS D'INDUCTION DE PARTICULES VIRALES

L'observation des hémocytes néoplasiques en microscopie électronique n'ayant pas révélé la présence de particules virales, l'utilisation de la 5-bromo-2-désoxyuridine (BUdR) a été envisagée en raison de son activité inductrice de particules de rétrovirus qui a été bien établie chez les Vertébrés (Goz, 1978 ; De Clercq *et al.*, 1981) et chez le Mollusque bivalve *Mya arenaria* (Oprandy and Chang, 1983).

Une première expérience d'induction a consisté à placer 10 moules *M. trossulus* non malades et 5 moules *M. trossulus* présentant des pourcentages divers d'hémocytes néoplasiques (de < 20 % à > 95 %) dans des bacs de 2 l d'eau de mer contenant 100 µg/ml de BUdR (Fig. 11). Cette concentration de BUdR a été retenue sur la base des expériences d'induction réalisées avec succès chez *Mya arenaria* par Oprandy and Chang (1983). Les traitements ont été effectués pendant une durée de 5 jours, à la température de $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Un lot témoin de 10 moules normales *M. trossulus* dans de l'eau de mer a également été constitué (Fig. 11).

Nombre de moules	Etat des animaux	Traitement	Dose
10	non malades	eau de mer (témoin)	-
10	non malades	5-bromo-2-désoxyuridine	100 µg/ml
5	malades	5-bromo-2-désoxyuridine	100 µg/ml

Fig. 11 : Constitution des lots de moules *M. trossulus*, normales et présentant divers pourcentages d'hémocytes néoplasiques (première expérience d'induction de particules rétrovirales, par balnéation dans une solution de 5-bromo-2-désoxyuridine).

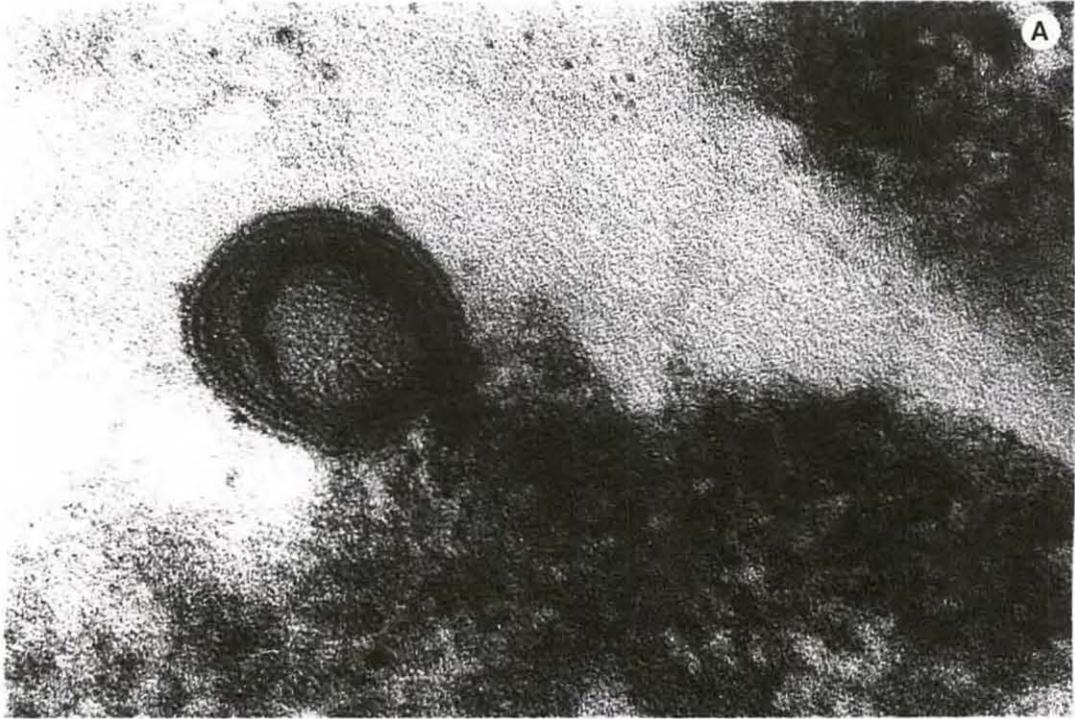
A l'issue de l'expérience, l'analyse ultrastructurale a révélé la présence de bourgeonnements au niveau des membranes plasmiques des hémocytes néoplasiques (Fig. 12A, B). Il s'agit de particules subsphériques de 100 nm de diamètre moyen. Le nucléoïde, bordé par une membrane unitaire, est dense aux électrons et la particule est entourée par une enveloppe apparemment lisse, constituée également d'une membrane unitaire. Ces images ont été cependant très rarement observées. Au niveau des mitochondries, des inclusions cristallines inertes et de taille variable ont été parfois remarquées (Fig. 12C).

Fig. 12 : Etude ultrastructurale d'hémocytes néoplasiques chez *M. trossulus*, après induction par la 5-bromo-2-désoxyuridine

A et B: Bourgeoisements de particules au niveau de la membrane plasmique d'un hémocyte anormal (X 150.000)

C: Inclusion cristalline à l'intérieur d'une mitochondrie d'un hémocyte néoplasique (X 60.000)


50 nm



Deux autres expériences ont été réalisées selon un protocole expérimental identique à celui de la figure 11. Des images de bourgeonnements ont été observées mais plus rarement et de façon moins nette que précédemment.

4. DISCUSSION

La transplantabilité de la néoplasie par injection d'hémocytes néoplasiques et la transmissibilité à l'aide de broyats cellulaires avaient été démontrées par Elston *et al.* (1988b) chez des moules saines *M. trossulus*. L'assimilation des moules du Puget Sound (Etat de Washington, USA) à l'espèce *M. trossulus* a été récemment démontrée par l'équipe de Elston (Brooks, 1991), à l'aide d'analyses isoenzymatiques. Cependant, l'interfécondité observée entre *M. trossulus* et *M. edulis* (Elston, comm. pers.) remet en cause le statut d'espèce au profit de la notion de race. Les essais de transmission de la néoplasie à des individus *M. edulis* originaires de la côte atlantique française ont été réalisés pour vérifier la nature permissive ou réfractaire de cette espèce. Les résultats obtenus lors de cette étude suggèrent que la transmission de la néoplasie hémocytaire à l'espèce *M. edulis* soit possible. En effet, indépendamment des types d'inoculum, de nombreuses cellules néoplasiques ont été détectées chez 4 animaux sur les 80 analysés en histologie à l'issue des trois premières expériences. Des analyses histologiques effectuées tout au long de ce travail sur des moules *M. edulis* prélevées dans le bassin de Marennes-Oléron n'ont mis en évidence qu'un seul cas de néoplasie hémocytaire, attestant la faible prévalence naturelle.

Les résultats de la dernière expérience ont complété cette analyse, bien qu'ils soient à prendre avec précaution. En effet, des examens histologiques n'ont pas pu être réalisés, en raison de mortalités massives occasionnées par un choc thermique. Si l'examen d'un prélèvement à l'état frais a été approprié pour mettre en évidence des cellules anormales chez des individus fortement malades, il s'est avéré insuffisamment fiable pour diagnostiquer des stades précoces de la maladie. De plus, chez les moules normales *M. edulis*, il a été parfois possible d'observer des hémocytes moribonds présentant un aspect similaire à celui des cellules néoplasiques (cellules rondes, individuelles, non étalées), le pourcentage de ce type de cellules étant toutefois faible (< 5 %). Les animaux expérimentaux ont été estimés malades quand leur hémolymphe a renfermé plus de 10 % de cellules d'aspect anormal. Dans ces conditions, une relative fiabilité a été obtenue entre un examen à l'état frais et l'histologie (expériences 1 à 3) qui reste la méthode de détection la plus fiable (Moore *et al.*, 1991b).

Des tentatives de transmissibilité de la néoplasie hémocytaire à d'autres espèces de Mollusques bivalves *Mya arenaria*, *Ostrea conchaphila* et *Ostrea edulis* avaient échoué

(Kent *et al.*, 1991). Les résultats de nos essais sur cette dernière espèce ont confirmé ces observations.

Un certain nombre de commentaires apparaissent au vu de ces essais de transmissibilité et des résultats relatifs aux taux et degrés des cas de néoplasies expérimentales. Tout d'abord, la mise en évidence de la transmission de la néoplasie à des moules normales *M. edulis*, par proximité avec des moules *M. trossulus* présentant des degrés divers de la maladie est un paramètre important. En effet, bien que les résultats soient eux aussi à analyser avec circonspection, ils suggèrent un risque potentiel de transfert de la néoplasie à des moules d'autres zones géographiques, comme cela est déjà le cas au sein des populations de *M. trossulus*.

Par référence aux conditions naturelles de transmission de la néoplasie chez *M. trossulus*, pour laquelle une plus forte prévalence est associée aux conditions hivernales (Mix, 1983), une température de 5°C a été utilisée dans la dernière expérience et a semblé plus favorable. En effet, dès 1 mois ½, un certain pourcentage de moules *M. edulis* ont présenté les symptômes de la néoplasie.

Malgré des durées assez longues d'expérimentations, la prévalence de la néoplasie chez *M. edulis*, cumulée pour les trois premières expériences, est faible : 5 %. Comparativement, deux expériences séparées indiquent que 86 et 60 % de moules *M. trossulus* développent la néoplasie entre 3 et 5 mois, respectivement (Elston *et al.*, 1988b). Pour ces auteurs, la prévalence de la maladie semble similaire quel que soit le type d'inoculum (hémocytes néoplasiques intacts ou broyés), le délai d'apparition de la néoplasie étant différé de 2 à 4 mois dans le second cas. Dans nos essais, les prévalences n'ont pas tenu compte des mortalités constatées au cours des expériences car il a été impossible de dissocier les hémocytes néoplasiques de ceux qui étaient moribonds dans l'hémolymphe des moules post-mortem.

Par ailleurs, des animaux à des stades terminaux de la maladie n'ont pas été observés chez l'espèce *edulis*, même au bout de quatre à cinq mois (expériences 1 et 3). Par référence aux travaux de Elston *et al.* (1988b), 25 % des animaux à un stade terminal de la néoplasie avaient été observés chez *M. trossulus* dès le cinquième mois d'expérience. Enfin, les examens histologiques ont révélé de fortes réactions inflammatoires et la présence d'un nombre anormalement élevé de granulocytes éosinophiles dans les tissus de *M. edulis* indemnes à l'issue des expériences. Ce type d'observations avait été décrit chez des animaux *M. trossulus* en état de rémission, mis en évidence par des analyses hématologiques séquentielles (Elston *et al.*, 1988a). Ces auteurs avaient également noté la présence d'une matrice fibreuse extracellulaire piégeant les hémocytes néoplasiques et qui était probablement sécrétée par les hémocytes normaux.

Ces constatations laissent supposer une moindre sensibilité de l'espèce *M. edulis* à la néoplasie hémocytaire, suggérée à la fois par une faible prévalence et des taux

généralement limités de développement des cellules néoplasiques. De plus, les réactions inflammatoires fréquemment observées chez les individus indemnes pourraient indiquer un processus de défense de l'hôte.

Les cellules atypiques ont été identifiées comme néoplasiques sur la base de critères morphologiques et en raison de leur apparente capacité de multiplication et de prolifération dans les différents tissus de l'animal, alors qu'*in vitro*, ces cellules perdent les capacités d'agrégation et d'étalement, caractéristiques des hémocytes de Mollusques. L'examen ultrastructural a permis de préciser les modifications morphologiques des hémocytes néoplasiques. La grande taille de ces cellules peu différenciées, leur rapport nucléocytoplasmique élevé, l'irrégularité de forme des noyaux, ainsi que la présence et le nombre de nucléoles sont autant de caractéristiques parmi les plus importantes d'un diagnostic tumoral chez différents types cellulaires de Vertébrés (Ghadially *et al.*, 1985) et notamment chez des tumeurs de monocytes humains (Kim *et al.*, 1982). De plus, le nombre important de ribosomes libres reflète probablement une synthèse protéique active indispensable à la division et à la croissance cellulaires. Par ailleurs, la polyploïdie de ces cellules mesurée par cytométrie de flux (Elston *et al.*, 1990) est également un critère de diagnostic et de pronostic chez des lymphomes de cellules B humains (Braylan *et al.*, 1984). D'autres caractéristiques d'un état tumoral, définies pour des lignées cellulaires transformées de Vertébrés (perte de l'inhibition de contact, faibles exigences en facteurs de croissance sériques,...) n'ont pu être établies, en raison des difficultés de culture et de maintien *in vitro* des cellules de Mollusques (Mialhe *et al.*, 1988) et notamment des hémocytes (Hervio, 1992). La mise en évidence de leur transplantabilité dans un hôte syngénique (Elston *et al.*, 1988b), ainsi qu'une capacité de multiplication plus élevée des cellules anormales, par incorporation de thymidine tritiée (Noël, rapport de D.E.A.) renforcent l'hypothèse de leur caractère tumoral. En outre, la multiplication d'hémocytes néoplasiques en culture a pu être récemment observée et six repiquages ont pu être réalisés (Elston, comm. pers.).

La nature infectieuse de la néoplasie hémocytaire a été suspectée à la suite des essais de Elston *et al.* (1988b) et des présents résultats, en particulier lors des expériences réalisées avec des ultrafiltrats. La présence d'un virus n'a pu être révélée par l'observation de particules virales en microscopie électronique. Parmi les virus oncogènes décrits chez les animaux, les représentants des genres de polyomavirus et d'adénovirus sont connus pour ne pas provoquer de tumeurs chez leur espèce hôte. Par contre, certains membres des genres de papillomavirus, d'herpèsvirus et de virus de type hépatite-B sont capables d'induire la formation de tumeurs chez l'hôte, ainsi que certains rétrovirus, et sont capables de transformer une cellule sous forme d'épisomes ou

à l'état de provirus. L'hypothèse qu'un rétrovirus puisse être à l'origine de la néoplasie hémocytaire chez la moule *M. trossulus* a été prise en compte tout particulièrement car des particules de type rétroviral ont été purifiées à partir d'une néoplasie hémocytaire similaire chez *Mya arenaria* (Oprandy *et al.*, 1981). Après induction par de la 5-bromo-2-désoxyuridine, des particules virales avaient été observées puis purifiées et inoculées à des individus sains, chez lesquels elles avaient provoqué à nouveau une néoplasie hémocytaire (Oprandy and Chang, 1983).

Nos essais d'induction par la 5-bromo-2-désoxyuridine n'ont pas permis d'affirmer la nature rétrovirale de l'agent responsable de la néoplasie, bien que certaines images permettent de soupçonner la présence de particules de type rétroviral. En effet, elles reflètent un certain nombre de caractéristiques communes aux rétrovirus : la morphologie, la taille, l'assemblage et la production de particules par bourgeonnements au niveau de la membrane plasmique (Lowy, 1985). La rareté des particules observées a laissé supposer que la production de virions libres soit réduite et incompatible avec des essais de purification. Une injection de BUdR à l'animal pourrait être substituée à la technique de balnéation pour essayer d'augmenter l'efficacité du traitement. De plus, la détection en microscopie électronique, s'est avérée très lourde à mettre en oeuvre. Elle pourrait difficilement être remplacée par des analyses sur des primocultures d'hémocytes, en raison de la perte rapide des capacités fonctionnelles des hémocytes, *in vitro* (Hervio, 1992). La recherche d'une activité transcriptase réverse semble aussi difficile si les particules sont trop rares, la détection de cette enzyme étant généralement effectuée à partir de particules présentes dans des surnageants de culture (Wondrak *et al.*, 1986 ; Löwer *et al.*, 1987 ; Gregersen *et al.*, 1988). Il faut rappeler l'échec de mise en évidence d'une activité transcriptase réverse (Elston, comm. pers.) dans des échantillons d'hémolymphe de moules néoplasiques à des stades très avancés de la néoplasie. L'implication d'un rétrovirus n'est cependant pas exclue car il existe des cas où la production de particules est très limitée (Burny *et al.*, 1988). En outre, des travaux très récents chez *Mya arenaria* ont permis d'isoler à partir des ovules d'animaux néoplasiques des virus icosaédriques de 100 nm après centrifugations sur gradient de sucrose alors qu'il est impossible de les mettre en évidence chez les hémocytes néoplasiques (Sunila, comm. pers.). De plus chez cette espèce, la reproduction de la maladie a été obtenue chez 70 % d'individus normaux par injection d'ovules isolés d'animaux néoplasiques. Par référence à un mécanisme d'infection du groupe de virus de sarcome aviaire, cet auteur suggère que les virus infectent les ovules où ils subissent une maturation et à partir desquels ils vont ensuite infecter la cellule souche des hémocytes néoplasiques. Ces données d'importance fondamentale conduisent à envisager l'application de techniques de centrifugation différentielle sur des broyats d'ovules, chez

la moule dont la néoplasie hémocytaire présente, par ailleurs, de nombreuses caractéristiques comparables à celles de *M. arenaria*.

En conclusion, la néoplasie hémocytaire, identifiée chez *M. trossulus* est susceptible d'affecter *M. edulis*, bien que les représentants de cette espèce apparaissent moins sensibles. Par référence à la sensibilité différentielle de souches d'huître plate à une infection expérimentale par un protozoaire intrahémocytaire (Hervio, 1992), il serait intéressant de comparer strictement les prévalences de néoplasies expérimentales chez des moules *M. trossulus* et *M. edulis*, ayant reçu le même inoculum.

Le risque d'introduire un pathogène dans une nouvelle population hôte par le transfert d'animaux malades *M. trossulus* met l'accent sur la nécessité de développer des mesures prophylactiques qui reposent essentiellement sur des méthodes de diagnostic fiables. Celles-ci seraient non seulement utiles aux contrôles zoosanitaires mais aussi pour étudier l'épidémiologie de la néoplasie aux USA, notamment les modes de transmission horizontale, et éventuellement verticale.

RESULTATS - CHAPITRE II

**CARACTERISATION ANTIGENIQUE
DES HEMOCYTES**

Dans l'optique de caractériser des déterminants antigéniques associés aux hémocytes néoplasiques, des anticorps spécifiques ont été préparés et utilisés pour la mise au point de diagnostics de la néoplasie et aborder l'identification des molécules impliquées dans le processus de transformation. Parallèlement, la caractérisation de déterminants antigéniques spécifiques des hémocytes normaux a été entreprise à l'aide d'anticorps monoclonaux, ces travaux étant motivés par l'absence de marqueurs antigéniques pour identifier des sous-populations hémocytaires chez les Mollusques bivalves.

1. PREPARATION D'ANTICORPS POLYCLONAUX CONTRE DES HEMOCYTES NEOPLASIQUES

L'immunisation des souris et la réactivité de leur sérum vis-à-vis des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* et des hémocytes normaux de *M. edulis*, ont été vérifiées à l'aide d'un immunodosage enzymatique de type ELISA (voir Matériels et Méthodes). En dépit des immunisations réalisées avec des suspensions d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus*, les signaux obtenus ont toujours été similaires ou plus élevés vis-à-vis des hémocytes normaux de *M. edulis* (Fig. 13). De ce fait, les sérums ont été épuisés avec des extraits acétoniques d'hémocytes normaux dans le but de réduire la proportion des anticorps réagissant contre des antigènes communs aux cellules normales et néoplasiques, chez les deux espèces. Cette épuisement du sérum a conduit à une réduction importante des signaux en ELISA sans pour autant accroître la spécificité des immunsérums vis-à-vis des hémocytes néoplasiques (données non présentées).

2. PREPARATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Etant donné l'impossibilité d'obtenir des anticorps polyclonaux spécifiques des hémocytes néoplasiques, des anticorps monoclonaux (AcM) ont été préparés selon la technique d'hybridation lymphocytaire.

2.1. Etat d'immunisation des souris

Les immunsérums des souris ayant subi une immunisation active ou passive (voir Matériels et Méthodes) ont été contrôlés de manière à choisir celles devant être utilisées pour la fusion cellulaire.

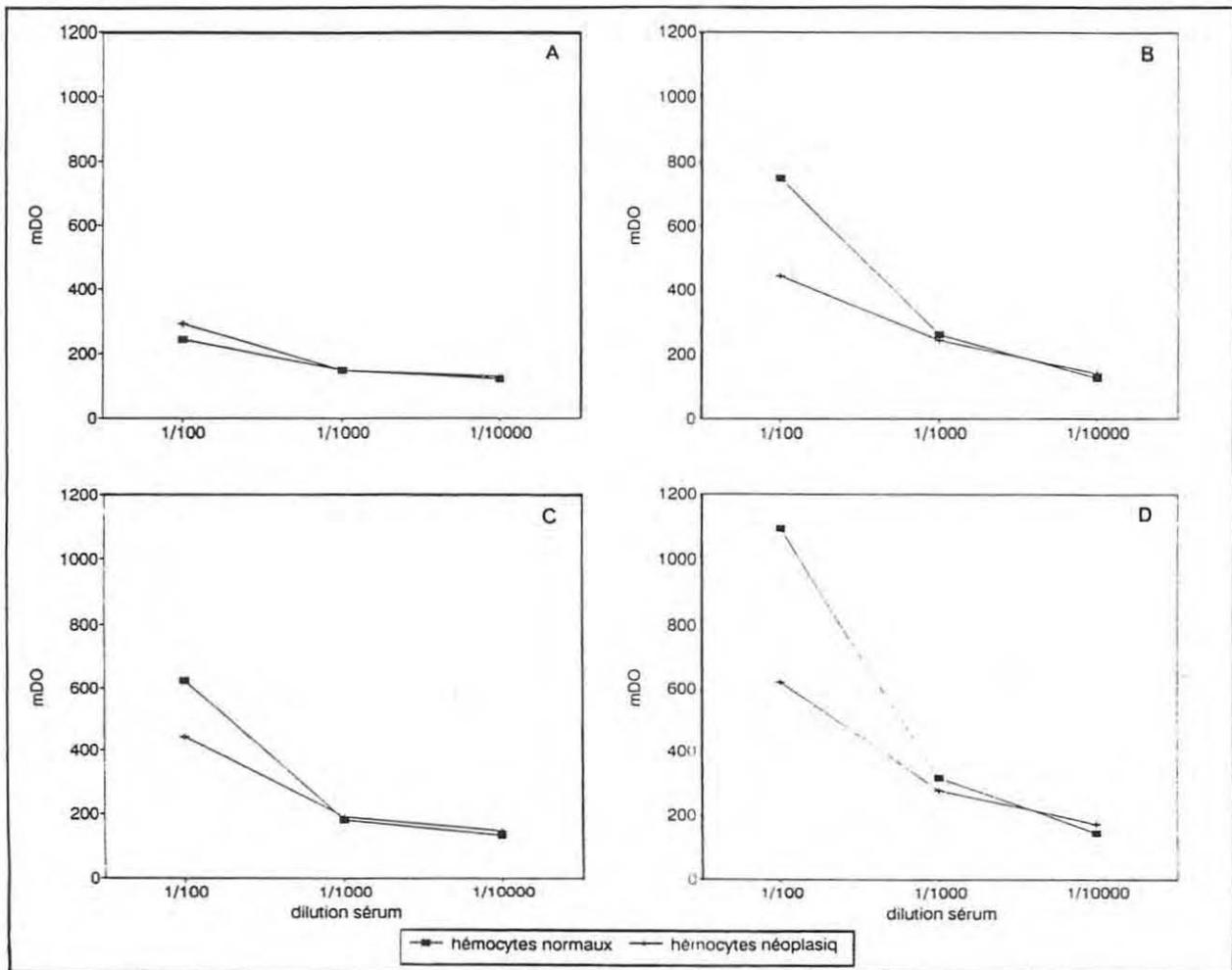


Fig. 13 : Réactivité des immunsérums de souris immunisées avec des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* en fonction de la dilution du sérum. Dosage des sérums vis-à-vis d'hémocytes normaux de *M. edulis* et d'hémocytes néoplasiques, selon une méthode E.L.I.S.A. (A, B, C, D : quatre immunsérums différents)

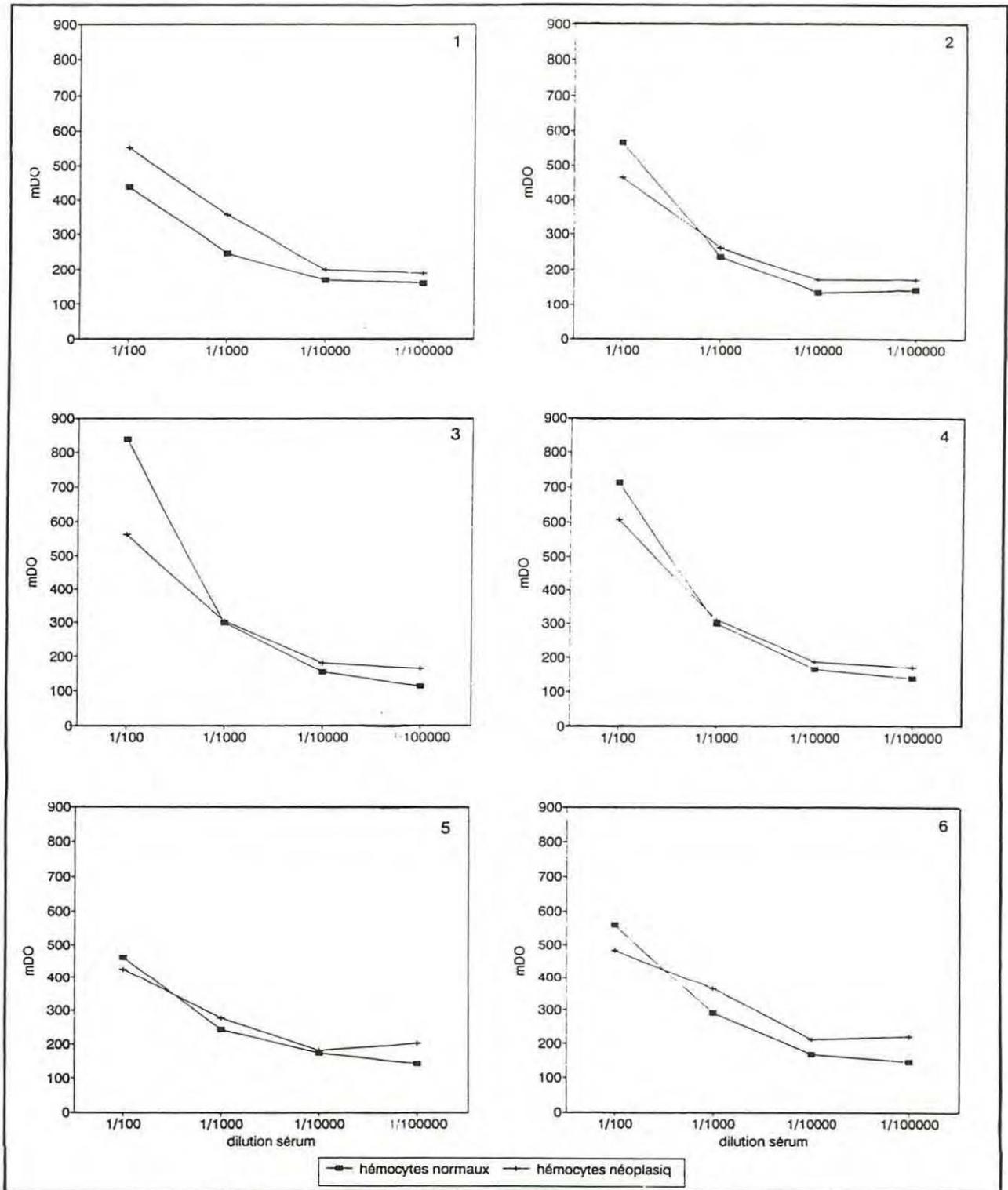


Fig. 14 : Etat d'immunisation des souris ayant subi une immunisation active (hémocytes néoplasiques de *M. trossulus*). Dosage des sérums vis-à-vis d'hémocytes normaux de *M. edulis* et d'hémocytes néoplasiques, par E.L.I.S.A., trois semaines avant la fusion (1, 2, 3, 4, 5, 6 : six sérums différents)

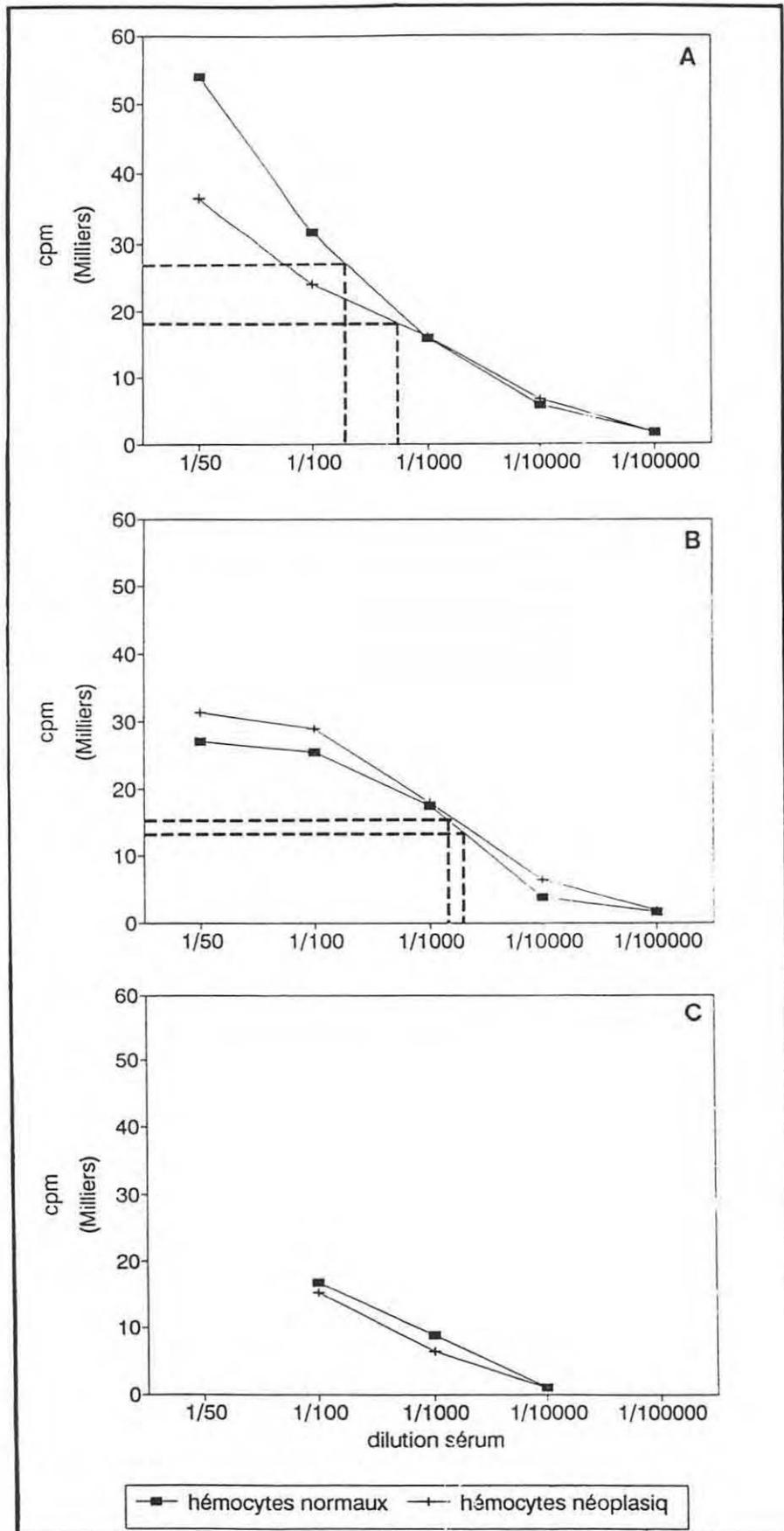


Fig. 15 : Titre du sérum des souris sélectionnées pour l'hybridation lymphocytaire, évalué le jour de la fusion par R.I.A., vis-à-vis d'hémocytes normaux de *M. edulis* et néoplasiques
A : souris A, immunisée de manière passive
B : souris 1, immunisée de manière active
C : sérum témoin

Dans le cas des souris immunisées de manière active, seule la souris n°1 a présenté un signal toujours plus élevé vis-à-vis des hémocytes néoplasiques que vis-à-vis des hémocytes normaux (Fig. 14). Celle-ci a donc été retenue pour l'hybridation lymphocytaire bien que les signaux observés avec les deux types d'hémocytes aient été sensiblement équivalents. Les sérums provenant des souris qui ont reçu une immunisation passive ont montré une immunoréactivité similaire sur les deux types d'hémocytes (données non présentées).

Le jour de l'hybridation cellulaire, les réactivités du sérum de la souris n°1 et celui de la souris A, immunisée de manière passive et sélectionnée au hasard, ont été à nouveau vérifiées selon une technique radioimmunologique et leur titre a été déterminé (Fig. 15). Le titre correspond à la dilution de l'immunsérum pour laquelle le signal obtenu est égal à la moitié du plateau. Il est plus élevé vis-à-vis des hémocytes néoplasiques dans le cas de la souris n°1 (1/2500 sur cellules néoplasiques et 1/3000 sur cellules normales) (Fig. 15A) mais il est plus faible dans le cas de la souris A (1/750 et 1/350, respectivement) (Fig. 15B).

2.2. Résultats de la fusion cellulaire

La fusion cellulaire a été réalisée avec 113.10^6 splénocytes (souris n°1) et 156.10^6 splénocytes (souris A), le rapport splénocyte/myélome étant dans les deux cas égal à 5/1. La probabilité de former un hybride viable étant de l'ordre de $1,5.10^{-5}$, 150.000 cellules ont étéensemencées par puits de culture, ces conditions devant permettre d'obtenir statistiquement un hybridome par puits, ce qui correspondrait à des conditions de préclonage. Compte tenu de ces paramètres, les cellules provenant de la souris 1 ont été distribuées dans 9 plaques de 96 puits et celles de la souris A dans 12 plaques de culture.

Le nombre et le pourcentage de puits contenant des hybridomes qui se sont développés ont été évalués par examen direct à l'aide d'un microscope inversé (Fig. 16), soit respectivement : 78,8 % dans le cas de la souris A et 66,2 % pour la souris 1. De manière à déterminer précocement si les conditions de préclonage ont été correctes, la fréquence de distribution des hybridomes dans les puits de culture a été estimée. Celle-ci suit une loi de Poisson dont la relation générale est la suivante (Paolucci, 1983) :

	protocole d'immunisation		total
	active (souris 1)	passive (souris A)	
nombre total de puits	864	1140	2004
nombre de puits avec des hybridomes	572	898	1470
pourcentage (%) de pousse	66,2	78,8	72,53
pourcentage (%) de puits sans hybridomes = f	33,8	21,2	
nombre moyen d'hybridomes par puits = m	1,08	1,55	
probabilité P(K) d'avoir K hybridomes par puits:			
- K=0	33,8	21,2	
- K=1	36,5 *	32,9 *	
- K=2	19,7	25,5	
- K=3	7,1	13,2	
- K=4	1,9	5,1	
- K=5	0,4	1,6	
- K=6	0,07	0,4	
- K=...			
spécificité des hybridomes après criblage:			
- ζ néoplasiques	64	63	127
- ζ normales	23	27	50
- communs	24	145	169
hybridomes confirmés après transfert en 5 ml:			
- ζ néoplasiques	6	12	18
- ζ normales	1	6	7
- communs	2	1	3

Fig. 16 : Bilan de la fusion

- * 55% (36,5/66,2) des hybridomes (immunisation active) sont préclonés
- * 42% (32,9/78,8) des hybridomes (immunisation passive) sont préclonés (ζ : cellules)

$$P(K) = 100 \cdot \frac{(-\ln(f))^K}{K!} \cdot \frac{f}{100}$$

P(K): pourcentage de puits contenant K clones différents par puits

K: nombre de clones différents par puits de culture

f: pourcentage de puits ne contenant aucun hybridome

Le pourcentage f de puits ne contenant aucun hybridome est déterminé en fonction du pourcentage de développement (Fig. 16), soit 33,2 % dans le cas de l'immunisation active et 21,2 % pour l'immunisation passive. Le pourcentage théorique de puits contenant K hybridomes par puits est calculé en faisant varier K (Fig. 16). En considérant seulement les puits contenant des hybridomes, il a été considéré que pour l'immunisation active et l'immunisation passive, respectivement 55 % et 42 % des hybridomes ont été préclonés.

La radioimmunologie a été choisie pour le criblage des hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques en raison de sa sensibilité (Boulo, 1989b). La réactivité des anticorps sécrétés par les hybridomes a été testée en parallèle vis-à-vis des hémocytes néoplasiques et des hémocytes normaux, afin de pouvoir immédiatement identifier les hybridomes strictement spécifiques des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* ou réagissant vis-à-vis des hémocytes normaux de *M. edulis*. Les anticorps ont été considérés spécifiques lorsqu'une différence de signal vis-à-vis des deux types d'hémocytes était de l'ordre de 3000 cpm. Deux criblages ont été réalisés au 13^e et 17^e jour après la fusion, en fonction du développement des hybridomes. Les résultats cumulés pour les deux séries de criblage sont présentés dans la figure 16. Les trois types d'hybridomes, identifiés selon leur spécificité, ont été respectivement :

- les hybridomes spécifiques des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* (127)
- les hybridomes spécifiques des hémocytes normaux de *M. edulis* (50)
- les hybridomes spécifiques à la fois des hémocytes normaux et néoplasiques (169)

Il est à noter que le nombre d'hybridomes spécifiques des hémocytes néoplasiques ou des hémocytes normaux obtenu après immunisation active ou après immunisation passive a été très voisin : 64 et 63 dans le premier cas et 23 et 27 dans l'autre cas. Par contre, le nombre d'hybridomes sécrétant des anticorps réagissant contre des épitopes communs aux cellules normales et néoplasiques a varié en fonction de l'immunisation : 24 hybridomes seulement ont été détectés dans le cas de l'immunisation active et 145 pour l'immunisation passive.

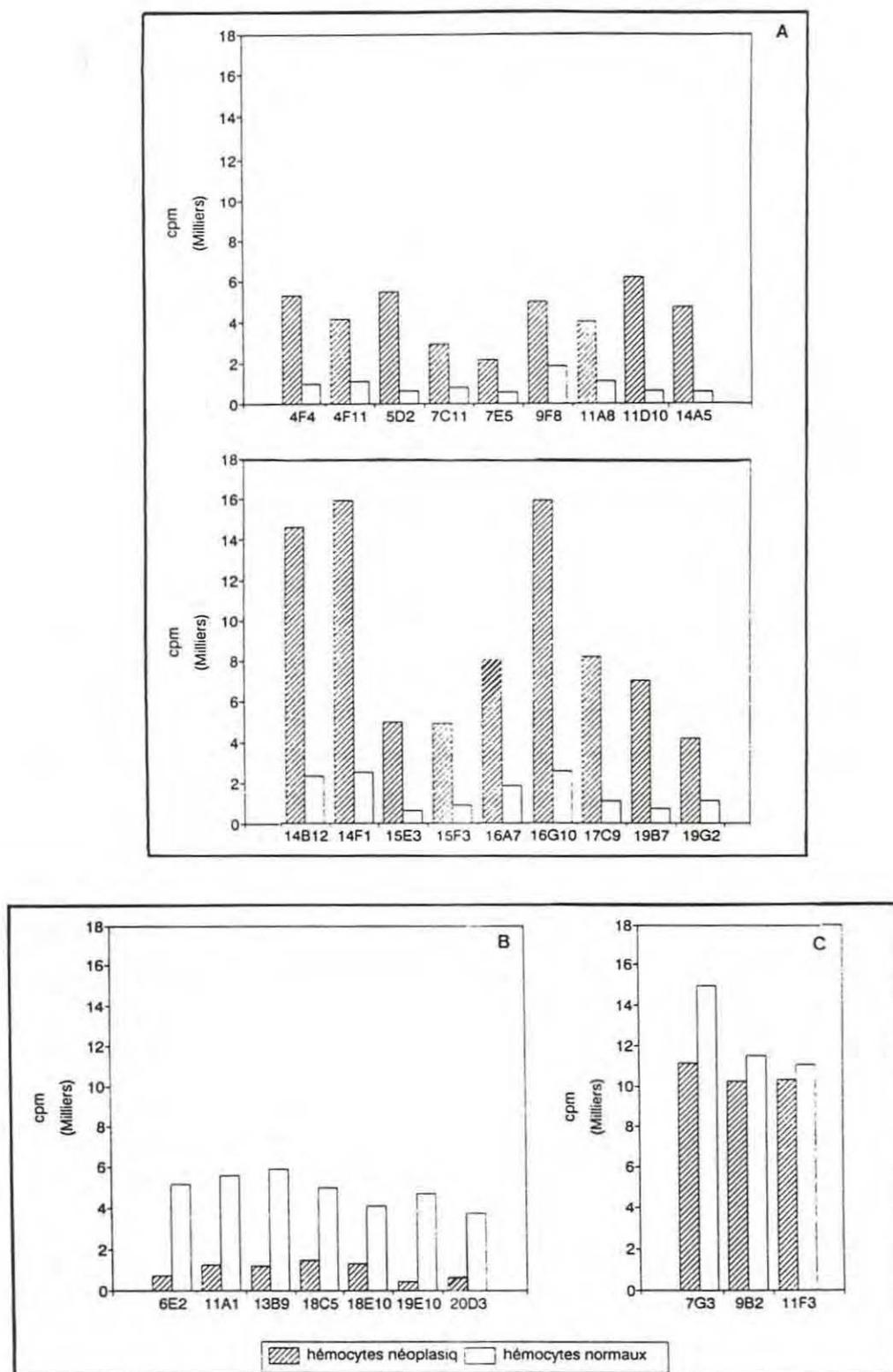


Fig. 17 : Estimation de la réactivité des anticorps présents dans les surnageants de culture des hybridomes, testée par R.I.A., vis-à-vis d'hémocytes normaux de *M. edulis* et néoplasiques
A : anticorps spécifiques des hémocytes néoplasiques
B : anticorps spécifiques des hémocytes normaux
C : anticorps spécifiques des deux types d'hémocytes

Après criblage et compte tenu du nombre élevé d'hybridomes spécifiques, seuls ceux pour lesquels les signaux RIA ont été importants, ont été transférés dans un plus grand volume de culture. L'activité de la plupart des surnageants de culture a été confirmée ultérieurement à deux reprises. A cette ultime étape, 28 hybridomes ont été sélectionnés (Fig. 16) :

- 18 hybridomes spécifiques des cellules néoplasiques (Fig. 17)
- 7 hybridomes spécifiques des hémocytes normaux (Fig. 17)
- 3 hybridomes spécifiques à la fois des cellules normales et néoplasiques (leur nombre a été volontairement réduit en raison de leur intérêt plus limité) (Fig. 17).

La réactivité relative des surnageants de culture de ces hybridomes a été estimée en RIA (Fig. 17), ces valeurs n'ayant cependant qu'une signification indicative car elles dépendent de la quantité d'anticorps présents dans le milieu de culture au moment de leur mise en évidence et du taux de croissance des cellules. Ces hybridomes ont été cryopréservés avant d'effectuer un clonage.

2.3. Clonage

Le clonage des hybridomes a été réalisé selon la méthode des dilutions limites. La technique de détection des clones sécréteurs d'anticorps spécifiques a été choisie en fonction de l'importance du signal obtenu pour chaque hybridome en RIA, avant cryopréservation (Fig. 17). Ainsi, la technique radioimmunologique a été utilisée lors du clonage des hybridomes spécifiques des hémocytes normaux qui présentaient des réponses modérées variant de 3700 à 5900 cpm (11A1, 13B9, 19E10, 20D3). Afin d'éviter les difficultés liées à la manipulation de radioisotopes (notamment l'absence d'habilitation du laboratoire de La Tremblade), la technique immunoenzymatique a été testée. La comparaison des signaux respectivement obtenus avec ces deux techniques pour des surnageants de culture identiques a montré que le test ELISA ne permet de détecter que des hybridomes à très fortes réactivités (données non présentées). Elle a donc été limitée au clonage de deux hybridomes : 14F1 et 16G10. Finalement, la technique d'immunofluorescence indirecte a été choisie pour les autres clonages d'une part, en raison de la facilité d'utilisation lorsque le nombre de clones à tester n'est pas trop élevé et d'autre part, parce qu'elle permet la visualisation directe des images de fluorescence. Les surnageants de culture de quatre hybridomes non clonés (6E2, 9F8, 16A7 et 18E10) ont été analysés ci-après et pour faciliter la lecture, le terme AcM est utilisé bien qu'il ne soit pas approprié.

Fig. 18: Résultats de clonage (nombre de clones/hybridome ; isotype des AcMs ; méthode de clonage utilisée)

spécificité des hybridomes	nom	clone	isotype	technique de clonage
<i>hémocytes néoplasiques</i>	4F4	4F4-2B1	ND	I.I.F.
		4F4-3E3	IgG1	I.I.F.
	4F11	4F11-3C7	IgG3	I.I.F.
		4F11-1G9	IgG3	I.I.F.
		4F11-1H10	IgG3	I.I.F.
	5D2	5D2-2G1	IgG1	I.I.F.
		5D2-3G8	IgG1	I.I.F.
	7C11	7C11-E4	IgG2a	I.I.F.
		7C11-C5	IgG2a	I.I.F.
	7E5	7E5-C4	IgG1	I.I.F.
	9F8	non cloné	IgG1	
	11A8	11A8-E11	IgG1	I.I.F.
		11A8-F8	IgG1	I.I.F.
	11D10	11D10-B11	IgG1	I.I.F.
		11D10-H2	IgG1	I.I.F.
	14A5	14A5-A7	IgG2a	I.I.F.
		14A5-F6	IgG2a	I.I.F.
	14B12	14B12-3G1	IgG1	I.I.F.
		14B12-3C10	IgG1	I.I.F.
		14B12-3H5	IgG1	I.I.F.
	14F1	14F1-5E9	IgG1	E.L.I.S.A.
		14F1-1C9	ND	E.L.I.S.A.
		14F1-3D11	ND	E.L.I.S.A.
	15E3	15E3-E10	IgG1	I.I.F.
	15F3	15F3-1D12	IgG3	I.I.F.
	16A7	non cloné	IgG3	
	16G10	16G10-5B9	IgG1	E.L.I.S.A.
		16G10-2B9	ND	E.L.I.S.A.
		16G10-2F6	ND	E.L.I.S.A.
		16G10-4F8	ND	E.L.I.S.A.

spécificité des hybridomes	nom	clone	isotype	technique de clonage	
<i>hémocytes néoplasiques</i>	17C9	17C9-1B9	IgG1	I.I.F.	
		17C9-2H11	IgM	I.I.F.	
	19B7	19B7-1H6	IgG1	I.I.F.	
	19G2	19G2-F2	IgG1	I.I.F.	
		19G2-H1	ND	I.I.F.	
<i>hémocytes normaux</i>	11A1	11A1-3F9	IgG2b	R.I.A.	
		11A1-2G2	IgG2h	R.I.A.	
		11A1-2F9	ND	R.I.A.	
		11A1-3G4	ND	R.I.A.	
	13B9	13B9-2F8	IgG1	R.I.A.	
		13B9-2E6	IgG1	R.I.A.	
		13B9-2D3	IgG1	R.I.A.	
	19E10	19E10-3C4	IgG1	R.I.A.	
		19E10-3F11	ND	R.I.A.	
		19E10-5D2	IgG1	R.I.A.	
	20D3	20D3-3B4	IgG2a	R.I.A.	
		20D3-2G2	IgG2a	R.I.A.	
	18C5	18C5-H10	IgG1	I.I.F.	
	6E2	non cloné	IgG1		
	18E10	non cloné	IgM		
<i>communs</i>	7G3	7G3-1E9	IgG1	I.I.F.	
		9B2	9B2-2E9	IgG1	I.I.F.
		11F3	11F3-3D4	IgG1	I.I.F.
11F3-4H3	ND		I.I.F.		
11F3-5E11	ND		I.I.F.		

Les résultats des clonages sont présentés dans la figure 18. Un à quatre clones ont été conservés pour chaque hybridome et produits en grands volumes de manière à obtenir dans les surnageants de culture des anticorps en quantité suffisante pour leur caractérisation. Deux hybridomes spécifiques des hémocytes néoplasiques (14F1-5E9 et 16G10-5B9) ont été inoculés à des souris pour une production plus importante des anticorps en liquide d'ascite. Ces anticorps ont été ensuite purifiés par chromatographie d'affinité et une quantité de 150 mg a été recueillie pour chacun.

2.4. Isotypage

Les classes et sous-classes des AcMs ont été déterminées à partir de surnageants de culture. Ils appartiennent à la famille des IgM ou IgG et pour cette dernière, les différentes sous-classes sont représentées (Fig. 18).

3. CARACTERISATION DES AcMs SPECIFIQUES DES HEMOCYTES NORMAUX

3.1. Spécificité des anticorps monoclonaux

La technique d'immunofluorescence indirecte a été utilisée pour préciser la spécificité cellulaire des anticorps monoclonaux. Tous les AcMs sélectionnés pour leur réactivité vis-à-vis des hémocytes normaux de *M. edulis* ont produit des images de fluorescence verte intense alors que des anticorps témoins donnent des résultats négatifs. Après incubation avec des hémocytes néoplasiques, ces AcMs ne donnent aucune réaction, seule la fluorescence native rouge des cellules pouvant être observée. Selon les AcMs, des profils d'immunoréactivité différents ont été mis en évidence, l'intensité et le pourcentage de cellules fluorescentes variant (Fig. 19A1, A2, A3, A4).

La spécificité de ces AcMs a également été étudiée vis-à-vis des hémocytes d'autres espèces de Mytilidae et d'autres Mollusques bivalves (cf paragraphe 3.6).

3.2. Profils de marquage obtenus par la technique d'immunoperoxydase indirecte

La caractérisation des épitopes a été entreprise par la technique d'immunoperoxydase indirecte par complémentarité avec la technique

Fig. 19 : Immunoréactivité de quelques anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes de *M. edulis*

A- Profils d'immunofluorescence (X 82,5 et X 1000). Noter la fluorescence verte plus ou moins intense des hémocytes positifs.

B- Profils d'immunoperoxydase (X 400). La réaction positive est visualisée par une coloration marron plus ou moins intense au niveau des hémocytes (contre-coloration à l'hématoxyline-éosine)

- 1. anticorps de classe I (13B9-2F8), spécifique des granulocytes basophiles**
- 2. anticorps de classe II (18C5-3H10)**
- 3. anticorps de classe III (11A1-2G2)**
- 4. anticorps de classe IV (20D3-3B4)**

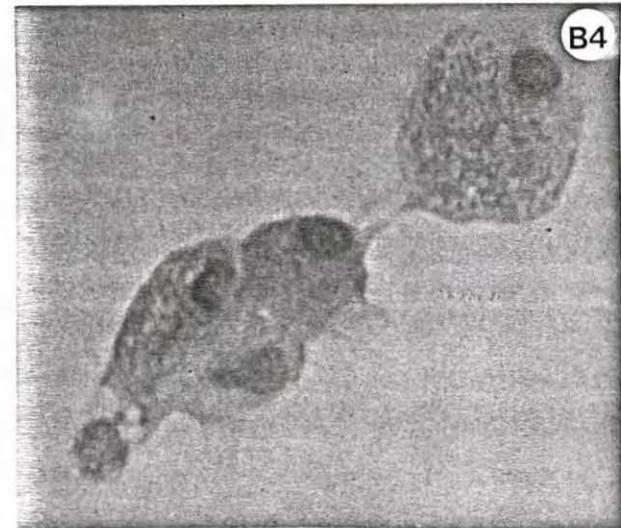
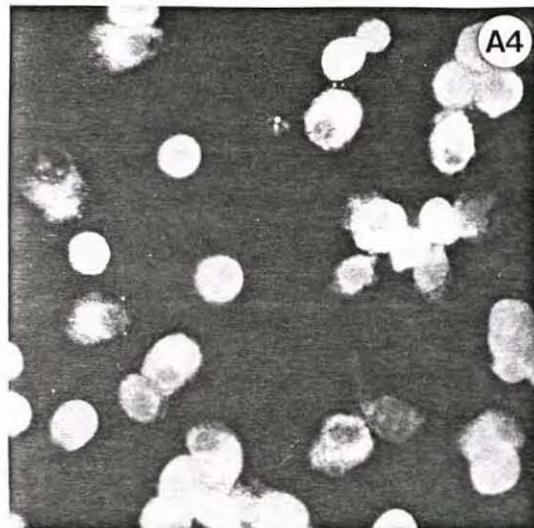
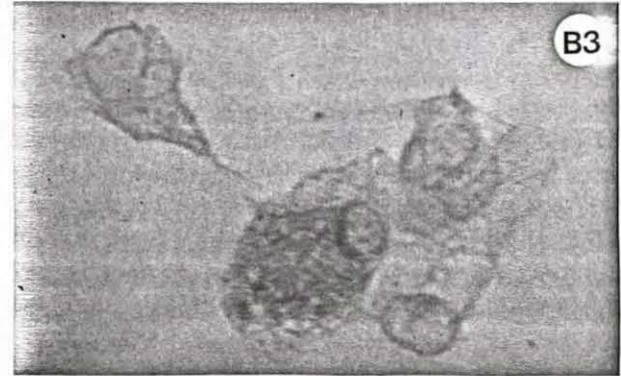
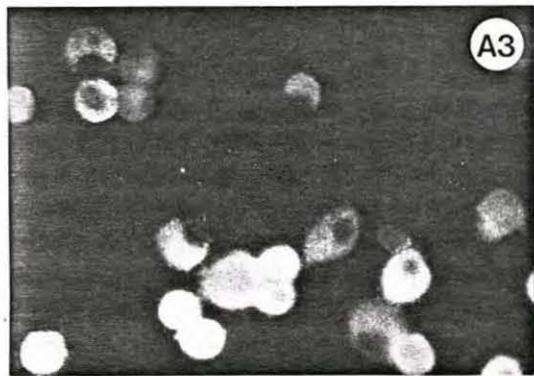
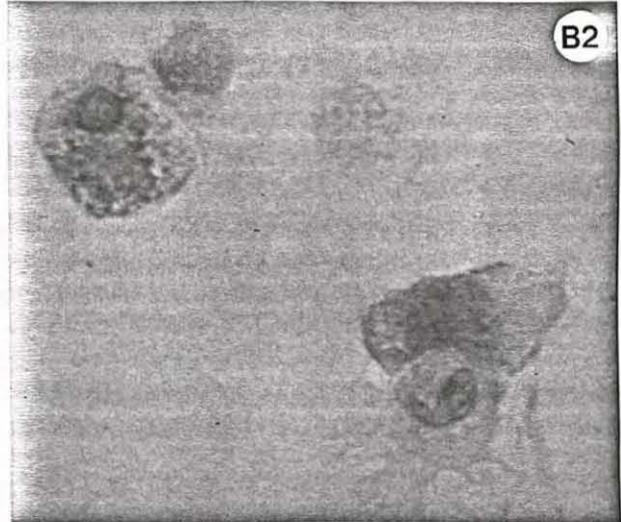
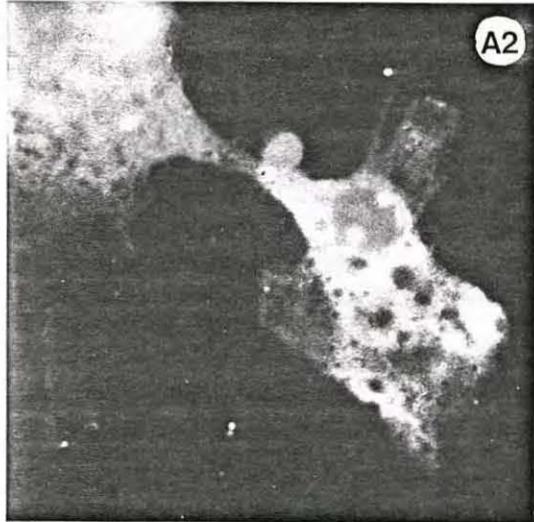
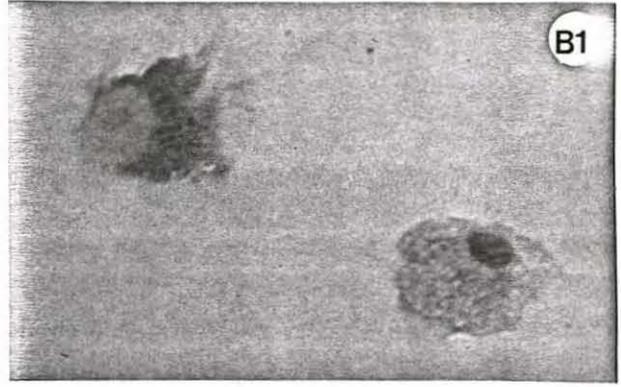
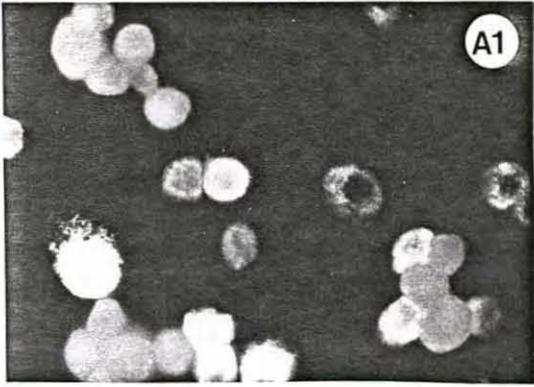
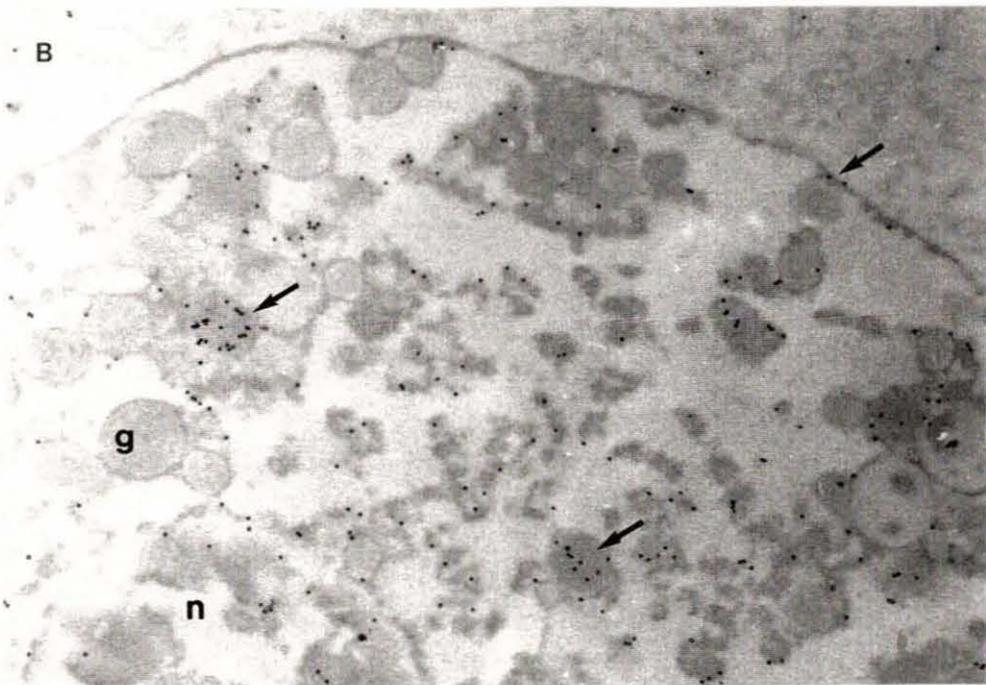
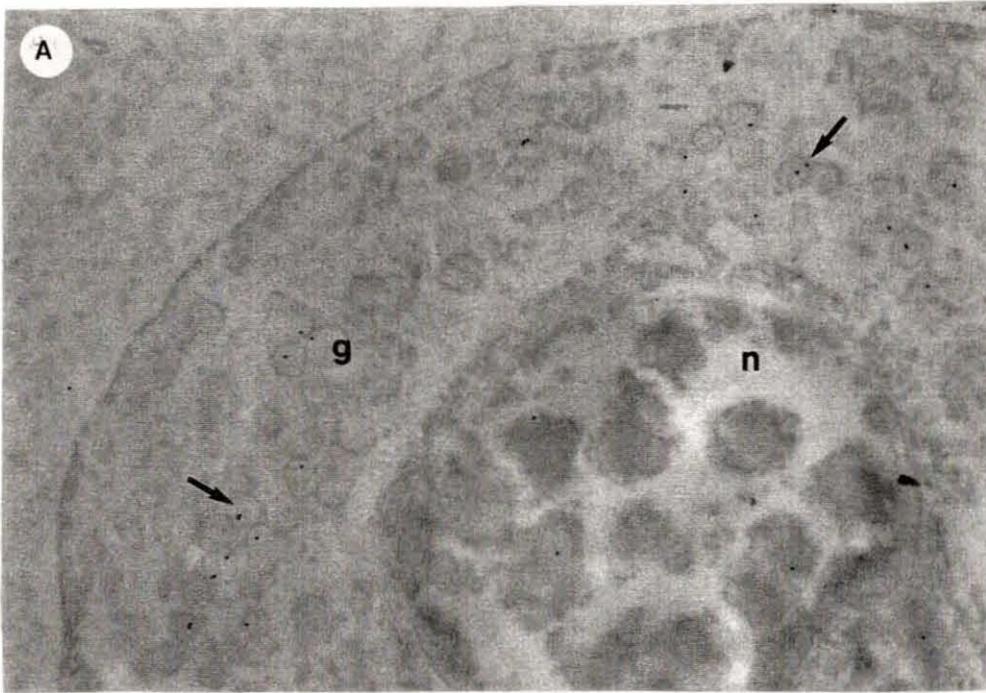


Fig. 20 : Profils d'immunomarquage à l'or colloïdal obtenus avec deux anticorps spécifiques des hémocytes de *M. edulis* (X 14400), en microscopie électronique. Les coupes ne sont pas contrastées.

A : anticorps monoclonal de classe I (13B9-2F8), les billes d'or sont localisées au niveau des granules des granulocytes à petits granules (→)

B : anticorps monoclonal de classe III (18E10), le marquage est situé au niveau des granules et de la membrane des deux types de granulocytes (→)



d'immunofluorescence indirecte, car elle permet une meilleure identification des différents types cellulaires. Sur la base des profils de marquages obtenus par la technique d'immunoperoxydase indirecte et du pourcentage de cellules reconnues, quatre classes d'AcMs ont été définies.

Seuls les granulocytes basophiles (environ 70% des cellules totales) sont reconnus par l'AcM 13B9-2F8, unique représentant de la classe I. Il colore spécifiquement les granules de ces cellules (Fig. 19B1).

Un profil de marquage similaire est obtenu avec les AcMs regroupés dans la classe II (18C5-3H10 et 19E10-3C4) : la majorité des cellules (environ 90% de la population totale) est fortement colorée en marron. La coloration se localise au niveau du cytoplasme des hémocytes basophiles et sur la périphérie des granulocytes éosinophiles (Fig. 19B2).

Les anticorps de la classe III : 11A1-2G2 et 18E10 réagissent faiblement au niveau du cytoplasme des deux types de granulocytes (basophiles et éosinophiles) : 30 % des cellules totales sont colorées avec l'AcM 11A1-2G2 et 20 % avec l'AcM 18E10 (Fig. 19B3).

Les AcMs 20D3-3D4 et 6E2, appartenant à la classe IV, réagissent uniformément sur le cytoplasme des deux types de granulocytes (approximativement 80% de la totalité des cellules). Cependant, alors que tous les granulocytes éosinophiles semblent colorés, les granulocytes basophiles présentent des intensités de coloration variables (Fig. 19B4).

Aucun anticorps monoclonal ne réagit avec les hyalinocytes.

3.3. Localisation ultrastructurale des épitopes

La localisation ultrastructurale des épitopes a été déterminée en microscopie électronique après un immunomarquage à l'or colloïdal en utilisant une méthode de "post-embedding".

Le marquage à l'or colloïdal avec l'AcM 13B9-2F8 est situé uniquement au niveau des granules des granulocytes à petits granules (Fig. 20A).

Quel que soit le type de granulocyte, la localisation des particules d'or est observée sur les granules avec l'anticorps 11A1-2G2 et sur les granules et les membranes avec l'anticorps 18E10 (Fig. 20B).

Les billes d'or sont localisées au niveau du cytoplasme des deux types de granulocytes avec les AcMs 19E10-3C4 et 18C5-3H10, sans association particulière avec des organites. Le marquage est cependant plus faible avec l'anticorps 19E10-3C4.

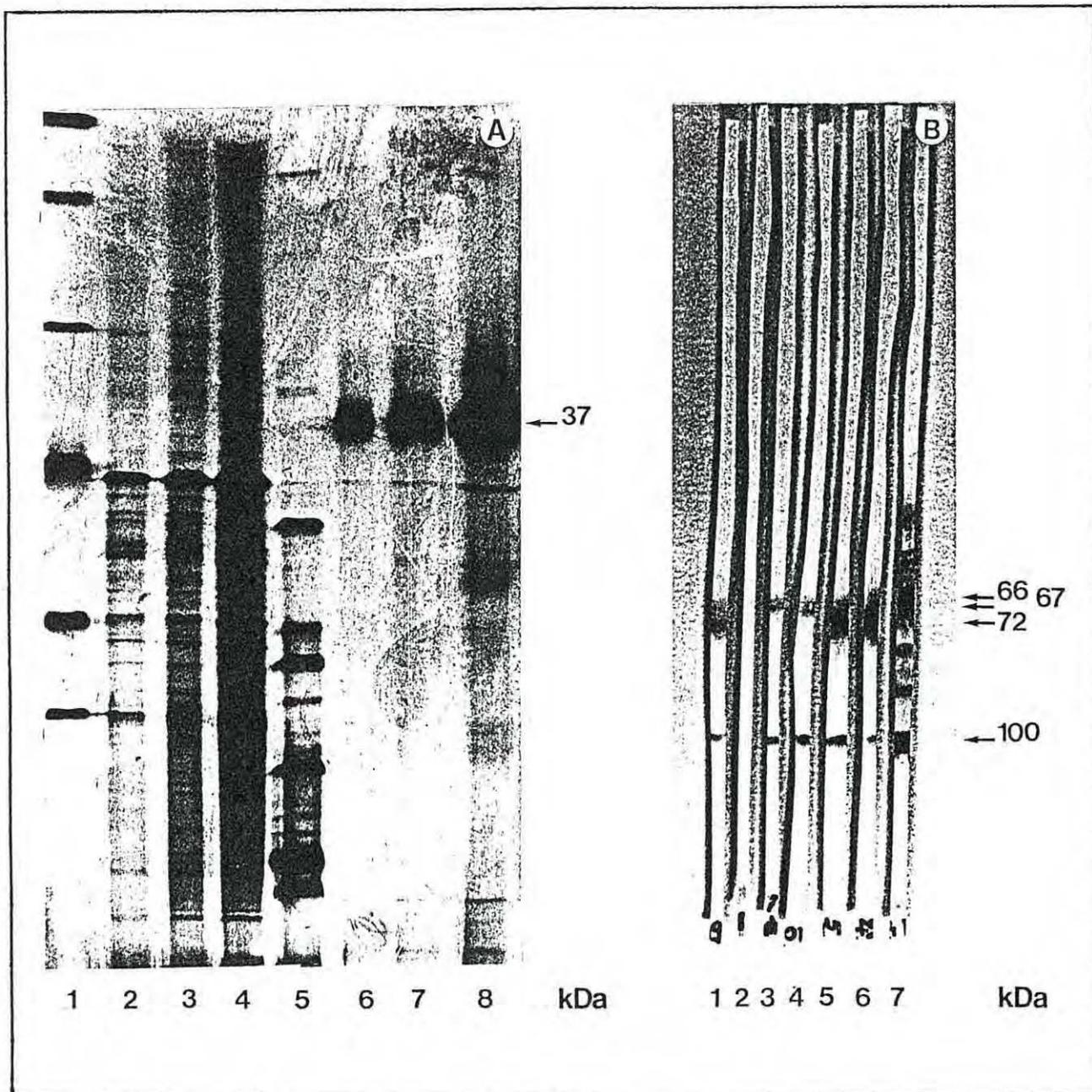


Fig. 21 : A- Profil électrophorétique en gel SDS-PAGE 7,5-20 % des protéines des hémocytes et de l'hémolymphe de *M. edulis*

1 : Marqueurs de faibles poids moléculaire;

2, 3, 4 : 10, 20, 50 µg de protéines totales des hémocytes;

5 : Marqueurs de haut poids moléculaire;

6, 7, 8 : 10, 20, 50 µg de protéines totales d'hémolymphe

B- Western blot

1, 2 : AcMs de classe IV (6E2, 20D3-3B4)

3, 4 : AcMs de classe III (18E10, 11A1-2G2)

5, 6 : AcMs de classe II (18C5-3H10, 19E10-3C4)

7 : AcM de classe I (13B9-2F8)

Les AcMs 20D3-3B4 et 6E2 réagissent également au niveau du cytoplasme des deux types de granulocytes mais différentes intensités de marquage peuvent être observées. Ainsi, certains granulocytes ne sont pas reconnus alors que d'autres sont fortement marqués par les billes d'or.

3.4. Détermination des poids moléculaires des protéines reconnues par les anticorps monoclonaux

3.4.1. Séparation électrophorétique des protéines des hémocytes et de l'hémolymphe

La séparation électrophorétique des protéines de l'hémolymphe a révélé une protéine prédominante à 37 kDa (Fig. 21A, n° 6, 7, 8). La nature majoritaire et la taille de cette protéine suggèrent qu'elle puisse correspondre à une protéine de type hémocyanine, bien que le poids moléculaire de ce type de protéine, chez les Mollusques gastéropodes, soit de l'ordre de 50 kDa (van Holde and Miller, 1982). Le profil électrophorétique des protéines d'hémocytes est riche et de nombreuses bandes sont observées (Fig. 21A, n° 2, 3, 4).

3.4.2. Western blotting

L'anticorps de classe I reconnaît deux groupes de protéines de poids moléculaires respectifs : 100 et 66 kDa ; les autres bandes minoritaires observées correspondent à une fixation non spécifique et ont été éliminées dans des conditions plus stringentes (Fig. 21B, n° 7). Les AcMs de classe II (Fig. 21B, n° 1) et de classe IV (Fig. 21B, n° 5, 6) détectent une protéine de poids moléculaire de 72 kDa. La réaction avec la bande à 100 kDa également observée avec ces anticorps et ceux de la classe III n'est pas spécifique car la fixation a été éliminée avec un lavage plus stringent (données non présentées). Enfin, les anticorps monoclonaux de classe III réagissent avec une protéine de 67 kDa (Fig. 21B, n° 3, 4).

La figure 22 propose une classification des AcMs en fonction de leur réactivité sur les hémocytes de *M. edulis* et résume les résultats obtenus par les techniques d'immunomarquage et de "Western blot".

classe	anticorps monoclonal	% de cellules colorées (*)	type (*) morphologique	localisation (**) ultrastructurale	poids moléculaire
I	13B9-2F8	70 %	granulocytes basophiles (+++)	granules (++)	100 et 66 kDa
II	19E10-3C4	90 %	granulocytes (+++)	cytoplasme (+)	72 kDa
	18C5-H10	91 %	granulocytes (+++)	cytoplasme (+++)	72 kDa
III	11A1-2G2	30 %	granulocytes (+)	granules (+)	67 kDa
	18E10	20 %	granulocytes (+)	membranes et granules (++)	67 kDa
IV	20D3-3B4	72 %	granulocytes (de - à +++)	cytoplasme (de - à +++)	ND
	6E2	84 %	granulocytes (de - à +++)	cytoplasme (de - à +++)	72 kDa

Fig. 22 : Classification des anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes normaux de *M. edulis*, en fonction du type morphologique et du pourcentage reconnu (marquage immunoperoxydase : *), de la localisation des épitopes (marquage à l'or colloïdal : **) et du poids moléculaire des protéines reconnues *

(-) : pas de marquage
 (+) : faible marquage
 (++) : marquage modéré
 (+++) : fort marquage

espèce AcM (classe)	<i>edulis</i>	<i>trossulus</i>	<i>galloprovincialis</i>	<i>californiensis</i>
13B9-2D3 (I)	+++ (50%)	+++ (50%)	+++ (50%)	+++ (20%)
18C5-H10 (II)	++ (90%)	++ (90%)	+ (60%)	++ (60%)
11A1-2G2 (III)	+++ (90%)	+++ (90%)	++ (80%)	ND
20D3-3B4 (IV)	++ (90%)	++ (90%)	++ (90%)	++ (50%)

Fig. 23 : Immunoréactivité de quelques AcMs spécifiques des hémocytes normaux de *M. edulis* vis-à-vis des hémocytes d'autres espèces de Mytilidae, testée par I.I.F.
 (+ à +++ : intensité variable de fluorescence ; ND : non déterminé ; entre parenthèses : % de cellules positives)

classe	anticorps	<i>M. edulis</i>	<i>C. gigas</i>	<i>O. edulis</i>	<i>T. philippinarum</i>	<i>R. decussatus</i>	<i>P. maximus</i>
I	13B9-2F8	+++	-	-	-	-	-
II	19E10-3C4	+++	-	-	-	-	+++
	18C5-3H10	++	-	-	-	-	++
III	11A1-2G2	+++	-	-	-	-	-
	18E10	+++	-	-	-	-	-
IV	20D3-3B4	++	-	-	-	-	-
	6E2	+++	-	-	-	-	++

Fig. 24 : Immunoréactivité des AcMs spécifiques des hémocytes normaux de *M. edulis* vis-à-vis des hémocytes d'autres espèces de Mollusques bivalves, testée par I.I.F.
 (- : réaction négative ; + à +++ : réaction positive d'intensité variable)

localisation ploïdie hybridome	Willapa bay 2n	Sequim bay 5n	Penn Cove 5n	Port Argeles 5n	Sequim bay 4n	Port Argeles 4n
14B12-3H5	-	+++	+++	±	±	-
14F1-5E9	-	+++	+++	±	±	-
16A7	-	+++	+++	±	±	-
16G10-5B9	-	+++	+++	±	±	-
4F11-1H10	-	++	++	±	±	±
17C9-1B9	-	+++	+++	±	±	±
7G3	+++	+++	+++	+++	+++	+++
9B2-2E9	+++	+++	+++	+++	+++	+++
11F3-3D4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
autres	-	-	-	-	-	-

Fig. 25 : Réactivité des anticorps monoclonaux sur des hémocytes néoplasiques de *Mytilus trossulus* de ploïdie et de localisation différentes, déterminée par I.I.F. sur coupes paraffine
 (+++ et ++): fluorescence verte intense
 (±): fluorescence sur quelques cellules
 (-): pas de fluorescence

3.5. Spécificité des AcMs dirigés contre les hémocytes normaux de *M. edulis*

3.5.1. Immunoréactivité des AcMs vis-à-vis des hémocytes d'autres espèces de Mytilidae

La réactivité des AcMs spécifiques des hémocytes normaux de *M. edulis* a été testée, par IIF, vis-à-vis des hémocytes de trois autres espèces de Mytilidae : *M. galloprovincialis*, espèce cultivée sur les côtes européennes et *M. trossulus* et *M. californiensis*, espèces présentes sur la côte ouest des Etats-Unis. Pour tous les AcMs testés et les trois espèces de *Mytilus* étudiées, une immunoréactivité a été observée, les profils de fluorescence étant parfois légèrement différents (Fig. 23).

3.5.2. Immunoréactivité des AcMs vis-à-vis des hémocytes de différents Mollusques bivalves

L'immunoréactivité des anticorps monoclonaux vis-à-vis des hémocytes de différents Mollusques bivalves a été testée selon la technique d'immunofluorescence indirecte. Des réactions négatives ont été obtenues, quel que soit l'anticorps utilisé, avec les deux espèces d'huitres *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis* et les deux espèces de palourdes *Ruditapes philippinarum* et *Ruditapes decussatus* (Fig. 24). Par contre, trois AcMs (19E10-3C4, 18C5-3H10 et 6E2) ont donné de nettes images de fluorescence avec les hémocytes de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*.

4. CARACTERISATION DES AcMs SPECIFIQUES DES HEMOCYTES NEOPLASIQUES OU REAGISSANT VIS-A-VIS DES HEMOCYTES NEOPLASIQUES ET NORMAUX

4.1. Spécificité des anticorps monoclonaux en fonction de la ploïdie des hémocytes néoplasiques ou de la localisation des moules *M. trossulus*

4.1.1. Immunoréactivité des AcMs testée sur coupes paraffine

Les hémolymphe de moules *M. trossulus* originaires de différentes localités du Puget Sound ont été prélevées et le contenu en ADN des hémocytes néoplasiques a été déterminé par cytométrie de flux (Elston *et al.*, 1990). Le degré de ploïdie des hémocytes a été estimé à 4n ou à 5n, aucun échantillon ne présentait en mélange les deux types

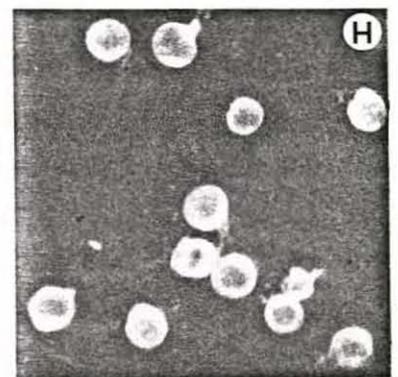
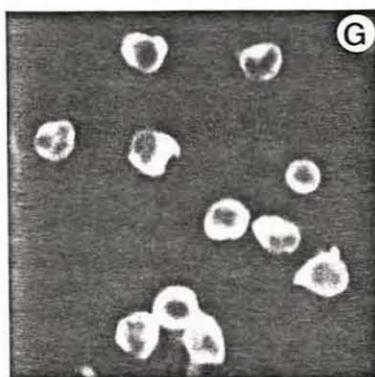
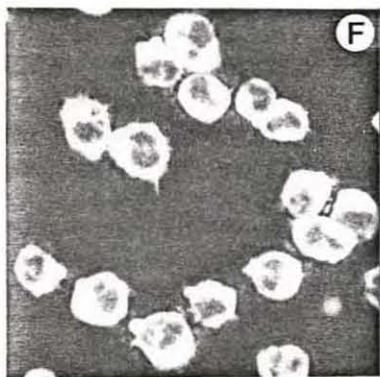
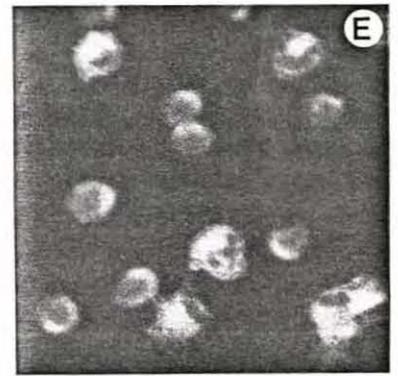
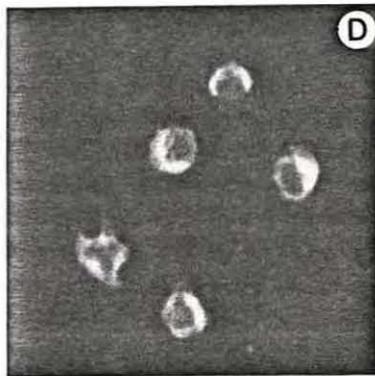
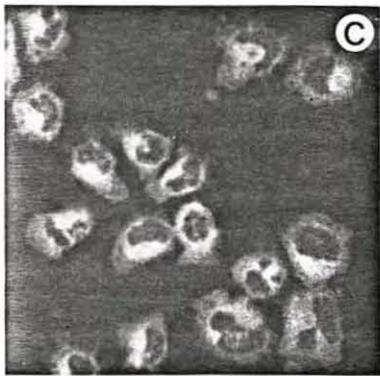
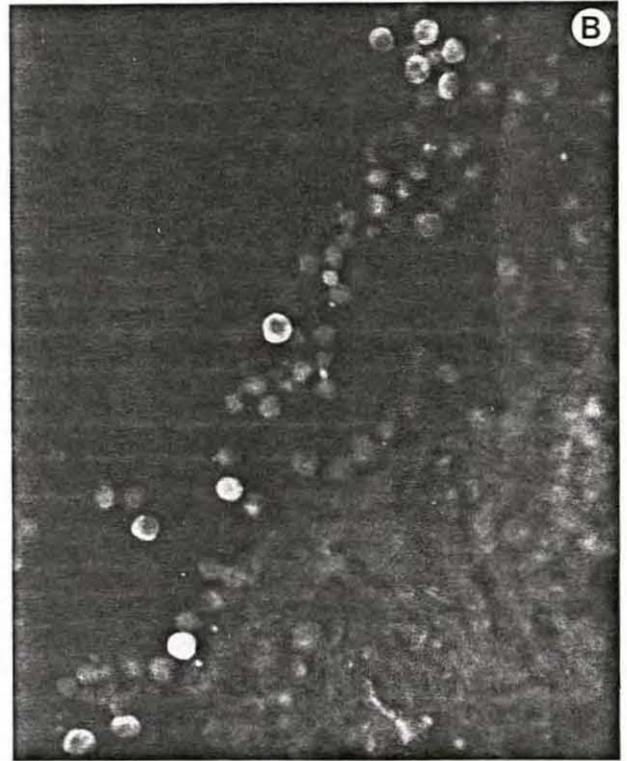
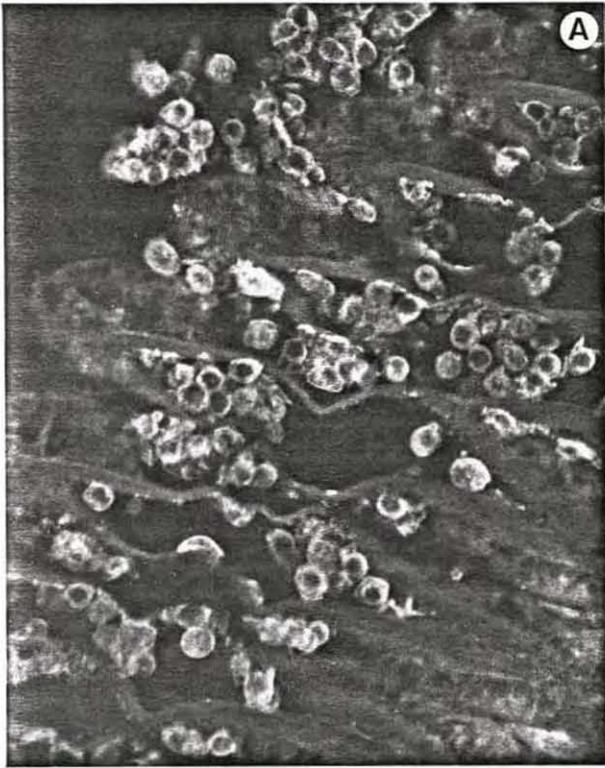
Fig. 26 : Profils d'immunofluorescence (X 82,5) de quelques AcMs spécifiques des hémocytes néoplasiques ou normaux de *M. trossulus*. Noter la fluorescence verte au niveau des hémocytes néoplasiques positifs.

A : AcM de classe B (14B12-3H5) sur une coupe paraffine d'une moule de Sequim Bay (5n)

B : AcM de classe B (4F11-1H10) sur une coupe paraffine d'une moule de Port Argelès (5n)

C, D, E : AcM de classe C (19B7-1H6) sur des cytocentrifugations d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* de ploïdie estimée à 4n (C), 4/5n (D), 5n (E)

F, G, H : AcM de classe D (15F3-1D12) sur des cytocentrifugations d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* de ploïdie estimée à 4n (F), 5n (G), 4/5n (H)



d'hémocytes polyploïdes. Les tissus de ces moules ont été ensuite traités pour tester en IIF la réactivité des 18 anticorps monoclonaux spécifiques (Fig. 25). Des résultats négatifs ont été obtenus avec plusieurs anticorps, l'antigénicité ayant été probablement altérée par les traitements successifs avec divers solvants et/ou la chaleur (température de fusion de la paraffine : 60°C). Par contre, six anticorps ont montré des réactions similaires et intensément positives sur tous les hémocytes 5n d'animaux provenant de Sequim Bay (Fig. 26A) ou de Penn Cove et sur quelques cellules parmi les hémocytes néoplasiques 5n de moules originaires de Port Argeles (Fig. 26B). Une fluorescence a également été observée sur très peu d'hémocytes 4n d'individus issus de Sequim Bay avec les AcMs 14B12-3H5, 14F1-5E9, 16A7 et 16G10-5B9. Les AcMs 4F11-1H10 et 17C9-1B9 ont réagi avec un petit nombre d'hémocytes 4n provenant des deux localisations testées.

Les trois anticorps qui réagissent à la fois sur des hémocytes normaux et néoplasiques de *M. trossulus* et les hémocytes normaux de *M. edulis* (7G3, 9B2-2E9, 11F3-3D4), ont donné des réponses intensément positives et identiques sur tous les échantillons testés.

4.2.2. Réactivité des AcMs testée sur des hémocytes préparés par cytocentrifugation

Etant donné la perte d'antigénicité observée consécutivement aux étapes de préparation histologique (fixation, inclusion), l'immunoréactivité des AcMs a été testée préférentiellement sur des hémocytes cytocentrifugés immédiatement après leur ponction, puis fixés 10 min dans de l'acétone. Ainsi, les hémolymphes d'une dizaine d'individus (*M. trossulus*) fortement malades ont été prélevées et la ploïdie de ces hémocytes a été estimée par rapport à la réactivité de l'anticorps 14F1-5E9.

Trois types de réponses ont été obtenues :

- toutes les cellules présentent une fluorescence verte intense, elles sont assimilées à des cellules 5n.
- un petit nombre de cellules sont faiblement fluorescentes, la ploïdie ne peut pas être évaluée.
- aucune réaction de fluorescence n'est observée ; ces cellules, morphologiquement néoplasiques, pourraient avoir un degré de ploïdie 4n.

Selon l'immunoréactivité des AcMs (Fig. 27), quatre classes d'anticorps ont été définies :

espèce	<i>Mytilus edulis</i>		<i>Mytilus trossulus</i>		
ploïdie hybridome	2n	2n	4n	5n	4/5n
	témoin	témoin	(14F1 -)	(14F1 +)	(14F1 ±)
classe A					
7C11-C5	-	-	++	-	-
7E5-C4	-	-	+	-	-
14A5-A7	-	-	++	-	-
classe B					
14B12-3H5	-	-	-	+++	± (1%)
14F1-5E9	-	-	-	+++	± (1%)
16A7	-	-	-	+++	± (1%)
16G10-5B9	-	-	-	+++	± (1%)
4F11-1H10	-	-	-	+++	± (1%)
17C9-1B9	-	-	-	+++	± (1%)
classe C					
4F4-3E3	-	+	++	+	++ (20%)
5D2-2G1	-	+	++	+	++ (20%)
9F8	-	ND	+	+	+
11A8-F8	-	+	++	+	++ (20%)
11D10-H2	-	+	++	+	++ (20%)
19B7-1H6	-	+	++	+	++ (20%)
19G2-F2	-	+	++	+	++ (20%)
classe D					
15E3-E10	-	+++	+++	+++	+++
15F3-1D12	-	+++	+++	+++	+++
classe "communs"					
7G3-1E9	+++	+++	+++	± (1%)	+++
9B2-2E9	+++	+++	+++	± (1%)	+++
11F3-3D4	+++	+++	+++	± (1%)	+++

Fig. 27 : Réactivité des anticorps monoclonaux sur des cytocentrifugations d'hémocytes normaux (2n) de *M. edulis* et sur des hémocytes normaux (2n) et néoplasiques (4n, 4/5n, 5n) de *M. trossulus* dont la ploïdie a été déterminée en fonction de leur réactivité avec l'AcM 14F1-5E9

- : réaction négative

± : réaction positive sur quelques cellules (entre parenthèses, le nombre de cellules qui réagit avec les AcMs indiqués)

+ à +++: réaction positive d'intensité variable

- La classe A regroupe les anticorps 7C11-C5, 7E5-E4 et 14A5-A7 qui réagissent exclusivement avec des hémocytes néoplasiques probablement tétraploïdes.
- La classe B comprend les six AcMs précédemment définis (paragraphe 4.2.1.).

Ces deux classes correspondent aux anticorps monoclonaux qui sont réellement spécifiques des hémocytes néoplasiques.

- La classe C rassemble des AcMs (4F4-3E3, 5D2-2G1, 9F8, 11A8-F8, 11D10-H2, 19B7-1H6 et 19G2-F2) qui réagissent à des degrés divers sur les hémocytes normaux et néoplasiques (4n et 5n) des moules *M. trossulus* (Fig. 26C, D, E).
- La classe D réunit deux anticorps (15E3-E10 et 15F3-1D12) qui présentent des réactions fortement positives sur tous les types d'hémocytes testés, exceptés les hémocytes normaux de *M. edulis* (Fig. 26F, G, H).

Ces deux classes semblent donc présenter une spécificité d'espèce plutôt qu'une spécificité de "pathologie", l'immunisation ayant été réalisée avec des hémolymphes néoplasiques provenant de *M. trossulus*.

- La classe "communs", enfin, regroupe les trois anticorps (7G3, 9B2-2E9, 11F3-3D4) réagissant avec des épitopes communs aux hémocytes des deux espèces de Mytilidae.

4.3. Localisation ultrastructurale des épitopes

4.3.1. Comparaison des techniques de "pre-embedding" et de "post-embedding"

La localisation des épitopes reconnus par les AcMs 14F1-5E9 et 16G10-5B9 a été déterminée après préparation des échantillons d'hémolymphe selon deux techniques. Ces anticorps ont été choisis car ils ont été purifiés et leur concentration a été déterminée, ce qui permet des comparaisons fiables entre les deux techniques. Le "pre-embedding" consiste à réaliser la réaction immunologique en incubant les hémocytes avec la suspension d'anticorps, puis à traiter les cellules pour la microscopie électronique. Le "post-embedding" permet d'effectuer l'immunomarquage directement sur les coupes d'échantillons déjà préparées.

Bien que le marquage avec la technique de "pre-embedding" a évité un marquage non spécifique sur la résine, il est resté assez faible et localisé essentiellement au

Fig. 28 : Comparaison des profils d'immunomarquage à l'or colloïdal (→) sur des hémocytes néoplasiques 5n de *M. trosculus*, en ultrastructure. Les échantillons ont été préparés selon la technique de "pre-embedding" (les coupes sont post-fixées à l'acide osmique et contrastées à l'acétate d'uranyl aqueux et au citrate de plomb) ou de "post-embedding" (les coupes ne sont pas contrastées) (N : noyau ; n : nucléole)

A1 : immunoréactivité de l'anticorps 14F1-5E9

("pre-embedding") (X 25000)

A2 : immunoréactivité de l'anticorps 14F1-5E9

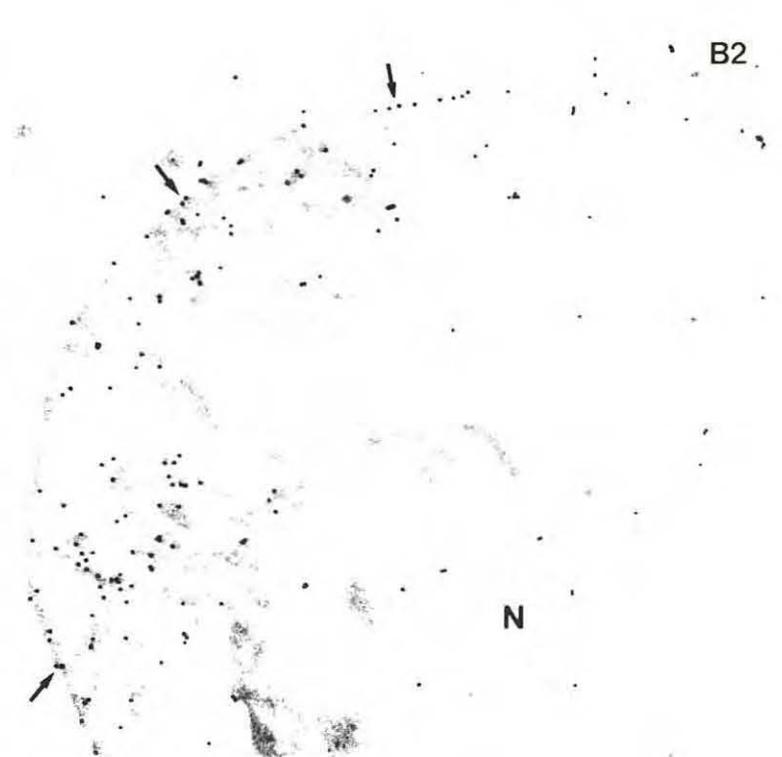
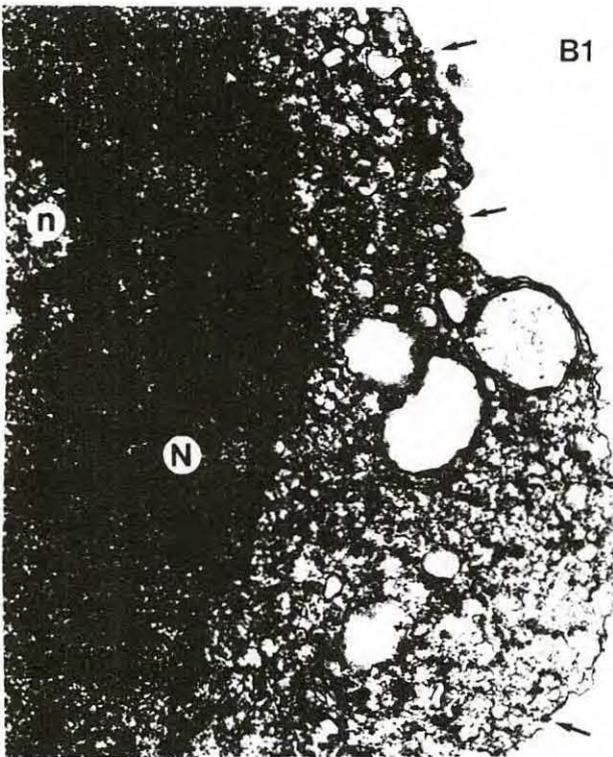
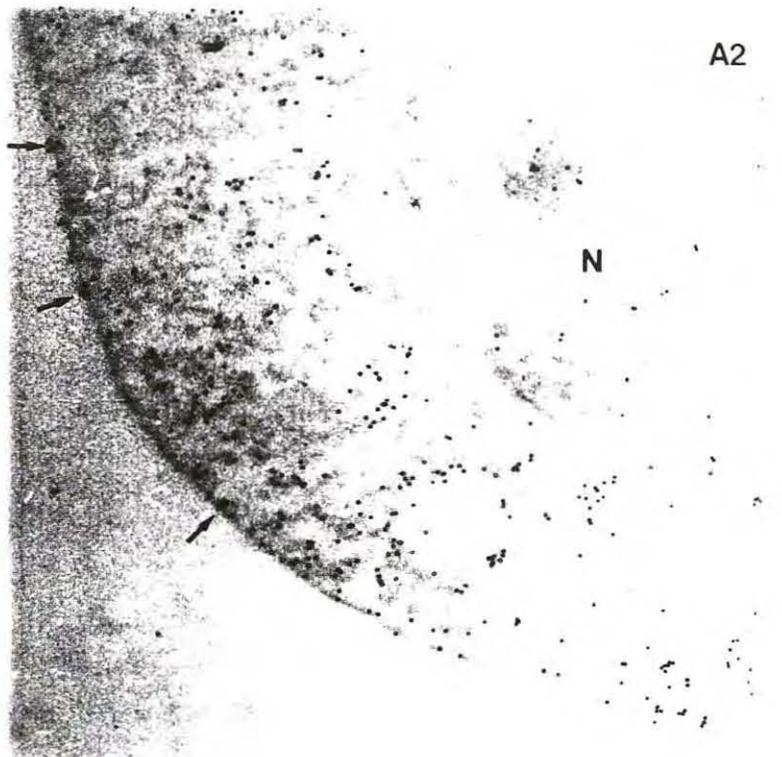
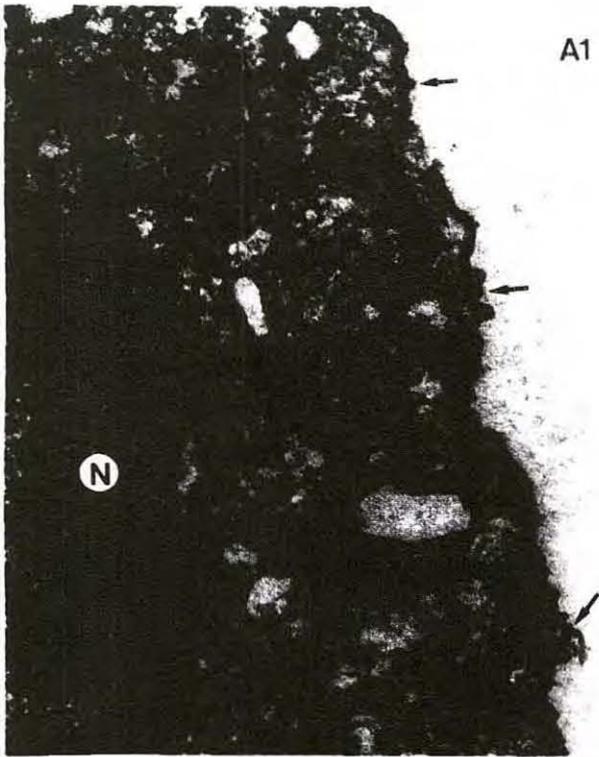
("post- embedding") (X 17300)

B1 : immunoréactivité de l'anticorps 16G10-5B9

("pre-embedding") (X 25000)

B2 : immunoréactivité de l'anticorps 16G10-5B9

("post-embedding") (X 17300)



hybridome	immunomarquage (intensité/localisation)	
	sur hémocytes 4n (14F1 -)	sur hémocytes 5n (14F1 +)
classe A		
7C11-C5	++/ <u>noyau</u> -cytoplasme	
7E5-E4	+/ <u>noyau</u> -cytoplasme	
14A5-A7	ND	
classe B		
14B12-3H5		+++/ <u>membrane plasmique</u> -cytoplasme
14F1-5E9		+++/ <u>membrane plasmique</u> -membranes d'organites
16A7		++/ <u>membrane plasmique</u> -cytoplasme
16G10-5B9		++/ <u>membrane plasmique</u> -cytoplasme
4F11-1H10		+/ cytoplasme & membrane
17C9-2H11		+/ noyau et cytoplasme
classe C		
4F4-3E3	++/ <u>noyau</u>	++/ <u>noyau</u> -cytoplasme
5D2-2G1	++/ <u>noyau</u> -cytoplasme	++/ <u>noyau</u> -cytoplasme
9F8	++/ <u>noyau</u>	++/ <u>noyau</u>
11A8-F8	++/ <u>cytoplasme</u> -noyau	++/ noyau-cytoplasme
11D10-H2	++/ <u>noyau</u> -cytoplasme	++/ <u>noyau</u> -cytoplasme
19B7-1H6	+/ noyau-cytoplasme	+/ noyau-cytoplasme
19G2-F2	++/ <u>noyau (membrane)</u> -cytoplasme	++/ <u>noyau (membrane)</u> cytoplasme
classe D		
15E3-E10	+/ noyau-cytoplasme	+/ noyau-cytoplasme
15F3-1D12	+/ cytoplasme	+/ cytoplasme
classe "communs"		
7G3	++/ <u>membrane</u> -cytoplasme	pas de marquage
9B2-2E9	++/ <u>membrane</u> -cytoplasme	pas de marquage
11F3-3D4	+++/ <u>membrane</u> -cytoplasme	pas de marquage

Fig. 29 : Localisation ultrastructurale, au niveau des hémocytes 4n ou 5n de *M. trossulus*, des épitopes reconnus par les AcMs spécifiques des hémocytes néoplasiques ou normaux de *M. trossulus* et "communs". Evaluation de l'intensité d'immunomarquage à l'or colloïdal (+ à +++ : densité de plus en plus importante de billes d'or)

niveau de la membrane plasmique des hémocytes, quel que soit l'anticorps testé (Fig. 28A1, B1). Par contre, la technique de "post-embedding" a permis un marquage beaucoup plus intense qui n'a pas été limité à la membrane plasmique puisqu'il a permis aux anticorps d'accéder à des épitopes intracellulaires (Fig. 28A2, B2). L'intensité de marquage a pu être comparée car les deux anticorps ont été utilisés à la même concentration dans les deux expériences.

Cette dernière technique a donc été choisie pour la localisation des sites antigéniques réagissant avec les autres AcMs.

4.3.2. Localisation des sites antigéniques par la technique de "post-embedding"

Des échantillons d'hémolymphe provenant de moules *M. trossulus* fortement néoplasiques ont été préparés pour la microscopie électronique selon la technique de "post-embedding". Parallèlement, une partie de l'hémolymphe de chaque individu a été utilisée dans un test d'IIF, pour déterminer leur profil d'immunofluorescence en présence de l'anticorps monoclonal 14F1-5E9 et estimer ainsi leur degré de ploïdie. Lors de l'immunomarquage à l'or colloïdal, toute la série d'anticorps monoclonaux a été testée sur des coupes provenant soit d'un prélèvement d'hémolymphe dont le degré de ploïdie a été estimé à 4n, soit d'un échantillon évalué 5n. Les résultats sont résumés dans la figure 29.

En se référant à la classification des AcMs établie dans le paragraphe 4.2., les épitopes reconnus par les AcMs appartenant à la classe A sont situés essentiellement dans le noyau des hémocytes néoplasiques (Fig. 30A).

Les AcMs regroupés dans la classe B réagissent soit au niveau de la membrane plasmique : 14F1-5E9, 16G10-5B9, 16A7 et 14B12-3H5 (Fig. 28A, B), soit au niveau du noyau et du cytoplasme : 17C9-2H11 ou du cytoplasme et de la membrane plasmique : 4F11-1H10 (Fig. 30B).

Tous les AcMs de la classe C reconnaissent un épitope cytoplasmique et nucléaire (Fig. 30C) avec cependant dans le cas du 19G2-F2, une localisation plus précise à la membrane nucléaire.

Bien que l'intensité de marquage soit assez faible avec les anticorps de classe D, les antigènes semblent associés au cytoplasme (Fig. 30D) ou au noyau.

Les AcMs communs aux cellules néoplasiques et aux cellules normales des deux espèces (classe "communs") réagissent au niveau de la membrane plasmique des cellules néoplasiques dont la ploïdie a été évaluée à 4n (Fig. 31E) mais ne semblent pas réagir avec les cellules 5n. Dans le cas des hémocytes normaux, les billes d'or ont été

Fig. 30 : Localisation ultrastructurale des épitopes détectés par les anticorps réagissant sur les hémocytes néoplasiques ou normaux de *M. trossulus*, préparés selon la technique de "post-embedding" et marquage à l'or colloïdal (→) (N : noyau)

A : anticorps de classe A (7C11-C5) (X 14400), les billes d'or sont localisées dans le noyau des hémocytes 4n de *M. trossulus*

B : anticorps de classe B (4F11-1H10) (X 17300), le marquage est détecté au niveau du cytoplasme et de la membrane plasmique des hémocytes 5n de *M. trossulus*

C : anticorps de classe C (5D2-2G1) (X 17300), les billes d'or sont observées dans le cytoplasme et/ou le noyau des hémocytes 4n et 5n de *M. trossulus*

D : anticorps de classe D (15F3-1D12) (X 21600), l'immunomarquage, bien que faible, est situé au niveau du cytoplasme des hémocytes 4n et 5n de *M. trossulus*

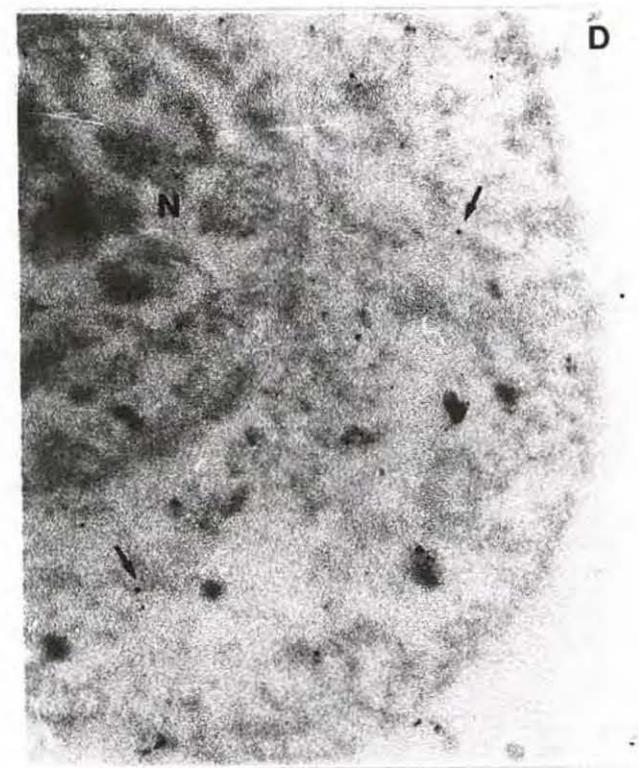
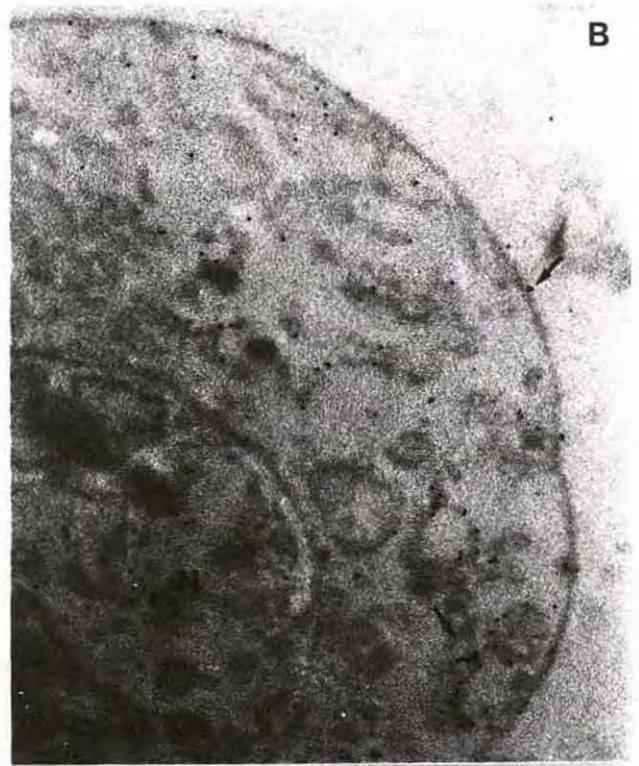
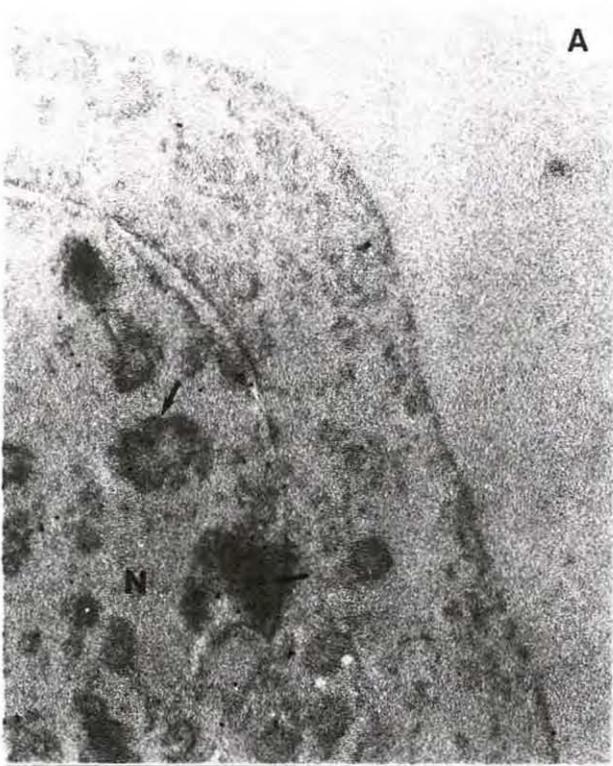


Fig. 31 : Localisation ultrastructurale des épitopes détectés par les AcMs de classe "communs" réagissant sur les hémocytes néoplasiques et les hémocytes normaux des deux espèces de *Mytilus*. Les échantillons sont préparés selon la technique de "post-embedding" et marquage à l'or colloïdal (→)

A : immunoréactivité de l'AcM 11F3-3D4 sur les granules (g) d'un granulocyte à petits granules de *M. edulis* (X 57600)

B : immunoréactivité de l'AcM 11F3-3D4 sur un pseudopode (p) et la membrane plasmique (m) d'un hyalinocyte de *M. edulis* (X 27400)

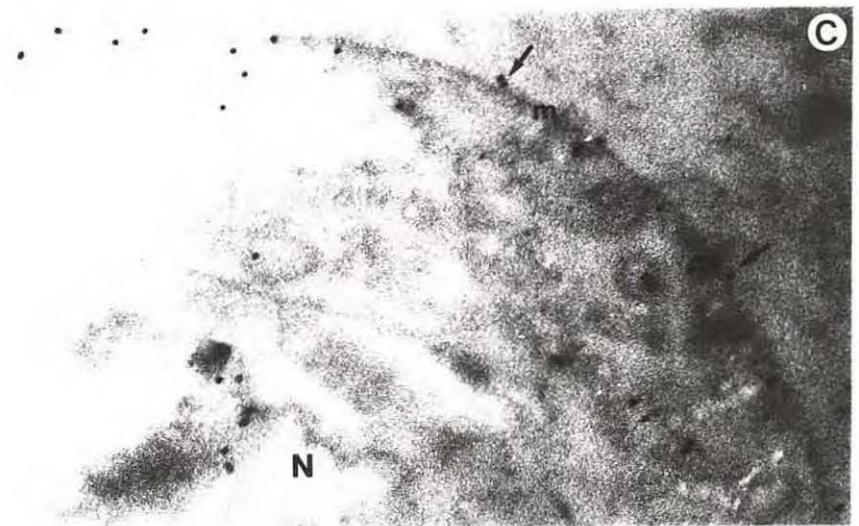
C : immunoréactivité de l'AcM 7G3 sur la membrane plasmique (m) d'un hyalinocyte de *M. edulis* (N : noyau) (X 27400)

D : immunoréactivité de l'AcM 7G3 sur les granules (g) d'un granulocyte à petits granules de *M. edulis* (X 57600)

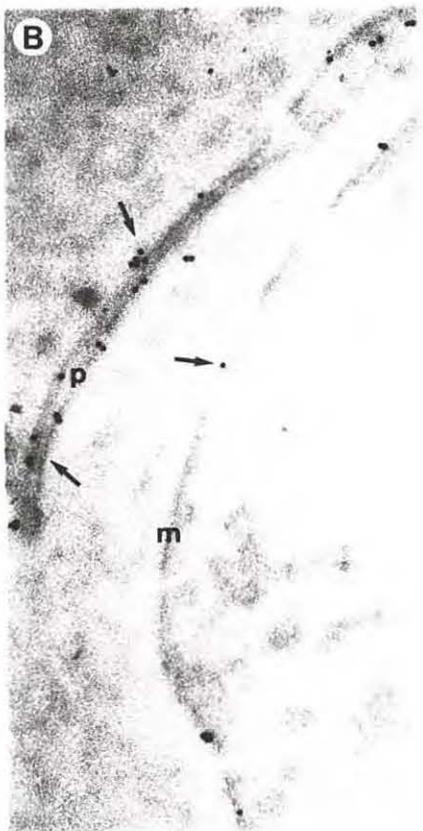
E : immunoréactivité de l'AcM 7G3 sur la membrane plasmique (m) d'un hémocyte néoplasique de *M. trossulus* dont la néoplasie a été estimée à 4n (X 57600)



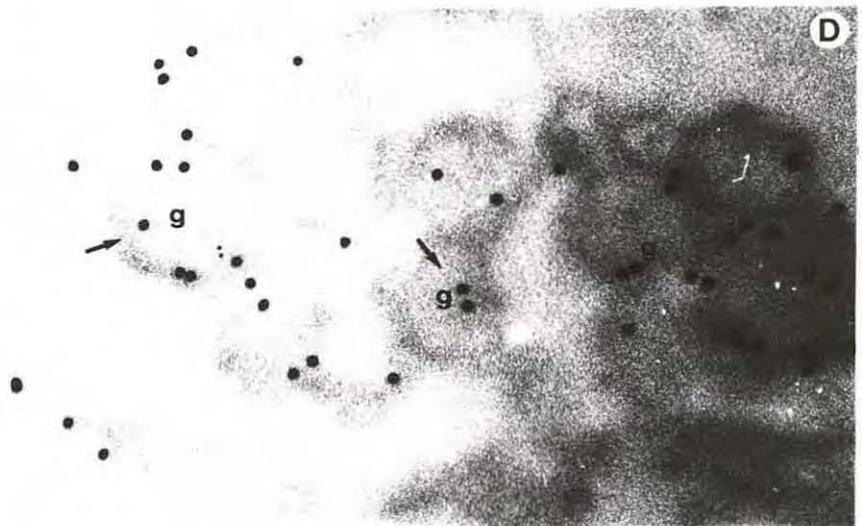
A



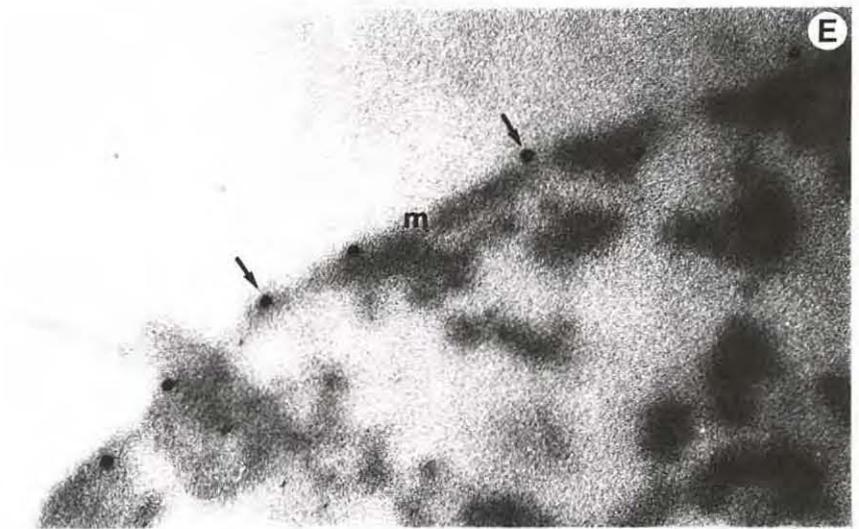
C



B



D



E

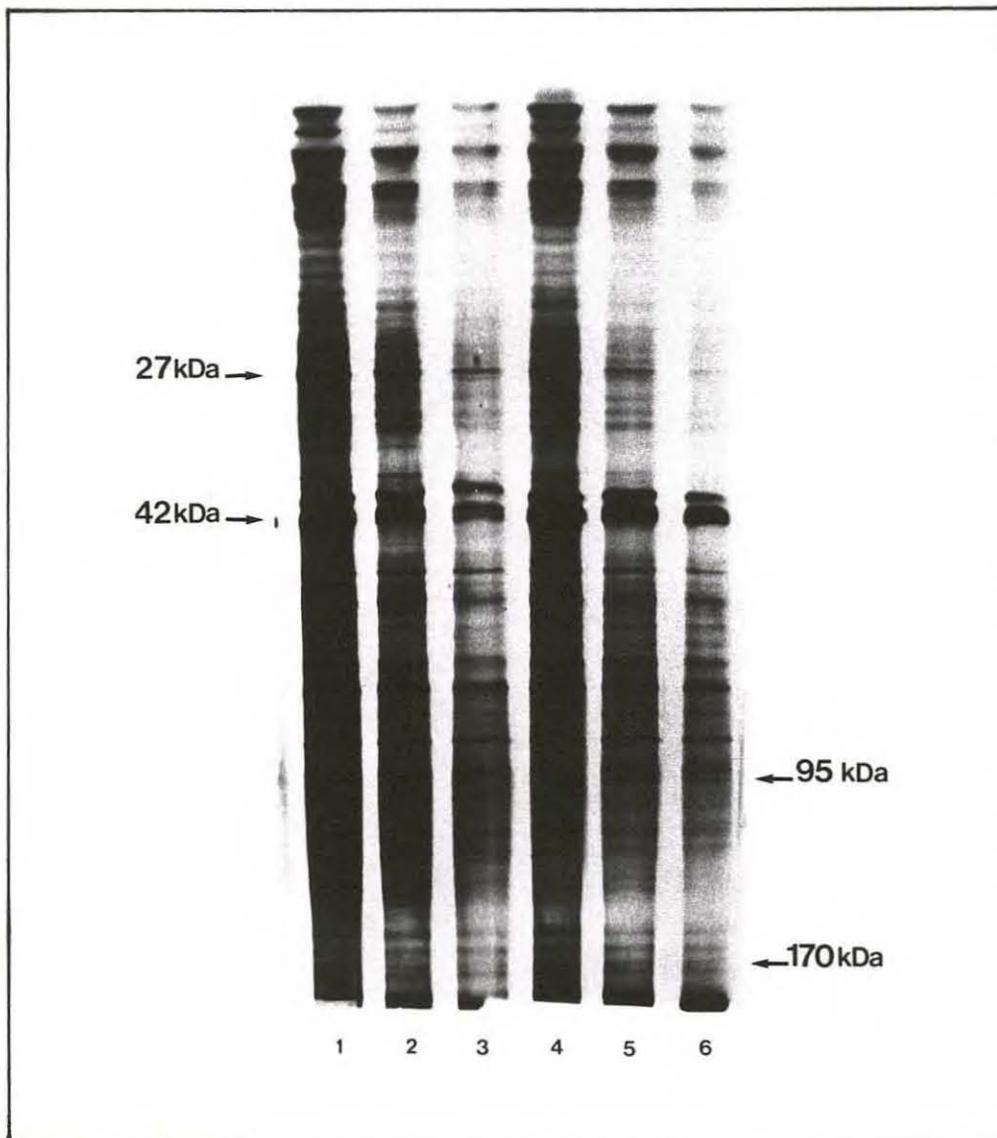


Fig. 32 : Profil électrophorétique, en gel SDS-PAGE 7,5-20 %, des protéines totales des deux types d'hémocytes néoplasiques polyploïdes de *M. trassulus*,
 1, 2, 3 : 50, 20, 10 μg de protéines d'hémocytes 4n
 4, 5, 6 : 50, 20, 10 μg de protéines d'hémocytes 5n

observées sur tous les types cellulaires, une intensité de marquage plus forte étant obtenue sur les hyalinocytes et les granulocytes à petits granules. Les épitopes reconnus par ces AcMs sont localisés plus précisément au niveau de la membrane plasmique des hyalinocytes (Fig. 31B, C) et sur les granules des granulocytes à petits granules (Fig. 31A, D).

4.4. Détermination des poids moléculaires des protéines reconnues par les anticorps monoclonaux

4.4.1. Comparaison des profils électrophorétiques des deux types d'hémocytes néoplasiques

Les profils électrophorétiques obtenus après séparation SDS-PAGE des protéines totales issues des hémocytes néoplasiques de *M. trussulus* 4n ou 5n sont d'un point de vue qualitatif, sensiblement similaires (Fig 32). Au niveau quantitatif, des différences apparaissent entre les deux types de cellules polyploïdes. Une protéine de l'ordre de 30 kDa semble exprimée en plus grande quantité dans les hémocytes 4n que dans les hémocytes 5n (Fig. 32 n°1, 2, 3). A l'inverse, deux bandes correspondant à des protéines de poids moléculaires respectifs de 95 et 170 kDa apparaissent plus nettement dans les échantillons correspondant à des hémocytes 14F1-5E9 positifs, c'est-à-dire pentaploïdes (Fig. 32 n°4, 5, 6).

4.4.2. Western blot

La conservation de l'antigénicité des protéines avant (tampon de lyse ; Annexe 2.1) et après (tampon de dépôt ; Annexe 2.1) dénaturation a été vérifiée par "immuno-dot", avec les différents anticorps monoclonaux spécifiques. Cette technique a permis de mettre en évidence que les AcMs de classe A, C et D réagissent avec des protéines natives, alors que les épitopes reconnus par les AcMs de classe B ou "communs" sont conservés après dénaturation (données non présentées). La détermination des poids moléculaires a donc été entreprise soit après immunopurification des protéines provenant d'un lysat d'hémocytes tétraploïdes et électrophorèse SDS-PAGE (classe A et C), soit après électrophorèse SDS-PAGE de lysats cellulaires issus d'hémocytes 5n et "Western blot" (classe B). Ces expériences ont été réalisées à l'aide de l'instrumentation Phast System (voir Matériels et Méthodes).

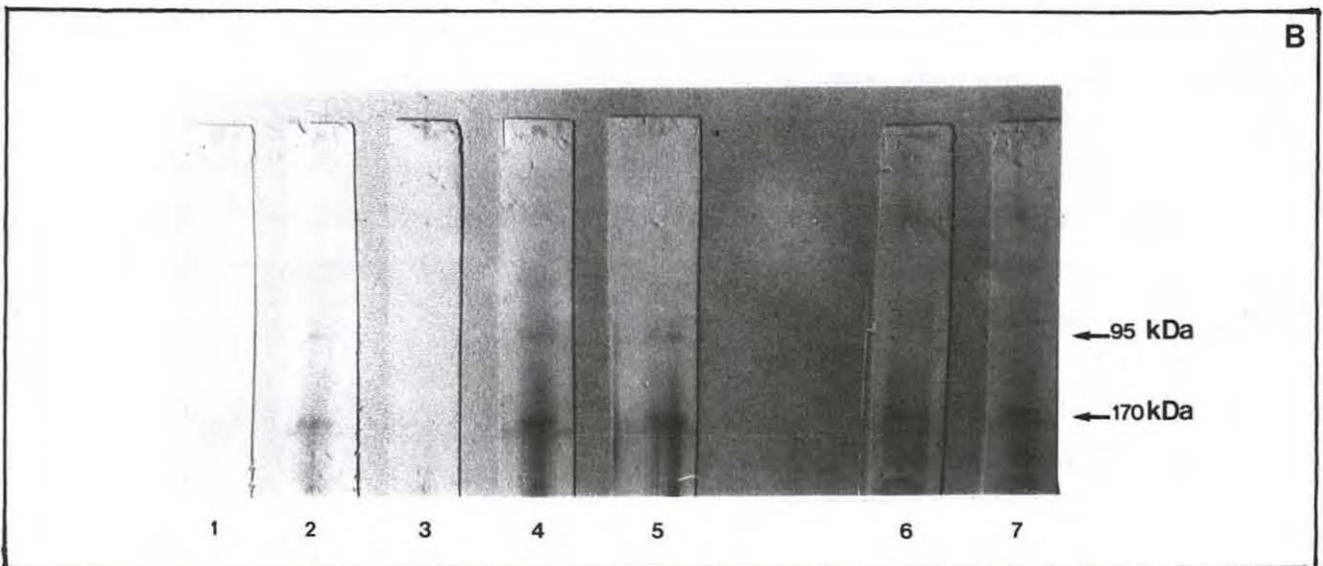
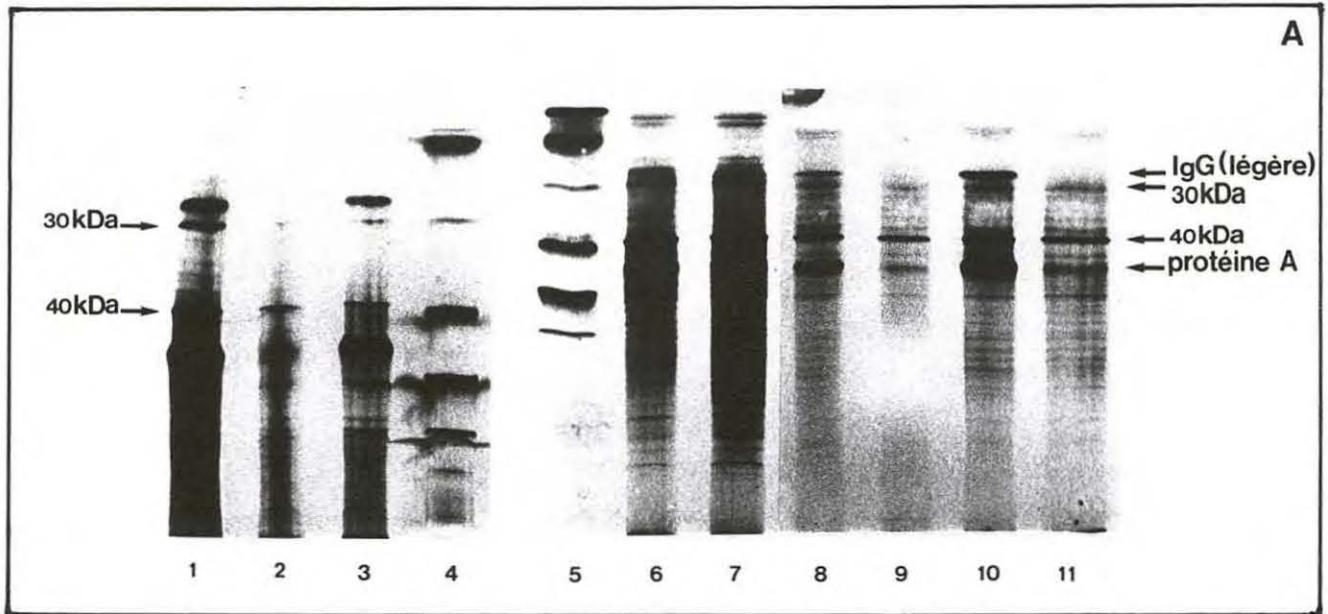


Fig. 33 : Détermination des poids moléculaires des protéines reconnues par les différentes classes d'AcMs spécifiques des hémocytes néoplasiques

A- après Immunopurification et SDS-PAGE

1, 2, 3 : 7C11-C5, 7E5-E4, 14A5-A7 (AcMs de classe A, gel 4-15 %)

4, 5, : marqueurs de bas poids moléculaires

6, 7, 8, 9, 10, 11 : 19B7-1H6, 19G2-F2, 4F4-3E3, 5D2-2G1, 11A8-F8, 11D10-H2 (AcMs de classe C, gel homogène 12,5 %)

B- après SDS-PAGE en gel homogène 7,5 % et Western blot

1, 2, 3 : 4F11-1H10, 17C9-1B9, AcM témoin

4, 5, 6, 7 : 14F1-5E9, 14B12-3H5, 16G10-5B9, 16A7

Après immunopurification des protéines reconnues par les AcMs de classe A et C et électrophorèse SDS-PAGE, des profils similaires ont été observés (Fig. 33A). Les bandes majoritaires à environ 50 kDa et 25 kDa correspondent respectivement à la protéine A et aux chaînes légères des immunoglobulines, les chaînes lourdes n'étant pas facilement détectables. Bien qu'un certain nombre de bandes minoritaires apparaisse, une bande majeure correspondant à une protéine de 40 kDa est nettement visible, quel que soit l'AcM utilisé (Fig. 33). Une deuxième bande moins nette pour une protéine qui serait de l'ordre de 30 kDa a été également observée (Fig. 33). Celle-ci pourrait correspondre à la protéine exprimée en plus grande quantité chez les hémocytes 4n, détectée sur le profil électrophorétique (Fig. 32 n°1, 2, 3).

Par la technique de "Western blot", il a été possible de mettre en évidence que les AcMs de classe B présentent la même immunoréactivité. En effet, une bande majoritaire correspondant à une protéine de l'ordre de 170 kDa a été observée, quel que soit l'AcM testé (Fig. 33B). Une deuxième protéine de 95 kDa a été également identifiée. Bien que la bande correspondante soit faible, elle a semblé spécifique puisque les trois AcMs témoins, de sous-classes identiques à ceux utilisés, n'ont montré aucune réactivité.

5. APPLICATION A LA MISE AU POINT D'UN IMMUNODIAGNOSTIC ENZYMATIQUE DE TYPE ELISA

L'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* a permis d'envisager la mise au point d'un immunodosage enzymatique de type ELISA. Ce dosage a été élaboré selon une méthode directe de type sandwich. Bien que ce type de test soit courant pour le diagnostic d'agents infectieux (Yolken, 1982 ; Cochenec *et al.*, 1992), les paramètres expérimentaux doivent être caractérisés et optimisés pour chaque mise au point.

5.1. Choix des anticorps de capture et de détection

Deux anticorps monoclonaux : le 14F1-5E9 et le 16G10-5B9 ont été retenus d'une part, en raison de leur spécificité pour des épitopes membranaires et d'autre part, en raison des fortes réponses observées en RIA (Fig. 17) et en IIF. Cette forte représentativité des antigènes sur ces hémocytes a été confirmée par la technique d'immunomarquage à l'or colloïdal (Fig. 28).

anticorps de capture		antigène	anticorps de détection (dilution; ng/puits)							
nom	concentration (ng/puits)		14F1				16G10			
14F1	125	ç néoplasiques ç normales	1/1000	1/2000	1/4000	1/1000	1/2000	1/4000	1/2000	1/4000
			37,5	18,75	9,38	37,5	18,75	9,38	18,75	9,38
	250	ç néoplasiques ç normales	1166	1168	780	815	689	416		
			336	280	228	325	243	182		
16G10	125	ç néoplasiques ç normales	>2	>2	>2	>2	1942	1249		
			395	303	279	377	275	250		
	250	ç néoplasiques ç normales	>2	>2	>2	>2	>2	>2		
			1617	1302	989	1093	745	614		
	250	ç néoplasiques ç normales	>2	>2	>2	>2	>2	>2		
			>2	>2	1892	1795	1174	781		

Fig. 34 : Immunodosage enzymatique : estimation des valeurs de DO obtenues avec des hémocytes (ç) néoplasiques de *M. trossulus* et normaux de *M. edulis* en fonction des différentes associations anticorps de capture/ anticorps de détection et de la concentration en anticorps de capture et en anticorps de détection (100.000 cellules/puits ; incubation du substrat pendant 1h30)

Le protocole d'immunodosage de type sandwich a été testé en parallèle sur des suspensions antigéniques d'hémocytes normaux de *M. edulis* et d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus*. Après purification des anticorps, des conjugués enzymatiques ont été préparés et utilisés selon différentes combinaisons anticorps de capture/anticorps de détection (14F1/14F1, 14F1/16G10, 16G10/14F1 et 16G10/16G10).

Les résultats reportés dans la figure 34 ont indiqué que le meilleur anticorps de capture semble être le 14F1-5E9, le 16G10-5B9 retenant de manière moins spécifique les cellules normales. L'anticorps 14F1-5E9 a également été sélectionné pour la détection, en raison de la réponse spécifique plus élevée que celle observée avec l'AcM 16G10-5B9. Ces résultats obtenus avec l'association 14F1/14F1 ont été confirmés lors de plusieurs essais, pendant lesquels diverses solutions de saturation, de lavage et de dilution des conjugués ont été testées (données non présentées).

Les concentrations d'utilisation de ces anticorps ont été optimisées en testant une série de dilutions d'hémocytes néoplasiques dans une suspension d'hémocytes normaux, la quantité totale de cellules étant toujours identique : 100.000 cellules/puits. Dans ces conditions, à 125 ng/puits, la quantité d'anticorps de capture a été limitante car les valeurs de DO ont été supérieures pour les concentrations de conjugués les plus élevées. Par contre, une quantité de 250 ng d'anticorps de capture/puits a assuré une rétention maximale et spécifique des hémocytes néoplasiques (Fig. 35). Cette concentration a donc été choisie et correspond aux recommandations d'utilisation du fournisseur de microplaques. La concentration en anticorps de détection la plus performante a été retenue pour la suite des essais, soit 37,5 ng/puits (dilution 1/1000).

5.2. Traitement de l'échantillon

Tous les essais ont été réalisés avec des échantillons d'hémolymphe préalablement répartis en aliquots et congelés à -20°C et décongelés avant utilisation. Ceci a permis de comparer de façon fiable divers paramètres au cours de différentes expériences, indépendamment de fluctuations dans les suspensions antigéniques. En plus du traitement congélation/décongélation, divers traitements de l'échantillon ont été effectués, dans le but de favoriser l'accessibilité des antigènes aux anticorps :

- un traitement aux ultra-sons.
- une dilution au 1/10^e dans un tampon PBS (référence).
- une dilution au 1/10^e dans un tampon PBS additionné d'un détergent (1% de Tween 20).
- une dilution au 1/10^e dans une solution à 20 % d'hydrolysate de gélatine (Plasmion) supplémentée avec un détergent (1% de Tween 20).

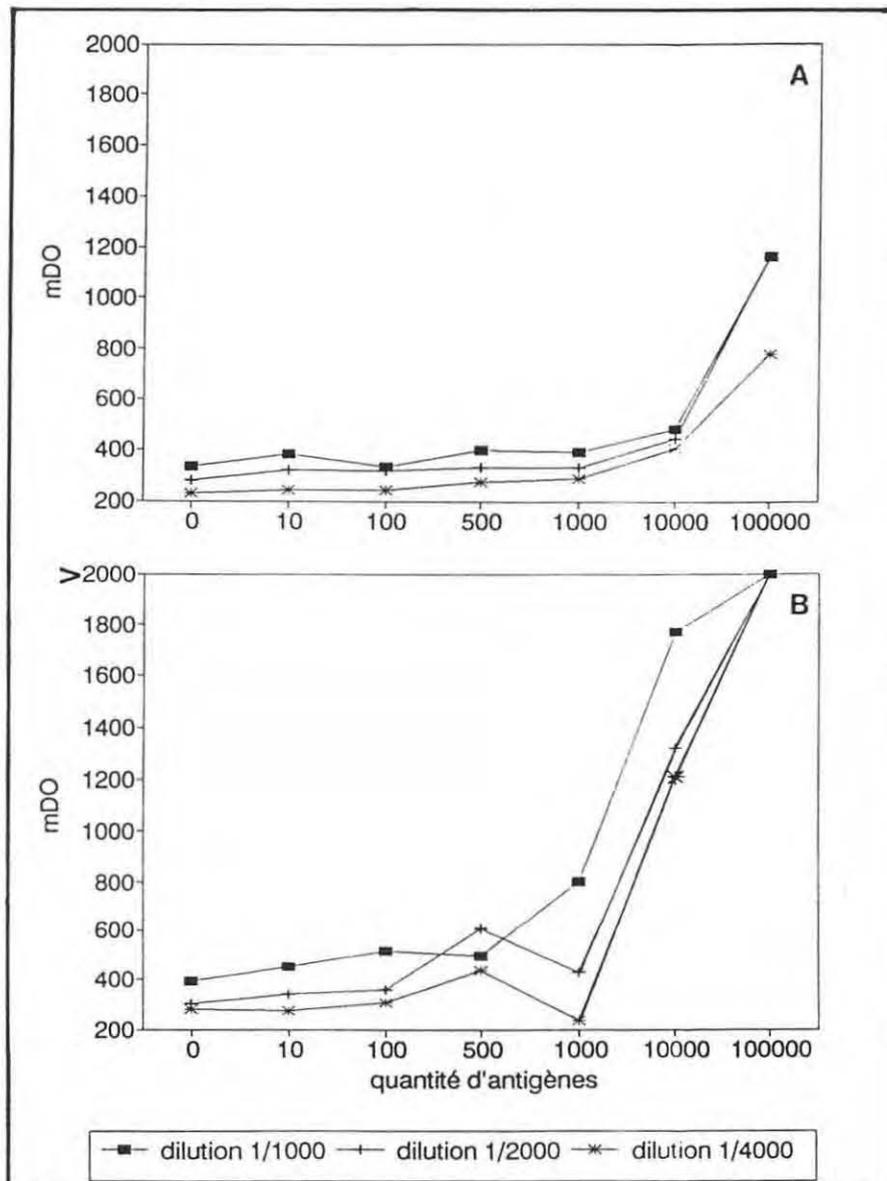


Fig. 35 : Immunodosage enzymatique : estimation des DO en fonction du nombre d'hémocytes néoplasiques (antigènes) de *M. trossulus*, en présence d'hémocytes normaux de *M. edulis* (qsp 100.000 cellules/puits) et des concentrations en anticorps de capture et en anticorps de détection (incubation du substrat pendant 1h30)

A : concentration en anticorps de capture : 125 ng/puits

B : concentration en anticorps de capture : 250 ng/puits

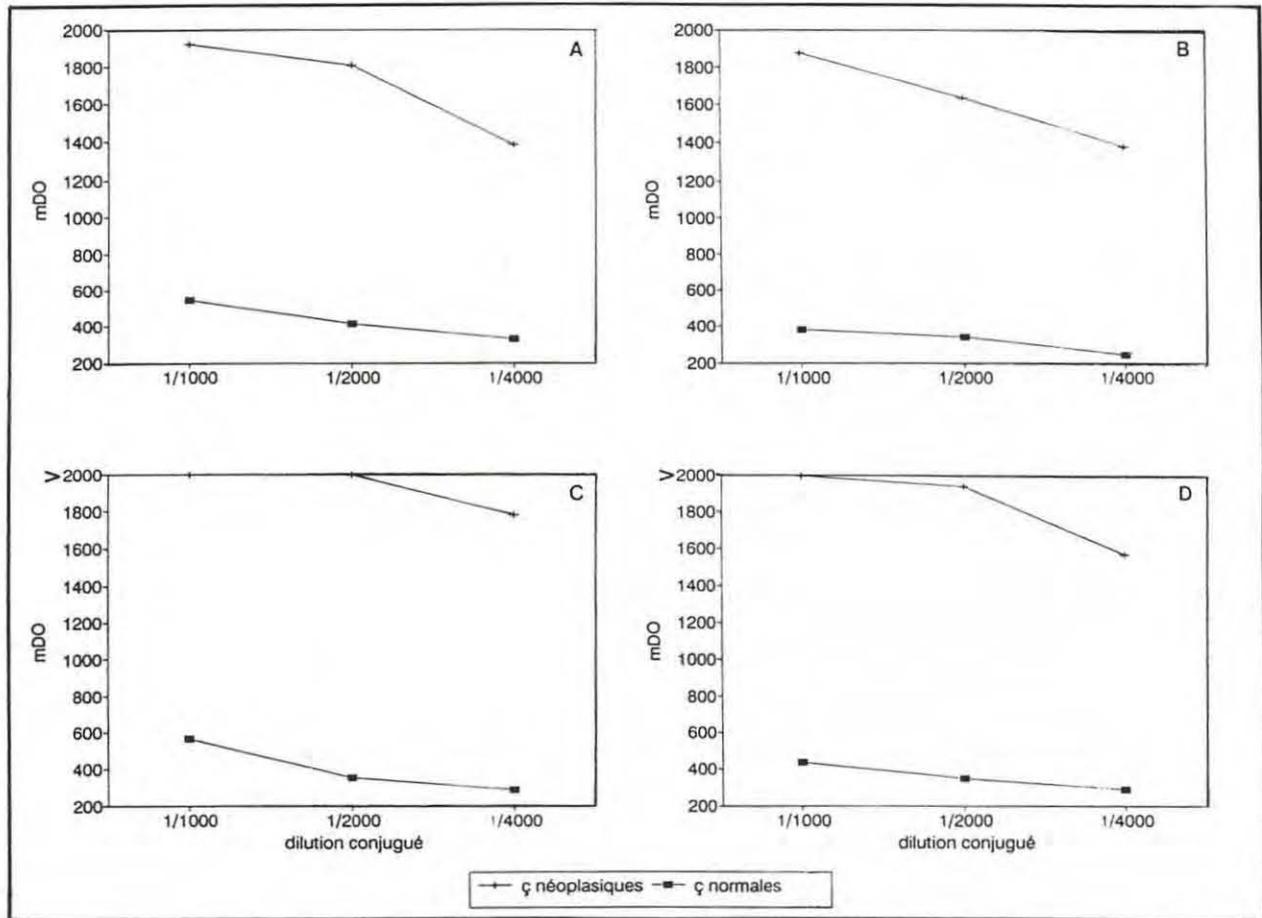


Fig. 36 : Immunodosage enzymatique : estimation des DO obtenues avec des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* et des hémocytes normaux de *M. edulis* en fonction du type de traitement de l'hémolymphe et de la dilution du conjugué (concentration en anticorps de capture : 250 ng/puits ; 100.000 cellules/puits ; incubation du substrat pendant 1h30)
A : PBS
B : PBS + 1% Tween 20
C : PBS + ultra-sons
D : Plasmion 20% + 1% Tween 20

- . Sensibiliser une microplaque avec l'anticorps 14F1 à 250 ng/puits, dilué dans du PBS. Incuber 1 h à 37°C.
- . Laver 3 fois avec un tampon NaCl 0,3 M + 0,5% Tween 20.
- . Déposer 200 µl/puits de solution de saturation (Plasmion 20 % dans PBS). Incuber 1h30 à 37°C.
- . Laver 3 fois avec un tampon NaCl 0,3 M + 0,5% Tween 20.
- . Déposer 100 µl/puits d'hémolymphe congelée et décongelée, diluée au 1/10^è dans 20% de Plasmion + 1% Tween 20. Incuber une nuit à 4°C.
- . Laver 3 fois avec un tampon NaCl 0,3 M + 0,5% Tween 20.
- . Déposer 100 µl/puits d'anticorps conjugués 14F1 (37,5 ng/puits), dilués dans 20% de Plasmion + 1% Tween 20. Incuber 1 h à 37°C.
- . Laver 3 fois avec un tampon NaCl 0,3 M + 0,5% Tween 20.
- . Déposer 100 µl/puits de substrat NPP. Incuber 1 h 30 à 37°C.
- . Lire les densités optiques au spectrophotomètre à 405 nm.

Fig. 37 : Protocole de l'immunodosage enzymatique direct de type sandwich

Ces deux dernières solutions ont pour but de réduire la fixation non spécifique des anticorps sur les hémocytes normaux.

Les résultats présentés dans la figure 36 correspondent à une expérience réalisée avec 100.000 cellules/puits et différentes dilutions de l'anticorps de détection conjugué à la phosphatase alcaline. Quels que soient les tampons de dilution et le traitement de l'échantillon, la spécificité de l'immunodosage a été bonne puisque les valeurs de DO observées pour des hémocytes normaux ont toujours été voisines du bruit de fond. Les valeurs maximales correspondant aux échantillons d'hémocytes néoplasiques ont été obtenues après un traitement aux ultra-sons et en présence de Plasmion et de Tween qui sont des agents saturants reconnus pour leur efficacité dans ce type d'immunodosage. Ce dernier type d'échantillon a été retenu préférentiellement car il évite la manipulation des échantillons pour les opérations d'ultrasonication.

5.3. Protocole de l'immunodosage enzymatique

En tenant compte des différents paramètres testés, un protocole d'immunodosage enzymatique direct de type sandwich a été élaboré selon le descriptif reporté dans la figure 37.

5.4. Etablissement d'une courbe de référence

Une courbe de référence a été réalisée sur la base du protocole précédemment établi. Des quantités connues de cellules néoplasiques ont été mélangées avec des cellules normales de manière à simuler des degrés croissants de néoplasie. Des réponses spécifiques ont été obtenues avec une quantité de 1000 cellules/100 μ l/puits, ce qui correspond à une sensibilité de détection de 10 hémocytes néoplasiques/ μ l d'hémolymphe (Fig. 38).

5.5. Etude clinique

De manière à vérifier la spécificité de l'immunodosage vis-à-vis des hémocytes néoplasiques et à déterminer le seuil de positivité, des prélèvements d'hémolymphe provenant de dix individus normaux de différentes espèces : *M. edulis*, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* et deux témoins : eau de mer et Plasmion 20% + Tween 20 1% ont été testés (Fig. 39). Parallèlement, les hémolymphe de 50 moules

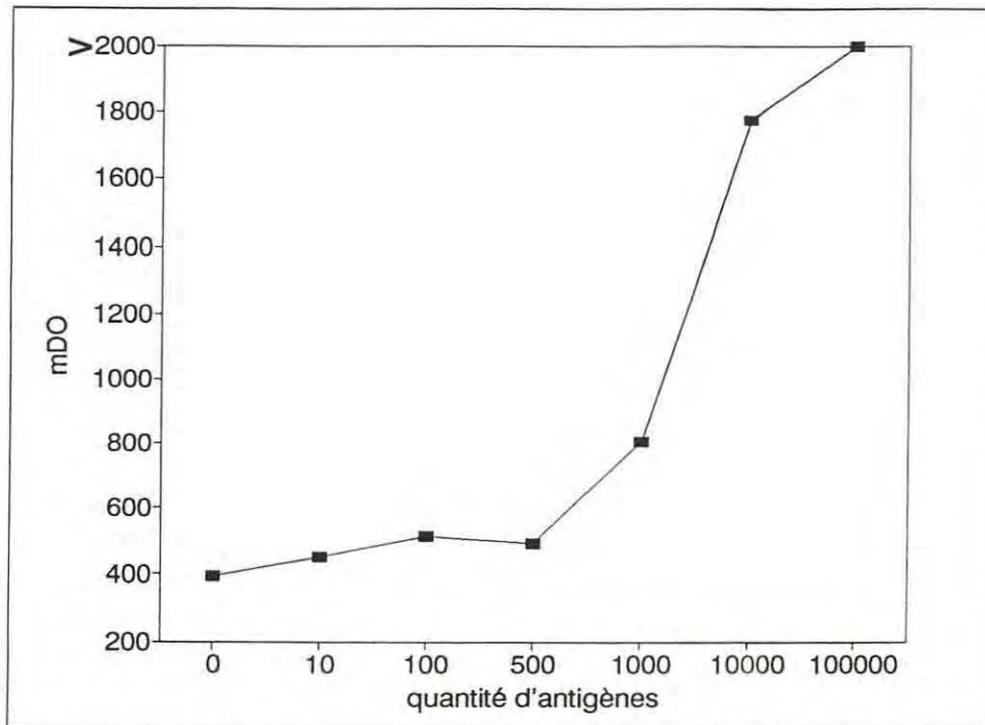


Fig. 38 : Immunodosage enzymatique : courbe de référence de quantification des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* en présence d'hémocytes normaux (qsp 100.000 cellules/puits) (concentration en anticorps de capture : 250 ng/puits ; dilution du conjugué : 1/1000 ; incubation du substrat pendant 1h30)

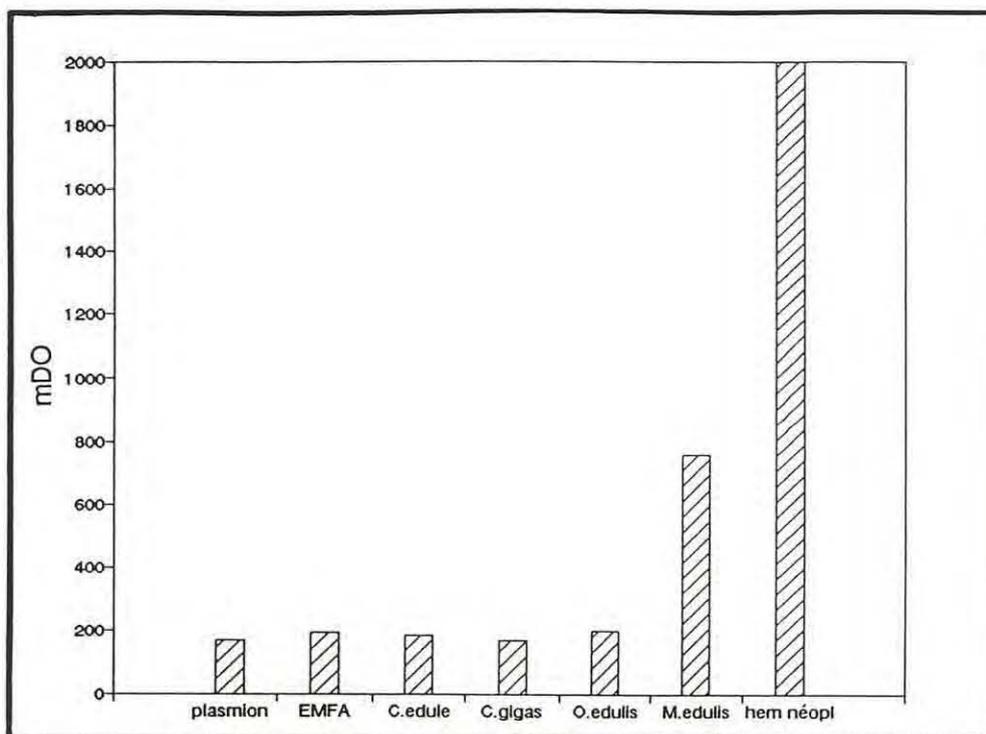


Fig. 39 : Immunodosage enzymatique : estimation des DO de prélèvements d'hémolymphe (moyenne de 10 échantillons), diluée au $1/10^e$, de différentes espèces de Mollusques bivalves et du tampon de dilution des échantillons

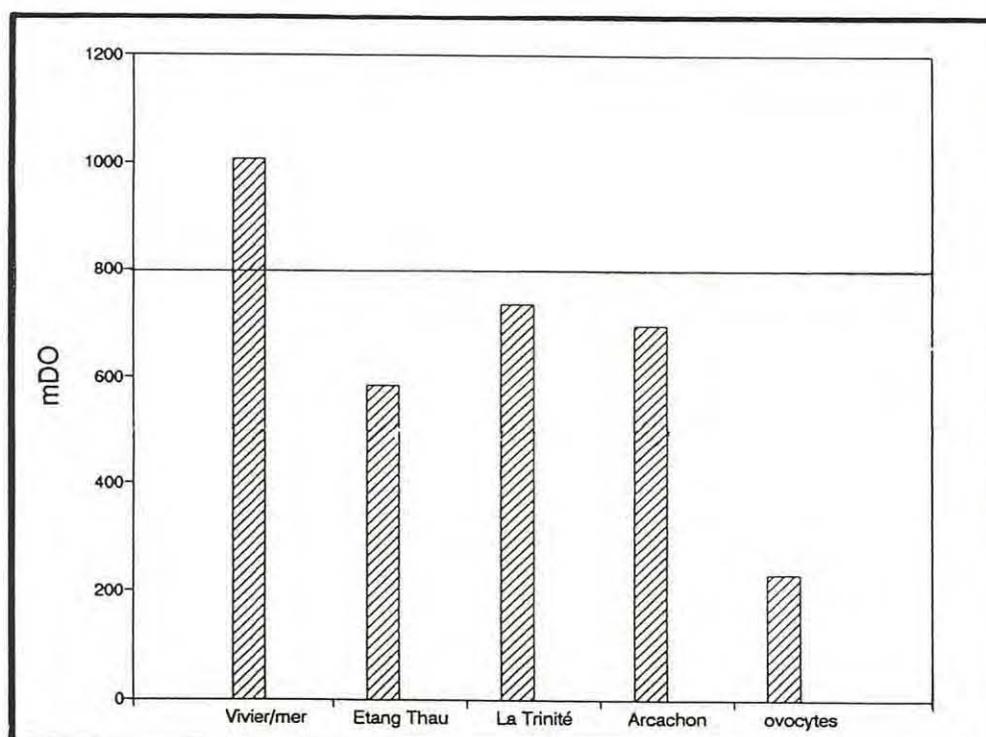


Fig. 40 : Immunodosage enzymatique : estimation des valeurs de DO de prélèvements d'hémolymphe (moyenne de 50 échantillons) diluée au $1/10^e$ de *M. edulis*, provenant de différentes localisations ou d'ovocytes

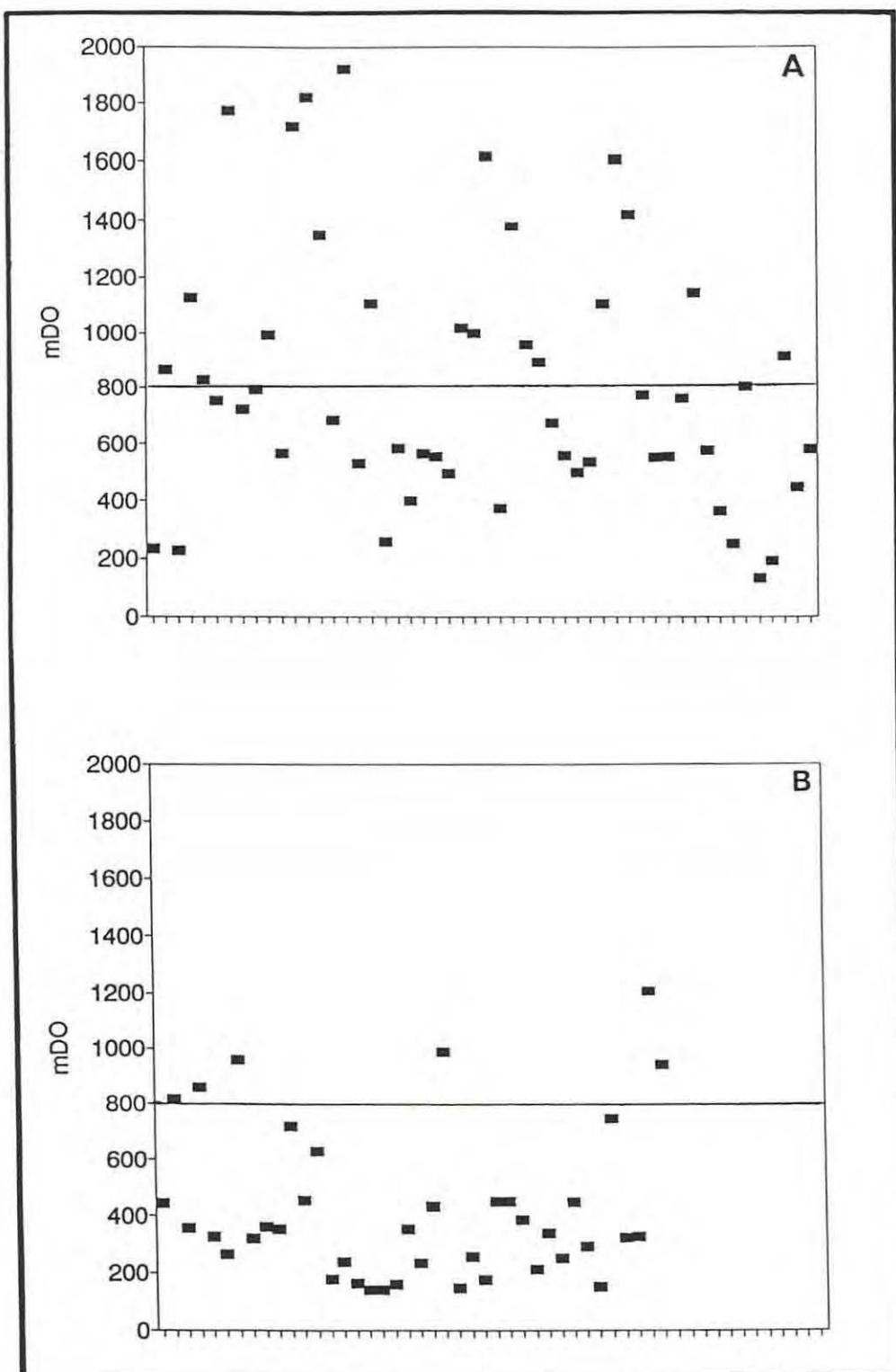


Fig. 41 : Immunodosage enzymatique : comparaison des méthodes de diagnostic histologique (référence) et immunoenzymatique.

Estimation des valeurs de DO en fonction de la présence et de la concentration en hémocytes néoplasiques de différents échantillons d'hémolymphe de *M. grossulus* (seuil de positivité estimé à 800 mDO)

A : échantillons diagnostiqués positifs en histologie

B : échantillons diagnostiqués négatifs en histologie

sensibilité : nb cas positifs ELISA/nb cas positifs histologie = 55%

spécificité : nb cas négatifs ELISA/nb cas négatifs histologie = 85%

M. edulis originaires de différentes localisations ont été analysées (Fig. 40). Les résultats ont indiqué que les valeurs de DO sont de l'ordre du bruit de fond pour les différents échantillons, sauf dans le cas de *M. edulis* pour lequel, une fixation non spécifique est observée, la moyenne des valeurs de DO étant estimée à 800 mDO environ.

Une étude clinique a été réalisée avec des échantillons individuels d'hémolymphes afin de valider le protocole de l'immunodosage élaboré avec des suspensions d'hémocytes normaux ou néoplasiques, préalablement regroupées pour permettre une comparaison des résultats lors des étapes de mise au point. Les échantillons d'hémolymphes ont été prélevés à partir d'une centaine d'individus *M. trossulus* et conservés à - 20°C. Les animaux ont été ensuite traités pour préparer des coupes histologiques. La spécificité et la sensibilité de l'immunodosage enzymatique ont été estimées par rapport à la méthode de diagnostic sur coupes histologiques, choisie comme référence car elle assure la meilleure sensibilité par rapport aux techniques sur frottis à l'état frais ou colorés (Moore *et al.*, 1991b).

Les résultats du dosage de chaque échantillon d'hémolymphes dilué au 1/10^e sont reportés dans la figure 41. La spécificité, définie comme le rapport du nombre de cas négatifs déterminés selon la méthode ELISA et selon la méthode de référence est égale à 85 %. La sensibilité, définie comme le rapport des nombres de cas positifs, obtenus par chacune des deux méthodes, équivaut à 55 %. Si la spécificité de l'immunodosage enzymatique peut être jugée satisfaisante, sa sensibilité s'est révélée inférieure à celle de la technique histologique. Ces résultats peuvent s'expliquer, au moins partiellement, par le fait que l'AcM 14F1-5E9, utilisé dans ce protocole, ne réagit qu'avec les hémocytes 5n et pour certains individus qu'avec un pourcentage de cellules parmi les hémocytes pentaploïdes. D'autre part, la nature même du prélèvement peut être mise en cause. En effet, de très faibles infections ne sont pas détectées lors d'un prélèvement d'hémolymphes alors qu'une analyse sur coupes histologiques permet de les mettre en évidence. Par contre, les estimations des degrés de néoplasie coïncident généralement entre les deux méthodes. Les moules présentant une forte ou moyenne infiltration par des hémocytes néoplasiques sur coupes histologiques correspondent en ELISA à des valeurs de densité optiques variant entre 1000 et 2000 mDO.

origine	AcM 14F1-5E9	17C9-1H10
Canada côte ouest : <i>M. edulis</i> (= <i>M. galloprovincialis</i> ?)		
Departure bay (1987)	+++	++
Departure bay (1987)	+++	+++
Departure bay (1987)	+++	+++
Departure bay (1987)	+++	+++
Departure bay (1987)	+++	+++
Canada côte est : <i>M. edulis</i>		
St Lawrence (1990)	+++	+++
France : <i>M. edulis</i>		
Marennes (1988)	±	±
Angleterre : <i>M. edulis</i>		
Cornwall (1976)	-	-
Devon (1977)	-	-
Cornwall (1978)	-	-
North Wales(1978)	-	-
North Wales(1979)	-	-
Espagne : <i>M. galloprovincialis</i>		
Ria de Vigo (1988)	-	-
Ria de Vigo (1988)	-	ND
Ria de Arousa (1989)	-	-

Fig. 42 : Immunoréactivité des AcMs spécifiques des hémocytes néoplasiques 5n de *M. trossulus* vis-à-vis d'hémocytes néoplasiques de *Mytilus* de différentes origines américaines et européennes, testée par IIF sur coupes paraffine (ND : non déterminé ; ± : faible fluorescence)

6. APPLICATION DES AcMs SPECIFIQUES DES HEMOCYTES DE *M. TROSSULUS*

6.1. Recherche de réactivités des AcMs spécifiques des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* avec des néoplasies hémocytaires d'autre provenance

Des coupes histologiques de spécimens de *M. galloprovincialis* ou *M. edulis* présentant une néoplasie hémocytaire morphologiquement similaire à celle étudiée chez *M. trossulus* et originaires de différentes localisations ont été fournies par différents collègues étrangers (Bower S., Canada ; Fernandez J., Espagne ; Lopez C., Espagne ; Mc Gladdery S., Canada ; Pipe R., Angleterre). Compte tenu de la perte de réactivité sur coupes paraffine observée avec certains AcMs, seuls les anticorps 14F1-5E9 et 17C9-1B9 (représentants de la classe B) ont été testés selon la technique d'IIF. A l'exception d'un cas de néoplasie hémocytaire de *M. edulis* originaire de la côte atlantique française, aucune réaction immunologique n'a été observée pour les autres cas d'hémocytes néoplasiques de moules *M. edulis* ou *M. galloprovincialis*, originaires des côtes européennes (Fig. 42). Des réactions très positives ont été observées sur des échantillons de *M. edulis* provenant des côtes ouest et est du Canada.

6.2. Spécificité des AcMs réagissant avec les hémocytes de *M. trossulus* vis-à-vis des hémocytes d'autres espèces de Mytilidae

La réactivité des AcMs spécifiques des hémocytes de l'espèce *M. trossulus* a été testée selon une technique d'IIF vis-à-vis des hémocytes de différentes espèces de Mytilidae. Il s'est avéré que les anticorps monoclonaux de la classe D sont spécifiques de l'espèce *M. trossulus* puisqu'aucune réaction de fluorescence n'a été observée avec les hémocytes des autres espèces testées (Fig. 43). Les anticorps de la classe C réagissent différemment selon l'espèce. En effet, des réactions négatives ont été observées sur les espèces *M. edulis* et *M. californiensis* alors qu'une nette fluorescence est obtenue avec la majorité des hémocytes de *M. galloprovincialis* (Fig. 43).

7. DISCUSSION

Le processus de transformation d'une cellule normale en une cellule néoplasique est liée à des modifications antigéniques. Les antigènes associés aux tumeurs sont

espèce AcM	<i>M. trossulus</i>	<i>M. edulis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. californiensis</i>
classe C				
4F4-3E3	+++	-	++	-
11A8-F8	+++	-	++	-
19G2-F2	+++	-	++	-
classe D				
15E3-E10	+++	-	-	-
15F3-D12	+++	-	-	-

Fig. 43 : Immunoréactivité de quelques AcMs spécifiques des hémocytes normaux et néoplasiques de *M. trossulus* vis-à-vis des hémocytes d'autres espèces de Mytilidae, testée par I.I.F., sur des cyto-centrifugations ou des primocultures (+ à +++ : immunofluorescence d'intensité variable ; ND : non déterminé)

essentiellement de trois types : oncoprotéines, protéines normales dérégulées ou protéines virales. La mise en évidence et la caractérisation d'une telle protéine peut être grandement favorisée par l'obtention d'anticorps spécifiques.

La préparation d'anticorps spécifiques des hémocytes néoplasiques a été entreprise facilement en raison de la disponibilité des suspensions antigéniques. En effet, cette tumeur concerne les cellules circulantes de l'hémolymphe dont un prélèvement est aisément effectué sans tuer l'animal. De plus, la densité cellulaire (jusqu'à 250.10^6 cellules/ml) et la proportion de cellules néoplasiques chez des moules fortement malades (> 95%), permettent d'obtenir des suspensions antigéniques riches et quasi-pures, sans avoir recours à une quelconque étape de purification préalable. En dépit de ces conditions favorables, la préparation d'anticorps polyclonaux n'a pas permis d'obtenir une spécificité vis-à-vis des hémocytes néoplasiques. L'épuisement des sérums qui consistait à les enrichir en anticorps spécifiques de cellules néoplasiques après fixation sélective des anticorps réagissant avec les cellules normales de moule ne s'est pas révélée efficace. Ce procédé a pourtant été utilisé avec succès pour l'obtention d'immunsérums spécifiques de protozoaires, parasites de Mollusques (Mialhe *et al.*, 1985) mais ne semble pas adapté dans le cas où la proportion d'antigènes communs est prédominante. La production d'anticorps polyclonaux pourrait cependant être envisagée par injection de protéines purifiées par électrophorèse puis transférées sur membrane de nitrocellulose avant d'être injectées avec leur support à des animaux (Diano *et al.*, 1987).

Au vu de ces résultats et pour augmenter la probabilité d'obtenir des anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes néoplasiques, deux types d'immunisation ont été effectués : la technique classique d'immunisation active et un protocole d'immunisation passive. Ce dernier a consisté à obtenir dans un premier temps, un immunsérum spécifique des hémocytes normaux qui a été incubé avec les hémocytes néoplasiques de manière à masquer les antigènes communs aux deux types de cellules et à exacerber les antigènes spécifiques des hémocytes néoplasiques. Dans un deuxième temps, ces hémocytes ont été injectés à des souris dont les splénocytes ont ensuite été prélevés au moment de l'hybridation cellulaire. Toutefois, l'immunsérum de cette souris n'a pas révélé une spécificité accrue vis-à-vis des hémocytes néoplasiques.

Le bilan de la fusion a permis d'analyser l'intérêt et l'efficacité du préclonage. Le but de celui-ci était d'éviter la présence simultanée d'hybridomes de spécificités différentes ou de deux hybridomes dont l'un, non spécifique, se développerait rapidement au détriment de l'autre, spécifique mais plus lent. L'utilisation de la loi de Poisson a permis d'estimer que le nombre moyen d'hybridomes par puits ainsi que la probabilité

d'avoir deux hybridomes ou plus par puits ont été respectivement de 1,08 et 29% dans le cas de l'immunisation active et de 1,55 et 46% dans la cas de l'immunisation passive. Il peut donc être considéré que le préclonage a été satisfaisant dans le premier cas mais insuffisant dans le deuxième. Le protocole de criblage a permis de mettre en évidence précocément trois types d'hybridomes : ceux qui sont spécifiques des hémocytes néoplasiques, des hémocytes normaux, des deux à la fois. Le nombre d'hybridomes sécrétant d'anticorps réagissant à la fois avec les cellules normales et néoplasiques a été nettement plus élevé dans le cas de la souris immunisée de manière passive. Cette différence importante pourrait être liée au pourcentage plus élevé de puits contenant des hybridomes et par conséquent, à la probabilité qu'un plus grand nombre contienne au moins deux hybridomes sécrétant chacun des immunoglobulines réagissant avec un des deux types d'hémocytes.

Le clonage effectué selon trois techniques a montré la limite d'utilisation de l'ELISA en raison de sa moindre sensibilité par rapport à la RIA et l'intérêt de l'IIF en raison de sa grande sensibilité liée à la visualisation directe des immunoréactions.

A l'instar des études réalisées chez les Vertébrés (Miller *et al.*, 1987 ; Jeurissen *et al.*, 1988 ; Takeya *et al.*, 1989 ; Lemieux *et al.*, 1991), les anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes normaux de *M. edulis* et de *M. trossulus* représentent un ensemble de réactifs extrêmement utile pour entreprendre une étude de l'hématopoïèse et de l'ontogénie hémocytaire, chez les Mollusques bivalves. D'ores et déjà, ces réactifs immunologiques, originaux pour les bivalves, ont permis d'identifier des sous-populations antigéniques, comme cela a été précédemment réalisé chez deux gastéropodes *Biomphalaria glabrata* (Yoshino and Granath, 1983) et *Lymnaea stagnalis* (Dikkeboom *et al.*, 1985 ; Dikkeboom *et al.*, 1988).

Les hybridomes sécrétant des AcMs spécifiques des hémocytes normaux ayant été clonés selon une méthode RIA, il était important de vérifier histologiquement la spécificité cellulaire de la réaction immunologique. Bien que différents profils de fluorescence aient été observés par IIF, cette technique permettait difficilement de les associer avec une morphologie particulière des hémocytes et de définir aisément des sous-populations antigéniques. La localisation cellulaire des antigènes a donc été précisée en utilisant une technique d'immunoperoxydase indirecte. Quatre classes d'anticorps monoclonaux ont pu ainsi être définies sur la base de l'intensité de marquage et de la réactivité vis-à-vis des types morphologiques identifiés pour les hémocytes de *M. edulis* (Lowe and Moore, 1978).

La localisation subcellulaire des épitopes s'accorde avec cette classification et autorise une interprétation de l'ensemble de ces résultats. L'épitope reconnu par l'anticorps de la classe I (13B9-2F8), localisé uniquement dans les granules des

granulocytes à petits granules, pourrait être associé à une protéine lysosomiale. En effet, les granules des granulocytes ont été assimilés à des lysosomes en raison de leur contenu riche en différentes enzymes hydrolytiques qui ont été mises en évidence essentiellement par des techniques cytochimiques (Moore and Gelder, 1985). Cependant, peu d'activités enzymatiques ont été localisées au niveau ultrastructural (Yoshino and Cheng, 1976 ; Chagot, 1989). Chez *M. edulis*, plusieurs enzymes hydrolytiques ont été détectées dans les granules et une cathepsine G a été localisée uniquement dans les granulocytes à petits granules (Pipe, 1990b). Le fait que l'anticorps de classe I réagisse seulement avec les granulocytes à petits granules sans une graduation de marquage sur les granulocytes à grands granules laisserait supposer que les antigènes reconnus par cet anticorps soient probablement exprimés précocement dans le processus de maturation cellulaire, leur disparition précoce ne permettant pas de les détecter sur les granulocytes à grands granules.

Les antigènes détectés par les AcMs regroupés dans la classe II n'étant associés à aucun organite particulier, pourraient correspondre à des protéines structurales.

Bien que les antigènes associés aux anticorps appartenant à la classe IV soient détectés sur les deux types de granulocytes, ils ne sont pas toujours présents sur les granulocytes à petits granules alors qu'ils sont toujours exprimés sur les granulocytes à grands granules. Il est possible que ces anticorps reconnaissent des antigènes de différenciation qui apparaissent progressivement durant le processus de maturation des hémocytes granuleux. De manière à argumenter en faveur d'une différenciation cellulaire, il serait intéressant de comparer des hémogrammes provenant d'individus jeunes et adultes, parallèlement à la mise en évidence d'une expression différentielle des épitopes reconnus par l'anticorps de classe I, comme cela a été montré chez le Mollusque gastéropode *Lymnaea stagnalis* (Dikkeboom *et al.*, 1985). Un autre procédé pourrait consister à "saigner à blanc" des animaux et à suivre le rétablissement des hémogrammes. Une réponse plus absolue pourrait être fournie par l'analyse du processus de maturation des hémocytes *in vitro*, comme pratiqué chez les Vertébrés (Falkenberg *et al.*, 1989). Ceci n'est cependant pas encore possible chez les Mollusques en raison de l'inadéquation des techniques de culture cellulaire (Mialhe *et al.*, 1988), en particulier pour les hémocytes (Hervio, 1992).

La détermination des poids moléculaires des protéines reconnues par les AcMs spécifiques apportent des précisions supplémentaires, bien qu'elles correspondent à des résultats encore préliminaires. La caractérisation de ces protéines devra être poursuivie selon des techniques de biochimie, qui seront largement facilitées par la disponibilité des anticorps monoclonaux, ceux-ci étant particulièrement utiles pour des immunopurifications et pour des analyses de banques d'ADNc en vecteurs d'expression. Ce type de recherches, qui sortaient du cadre des compétences des équipes de

Fig. 44 : Principales caractéristiques permettant de différencier les sous-populations d'hémocytes de *Mytilus edulis*, en fonction de leur réactivité avec les AcM spécifiques, leur morphologie, la présence de lectines et leur contenu en enzymes lysosomiales
(ND : non déterminé)

type morphologique (Lowe & Moore, 1978)	cellule souche	hyalinocytes basophiles	granulocytes basophiles	granulocytes éosinophiles
réaction antigénique: AcM de classe I AcM de classe II AcM de classe III AcM de classe IV		- - - -	+ + + - à +	- + + +
classification ultra- structurale (Pipe, 1990a)		hyalinocytes	granulocytes à petits granules	granulocytes à grands granules
reconnaissance de lectines (Pipe, 1990a)		ND	HPA + sur les granules	WGA + sur les granules
contenu en enzymes lysosomiales (Pipe, 1990b)		ND	cathepsine G	élastase/arylsulpha- tase/β-glucuronidase

BATTELLE et de l'IFREMER, pourrait être développé dans un proche avenir, par le biais de collaborations.

L'apport des anticorps monoclonaux a été important car ils ont permis d'associer des critères antigéniques à ceux morphologiques (Lowe and Moore, 1978), ultrastructuraux et fonctionnels, déjà établis (Pipe, 1990a ; 1990b). Cet auteur identifie différents types cellulaires selon la taille des granules, la reconnaissance de certaines lectines et le contenu en enzymes lysosomiales (Fig. 44). L'intégration des différentes données sont en accord avec l'existence d'au moins trois types hématocytaires chez *M. edulis* : des hyalinocytes basophiles, des granulocytes basophiles qui renferment des petits granules et des granulocytes éosinophiles, caractérisés par la présence de grands granules.

Du point de vue ontogénie et filiation des sous-populations hématocytaires, la disponibilité des AcMs ne résoud pas les divergences d'opinion qui existent entre Cheng (1981) et Lowe et Moore (1978). Le premier reconnaît les hyalinocytes d'une part, et les granulocytes basophiles, précurseurs des granulocytes éosinophiles d'autre part. Les autres proposent deux lignées hématocytaires : une lignée basophile regroupant les hyalinocytes et les granulocytes basophiles et une lignée comportant les granulocytes éosinophiles. Nos résultats s'accordent mieux avec la première hypothèse. En effet, l'immunomarquage obtenu avec les anticorps de classe IV présente une intensité variable sur les granulocytes basophiles (coloration négative à plus ou moins forte) et toujours intense sur les granulocytes éosinophiles. De plus, une hétérogénéité de la taille des cellules et des noyaux observée au sein des granulocytes basophiles pourrait indiquer un processus de maturation cellulaire. Il serait ainsi possible de proposer l'existence d'une lignée granulocytaire, la position des hyalinocytes ne pouvant pas être précisée, à l'heure actuelle, dans un tel schéma (Fig. 44).

La disponibilité d'anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes néoplasiques doit permettre de préciser les modifications antigéniques et à terme, le mécanisme de transformation. Dans un premier temps, la spécificité des anticorps monoclonaux a été testée vis-à-vis des deux types de cellules néoplasiques polyploïdes rencontrées, leur contenu en ADN étant évalué par cytométrie de flux à approximativement $4n$ ou $5n$ (Elston *et al.*, 1990). A l'échelle de la population, 66 % des moules néoplasiques présentent uniquement des hémocytes pentaploïdes, 29 % des animaux malades renferment des cellules tétraploïdes et seulement 5 % des individus possèdent les deux types de cellules polyploïdes simultanément (Moore *et al.*, 1991a). Différentes hypothèses ont été avancées quant à la signification d'un point de vue étiologique de ces deux types de cellules polyploïdes qui représenteraient deux formes séparées de la maladie (Moore *et al.*, 1991a). Il est suggéré que la transformation soit liée à des aberrations chromosomiques spécifiques, résultant d'une infection par un rétrovirus qui

en s'intégrant en un ou plusieurs sites dans le génome de l'hôte provoquerait une des deux formes de la maladie. Une seconde alternative réside dans la possibilité que ces cellules polyploïdes correspondent à des tissus différents, infectés par un même agent. Enfin, les deux types de cellules résulteraient d'une infection par des agents différents pouvant induire la même pathologie.

La réactivité des AcMs en fonction du degré de ploïdie des hémocytes néoplasiques a été évaluée soit sur coupes histologiques, soit sur cytocentrifugations de cellules néoplasiques. Les anticorps monoclonaux appartenant aux classes A et B apparaissent spécifiques des hémocytes néoplasiques alors que ceux des classes C et D semblent spécifiques de l'espèce *M. trossulus*. S'il est clair que les anticorps de classe A réagissent spécifiquement avec les hémocytes néoplasiques 4n de *M. trossulus*, il est plus difficile de déterminer la spécificité liée au degré de ploïdie dans le cas des AcMs de classe B. Ceux-ci reconnaissent vraisemblablement les cellules 5n, en proportion variable selon l'origine géographique des individus. Des résultats récents ont d'ailleurs confirmé que l'anticorps 14F1-5E9 ne réagit pas sur les hémocytes 4n (Moore, comm. pers.). La réactivité de cet AcM sur quelques cellules parmi les hémocytes 4n de moules provenant de Sequim Bay pourrait correspondre à la détection d'une deuxième population mineure de cellules 5n. Le fait que cette population pentaploïde n'ait pas été détectée par l'analyse en cytométrie de flux peut s'expliquer par la limite de sensibilité de la technique dont le seuil de détection est estimé à 2-3% (Moore *et al.*, 1991a). Les modifications antigéniques associées aux cellules néoplasiques apparaissant spécifiques de l'un ou de l'autre type de cellules polyploïdes suggèrent que les processus de transformation soient différents.

Des réactions positives ont été obtenues avec tous les anticorps testés sur des hémocytes préparés selon la technique des cytocentrifugations, soulignant la "douceur" du traitement. Ainsi, plusieurs anticorps qui avaient été identifiés comme spécifiques des hémocytes néoplasiques lors de la fusion se sont révélés réagir aussi vis-à-vis des hémocytes normaux des moules originaires du Puget Sound. Ceci s'explique par le fait qu'au moment de l'hybridation lymphocytaire, les moules du Puget Sound étaient considérées comme appartenant à l'espèce *M. edulis*. Pour éviter des risques de contamination par des hémocytes néoplasiques, les hémocytes normaux utilisés lors du criblage des hybridomes comme "test négatif", ont été prélevés à partir de moules *M. edulis* de Marennes-Oléron. Ainsi, le protocole de criblage introduisait un critère de sélection relatif à l'espèce *M. trossulus*.

En ce qui concerne la compréhension du processus de transformation, il peut être partiellement appréhendé par la mise en évidence de protéines reconnues par les anticorps spécifiques des hémocytes néoplasiques. Ainsi, les AcMs de classe A sont

spécifiques des hémocytes tétraploïdes et réagissent avec des antigènes nucléaires correspondant à deux protéines de poids moléculaires de l'ordre 30 et 40 kDa. En fait, ces protéines sont exprimées également dans les cellules normales et les deux types d'hémocytes néoplasiques polyploïdes, tel que le suggère la réactivité avec les AcMs de classe C. Il apparaît donc probable que les anticorps de classe A et C reconnaissent des épitopes différents de protéine(s) identique(s). Cependant, lors du processus de transformation, ces protéines semblent modifiées de telle sorte qu'un nouveau déterminant antigénique reconnu par les AcMs de classe A apparaisse. Il est difficile de préciser, à l'aide de ces données préliminaires, si le processus de transformation concerne les deux protéines identifiées ou bien la protéine de 30 kDa ou celle de 40 kDa. Cette dernière est observée à la fois dans les deux types d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* et dans les hémocytes normaux de *M. edulis* alors que la protéine de 30 kDa n'est pas détectée dans les hémocytes normaux de *M. edulis*. Des expériences complémentaires doivent être entreprises pour détecter ou non la présence de cette molécule dans les hémocytes normaux de *M. trossulus*. De plus, la protéine de 30 kDa semble, d'un point de vue quantitatif, être exprimée préférentiellement dans les hémocytes néoplasiques 4n. L'ensemble de ces observations suggère donc que la protéine de 30 kDa soit impliquée dans la modification des hémocytes polyploïdes 4n, sans exclure pour autant le rôle possible de la protéine de 40 kDa.

Les épitopes des deux protéines de 95 et 170 kDa reconnues par les AcMs de classe B semblent spécifiques des hémocytes néoplasiques de degré de ploïdie estimé à 5n, bien que certaines populations de moules pentaploïdes ne possèdent ce déterminant antigénique que sur un faible pourcentage d'hémocytes néoplasiques. Au niveau du profil électrophorétique, les bandes correspondant à ces deux protéines sont quantitativement plus faibles chez les hémocytes néoplasiques 4n et absentes chez les hémocytes normaux de *M. edulis*, au seuil de détection de la coloration à l'argent. Ces données suggèrent que ces deux protéines soient associées à la transformation d'au moins une partie des hémocytes néoplasiques 5n et que les modifications antigéniques ne soient pas strictement associées au degré de ploïdie. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer notamment, si la protéine de 170 kDa correspond à un polymère de la protéine de 95 kDa. Leur nature et leur rôle respectifs dans l'apparition du phénotype transformé restent à analyser. Il semble possible d'associer la protéine de 170 kDa reconnue par les AcMs de classe B et celle de 200 kDa, réagissant avec l'AcM IEII spécifique des hémocytes néoplasiques chez *Mya arenaria* (Miosky *et al.*, 1989). En effet, outre un poids moléculaire voisin, les protéines sont localisées au niveau de la membrane plasmique. De plus, l'AcM IEII réagit avec des cellules du tissu conjonctif chez les animaux malades (Smolowitz *et al.*, 1989). Ce type de réactivité a également été observé chez *M. trossulus* avec les anticorps de classe

B (données non présentées : Moore, comm. pers.). Il serait important de rechercher une réactivité des AcMs IEII spécifiques de *M. arenaria* et de classe B spécifiques de *M. trossulus* sur les hémocytes néoplasiques de l'espèce hétérologue.

Les résultats sur la localisation sub-cellulaire et le poids moléculaire des protéines reconnues par les AcMs doivent être considérés en relation avec les données existantes sur les oncoprotéines identifiées chez les Vertébrés ou des protéines virales. Les protéines de 170 et 90 kDa, détectées par les AcMs de classe B et localisées sur la membrane plasmique, pourraient correspondre à des récepteurs de facteurs de croissance transmembranaires (Ullrich and Schlessinger, 1990). La taille des poids moléculaires ne permet pas de les associer à des protéines rétrovirales d'enveloppe associées à la membrane plasmique. La nature virale des protéines de 40 ou 30 kDa, reconnues par les AcMs de classe A, semble improbable en raison de leur localisation nucléaire. Comme précédemment la caractérisation des protéines reconnues par ces AcMs devra être poursuivie au sein d'équipes spécialisées dans ce domaine et en exploitant la disponibilité d'anticorps spécifiques.

Concernant les AcMs spécifiques des hémocytes normaux, il est difficile d'expliquer la signification de la perte de ces déterminants antigéniques lors du processus de transformation des hémocytes néoplasiques, sans caractérisation biochimique déterminant la nature de ces protéines. Une altération dans l'organisation du cytosquelette des hémocytes néoplasiques chez *M. arenaria* est suggérée par une coloration différentielle des filaments d'actine et leur incapacité à former des pseudopodes (Beckmann *et al.*, 1992). Outre la perte de protéines structurelles, des molécules fonctionnelles, notamment des protéines enzymatiques (Klebanoff and Clark, 1978) peuvent ne plus être exprimées au cours de processus de dédifférenciation observés chez des cellules tumorales.

Les anticorps monoclonaux spécifiques des hémocytes néoplasiques constituent dès à présent, des réactifs performants pour diagnostiquer la néoplasie hémocytaire. L'immunodosage de type ELISA a été envisagé de manière à permettre l'analyse d'un grand nombre d'échantillons, ce qui est primordial pour réaliser des contrôles épidémiologiques à grande échelle. Un dosage de type sandwich a été retenu car cette technique permet de retenir spécifiquement, grâce à un anticorps de capture, des antigènes présents dans des liquides biologiques complexes (Yolken, 1982 ; Taylor *et al.*, 1986) et l'hémolymphe (Cochennec *et al.*, 1992). La préparation de conjugués a permis de concevoir un test direct évitant une étape supplémentaire lors de la détection. La mise au point du protocole d'immunodosage s'est révélée satisfaisante puisqu'un seuil de détection a pu être estimé à 10 hémocytes néoplasiques/ μ l d'hémolymphe. Sur la

base d'une étude clinique, la spécificité de l'ELISA a été vérifiée et sa sensibilité pourrait être suffisante pour une application épidémiologique. Cependant, un certain nombre de problèmes demeurent et notamment le fait que certains échantillons soient diagnostiqués négatifs par ELISA alors qu'une analyse histologique les révèle positifs. Il faut rappeler que les AcMs utilisés dans cet immunodosage reconnaissent des cellules néoplasiques 5n. Les faux-négatifs peuvent donc être attribués à des cellules 4n, non reconnues par ces anticorps. Un mélange de deux AcMs reconnaissant chacun une des deux formes de la néoplasie pourrait être envisagé de manière à éviter ce type de problème. A cours terme, il n'a pas été jugé primordial d'essayer d'accroître la sensibilité de l'ELISA car l'utilisation d'immunodiagnostic, même disponible sous forme de kit commercial reste encore peu fréquent en aquaculture. En effet, le nombre de laboratoires équipés pour utiliser un tel dosage est restreint et les législations nationales et internationales concernant les modalités de contrôles zoosanitaires de coquillages sont encore balbutiantes.

L'immunodiagnostic par IIF est, par contre, beaucoup plus facile à mettre en oeuvre dès à présent pour la majorité des laboratoires de contrôles, ce type de test ayant par ailleurs déjà fait ses preuves pour le contrôle épidémiologique de protozoaires de Mollusques, tels que *Bonamia ostreae* (Boulo *et al.*, 1989a). Bien que cette technique ne permette pas une aussi grande rapidité d'échantillonnage que l'ELISA, son intérêt réside dans son extrême sensibilité liée à la visualisation directe de l'immunofluorescence. Appliquée à la recherche de réactivité des anticorps monoclonaux vis-à-vis d'hémocytes de moules néoplasiques provenant de différents pays, elle s'est révélée particulièrement intéressante. En effet, les deux AcMs utilisés ont montré une très forte réactivité sur des moules *M. edulis*, originaires de la côte ouest, où les populations de *M. edulis* et *M. trossulus* sont sympatriques et de la côte est des Etats-Unis et qui présentait une importante infiltration d'hémocytes anormaux morphologiquement similaires à ceux décrits dans cette étude. Ces proliférations antigéniquement identiques à la néoplasie hémocytaire des moules du Puget Sound soulèvent à nouveau le problème de l'extension de la maladie à des zones géographiques encore indemnes. Il faut rappeler le transfert du protozoaire *Bonamia ostreae* de la côte ouest des Etats-Unis aux côtes européennes lors d'importations de naissains et l'épizootie qu'il a rapidement provoqué, la parasitose sévissant actuellement de façon endémique (Hervio, 1992). Bien que les moules des côtes atlantiques européennes présentent occasionnellement des néoplasies hémocytaires, les quelques échantillons analysés n'ont pas montré de réactions croisées avec les deux AcMs testés, excepté pour un individu originaire de Marennes-Oléron. Il faut toutefois prendre en considération la nature infectieuse de cette maladie qui semble d'ores et déjà implantée dans des sites différents.

A l'échelle des populations de *M. trossulus* aux Etats-Unis, l'utilisation en IIF des deux classes A et B d'AcMs permet d'aboutir à une évaluation individuelle de la polyploïdie d'une population d'hémocytes néoplasiques, la seule méthode fiable, à ce jour, étant la cytométrie de flux. Celle-ci n'est d'ailleurs pas utilisable pour un diagnostic précoce de la maladie car la détermination de la pentaploïdie nécessite une proportion de 2 à 3% d'hémocytes néoplasiques et l'estimation de la tétraploïdie est encore moins sensible. En effet, la proportion de cellules 4n doit être anormalement importante pour la différencier des cellules normales en cours de multiplication. En pratique, la présence de deux populations 4n et 8n correspondant au cycle cellulaire des hémocytes néoplasiques est une garantie de diagnostic (Moore *et al.*, 1991a). Compte tenu de la rapidité de préparation des échantillons et de la sensibilité d'estimation de la ploïdie des hémocytes néoplasiques, une technique de type IIF utilisant en parallèle deux anticorps monoclonaux (de classe A et B) devrait être appliquée à l'étude du processus de polyploïdisation qui est encore mal compris. Ce travail sera poursuivi par l'équipe de BATTELLE.

RESULTATS - CHAPITRE III

**CARACTERISATION FONCTIONNELLE
DES HEMOCYTES**

L'analyse immunofonctionnelle des hémocytes normaux de *M. edulis* a été entreprise pour l'étude du métabolisme oxydatif afin de préciser les mécanismes de cytoxicité associés à la phagocytose. Ensuite, les hémocytes néoplasiques ont été analysés pour déterminer s'ils présentent des modifications fonctionnelles pouvant correspondre à une immunodéficiência. Les interactions entre hémocytes normaux et néoplasiques ont été étudiées *in vitro*, notamment pour tenter d'expliquer les phénomènes de rémission observés *in vivo* chez *M. trossulus* et la moindre sensibilité de *M. edulis* à des transplantations d'hémocytes néoplasiques.

1. CAPACITES DE PHAGOCYTOSE D'HEMOCYTES NORMAUX DE MYTILUS EDULIS

1.1. Analyse du "burst" respiratoire d'hémocytes normaux par mesure de la chimioluminescence (LDCL)

Sauf indication contraire, chaque expérience a été réalisée sur des échantillons regroupant des prélèvements d'hémolymphe issue de plusieurs individus et a été répétée au moins deux fois pour assurer la reproductibilité des résultats.

1.1.1. Détermination et optimisation des paramètres expérimentaux

Deux types de stimulus des hémocytes ont été utilisés : chimique (PMA) ou particulaire (zymosan). Différentes concentrations de PMA ont été testées pour un nombre d'hémocytes constant ($2 \cdot 10^5/2$ ml/fiole). Les résultats reportés dans la figure 45A indiquent que la concentration de $1 \mu\text{g/ml}$ de PMA permet d'obtenir le signal de LDCL le plus élevé.

L'effet de différents rapports particules de zymosan/hémocyte a parallèlement été mesuré pour deux concentrations en hémocytes : $2 \cdot 10^5$ et $4 \cdot 10^5/2$ ml/fiole. La réponse de LDCL observée a été d'autant plus importante que le rapport zymosan/hémocyte est grand. De plus, elle a été proportionnelle au nombre de cellules stimulées (Fig. 45B). La mesure de LDCL la plus élevée correspond au rapport stimulus/hémocyte testé le plus grand. Les valeurs de LDCL observées, quelles que soient les concentrations en particules de zymosan, ont été très nettement supérieures à celles obtenues avec un stimulus chimique.

Au vu de ces résultats, le zymosan a été choisi comme stimulus. Le nombre de $2 \cdot 10^5$ hémocytes/2 ml/fiole et le rapport zymosan/hémocyte de 80/1 ont été retenus comme

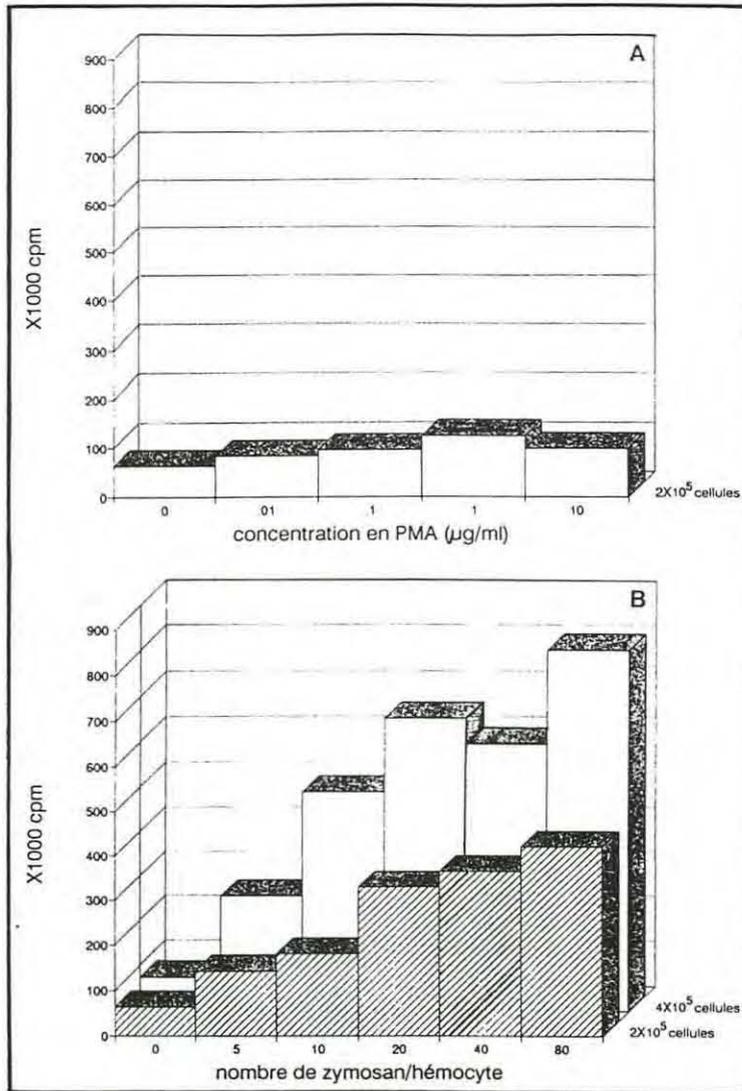


Fig. 45 : Détermination des paramètres expérimentaux pour les mesures de LDCL (les valeurs correspondent aux pics d'activité)

- A : effet d'une stimulation par du PMA à différentes concentrations ($2 \cdot 10^5$ hémocytes/2 ml/fiole)**
- B : effet d'une stimulation par du zymosan à différentes concentrations, en fonction du nombre d'hémocytes ($2 \cdot 10^5$ ou $4 \cdot 10^5$ hémocytes/2 ml/fiole)**

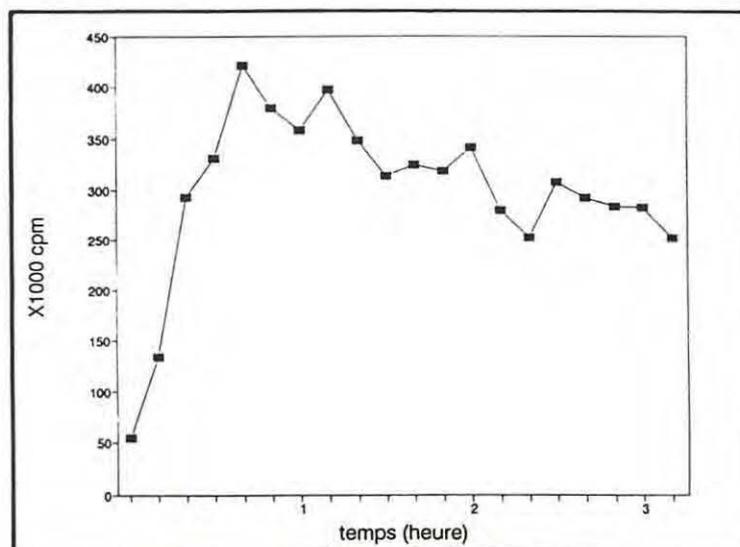


Fig. 46 : Courbe représentative d'une réponse de LDCL en fonction du temps ($2 \cdot 10^5$ hémocytes/fiole ; 80 zymosan/hémocyte)

paramètres fixes dans les expériences ultérieures. Dans ces conditions, il est possible d'obtenir une activité de LDCL facilement détectable pour plusieurs échantillons strictement identiques puisque préparés à partir d'un seul prélèvement d'hémolymphe (environ $1 \text{ à } 3.10^6$ hémocytes).

Une courbe représentative de l'activité de LDCL d'un échantillon d'hémolymphe stimulé par du zymosan a montré une rapide augmentation du signal qui a atteint un pic d'activité au bout de 30 à 40 min après stimulation, suivie d'une décroissance lente sur quelques heures (Fig. 46).

1.1.2. Mesure de l'activité de LDCL sur des échantillons individuels d'hémolymphe

Les réponses de LDCL des hémocytes provenant de différents individus, obtenues après stimulation par des particules de zymosan, ont varié considérablement en intensité (Fig. 47). Les valeurs étant comprises entre 110.10^3 cpm et 660.10^3 cpm (valeur moyenne : 264.10^3 cpm \pm 173.10^3 cpm). Les activités de base, observées en l'absence de stimulation ont été par contre très similaires (valeur moyenne : $40.10^3 \pm 9,3.10^3$ cpm).

1.1.3. Mesure de l'activité de LDCL de sous-populations hémocytaires

A partir d'hémocytes vivants, une centrifugation isopycnique sur gradient discontinu de Percoll (10/20/30/40/50 %) (voir Matériels et Méthodes) a permis de séparer quatre populations aux différentes interfaces du gradient. Les deux bandes majeures ont été situées aux interfaces 30-40 % et 40-50 %. Un petit nombre de cellules a migré au culot (50 % de Percoll).

Les hémocytes recueillis aux interfaces 30-40 % et 40-50 % ont répondu à une stimulation par du zymosan et les valeurs des pics d'activité obtenues ont été supérieures à la réponse de la population initiale mixte, les nombres de cellules étant par ailleurs identiques (Fig. 48A). Une activité comparable à celle de l'hémolymphe a été enregistrée avec les hémocytes de l'interface 10-20 %, alors qu'une très faible activité a été mesurée avec les cellules collectées à l'interface 20-30 %.

Pour vérifier que la solution de Percoll n'ait pas de rôle inhibiteur sur la LDCL, des échantillons d'hémocytes identiques ont été incubés en parallèle dans différentes concentrations de Percoll. Une légère diminution de la réponse de LDCL a été observée lorsque les hémocytes ont été incubés dans des concentrations de 20, 40 et 50 % de

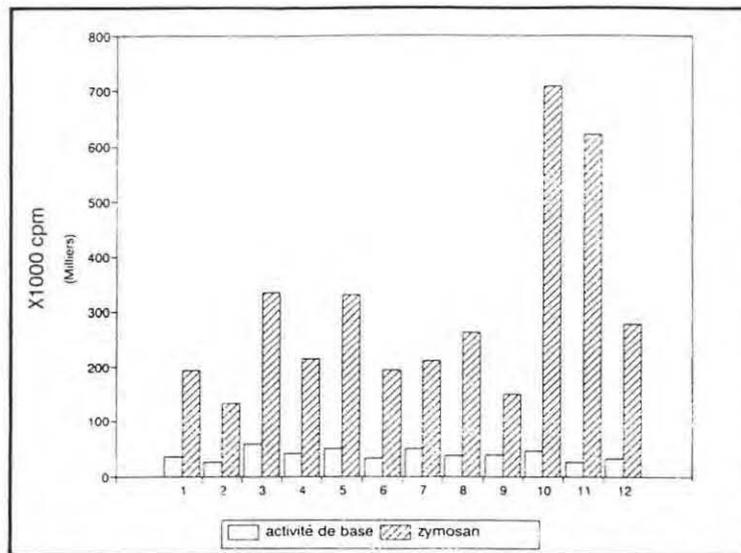


Fig. 47 : Variabilité individuelle de la réponse de LDCL (les valeurs correspondent aux pics d'activité) n^{os} 1 à 12 : hémocytes provenant de 12 individus *M. edulis* ($2 \cdot 10^5$ hémocytes/2 ml/fiole ; 80 zymosan/hémocyte)

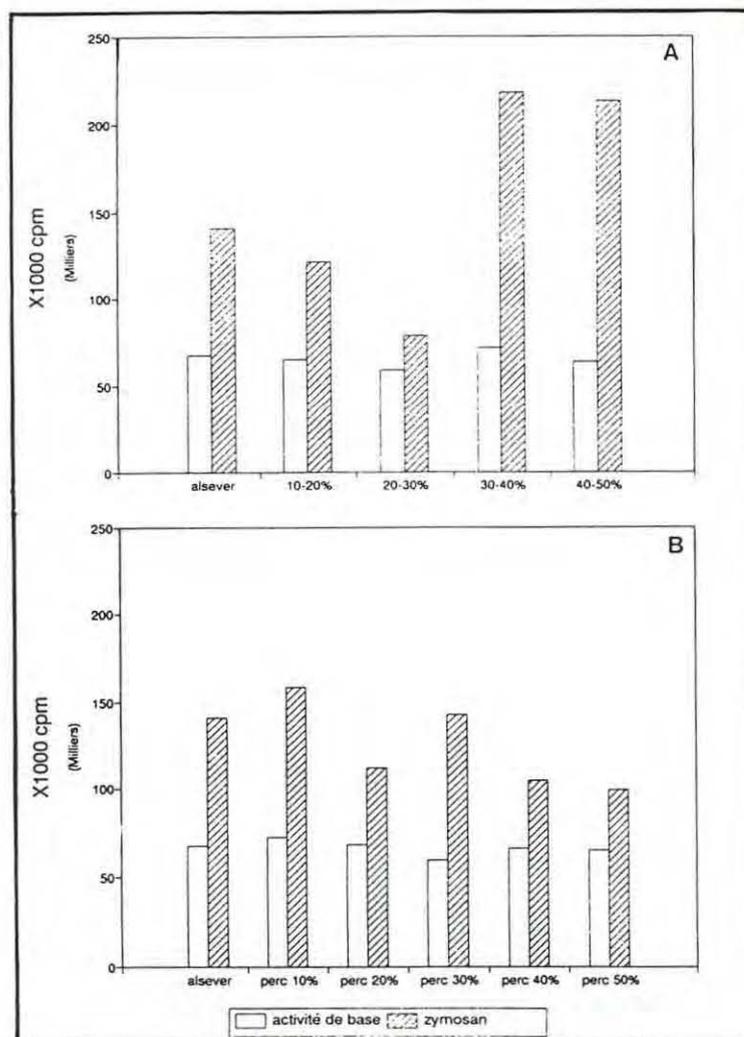
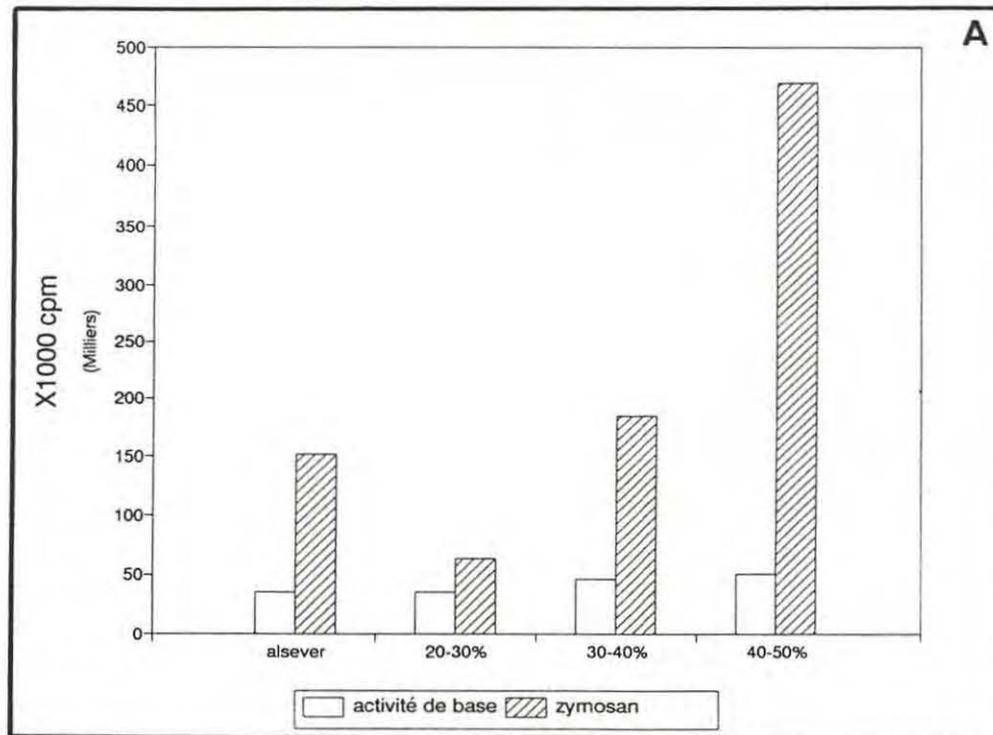


Fig. 48 : A- Réponses de LDCL (pics d'activité) de sous-populations d'hémocytes ($2 \cdot 10^5$ cellules/fiole ; 80 zymosan/hémocyte), collectés aux interfaces d'un gradient de Percoll, après séparation isopycnique B- Effet d'une incubation dans différentes concentrations d'une solution de Percoll sur la réponse de LDCL de la population totale d'hémocytes, utilisée pour la séparation isopycnique ($2 \cdot 10^5$ hémocytes/2 ml/fiole)



B

AcM	13B9-2F8 +		13B9-2F8 -	
	granulocytes basophiles	hyalinocytes	granulocytes éosinophiles	
20-30%	48%	27%	25%	
30-40%	41%	14%	45%	
40-50%	22%	15%	63%	

Fig. 49 : A- Réponses de LDCL (pics d'activité) de sous-populations d'hémocytes ($2 \cdot 10^5$ cellules/fiole ; 80 zymosan/hémocyte) collectés aux interfaces d'un gradient de Percoll, après séparation isopycnique
B- Immunoréactivité de l'AcM 13B9-2F8 sur les hémocytes de *M. edulis* collectés aux interfaces du gradient de Percoll, testée par I.I.F. et estimation du pourcentage de cellules positives

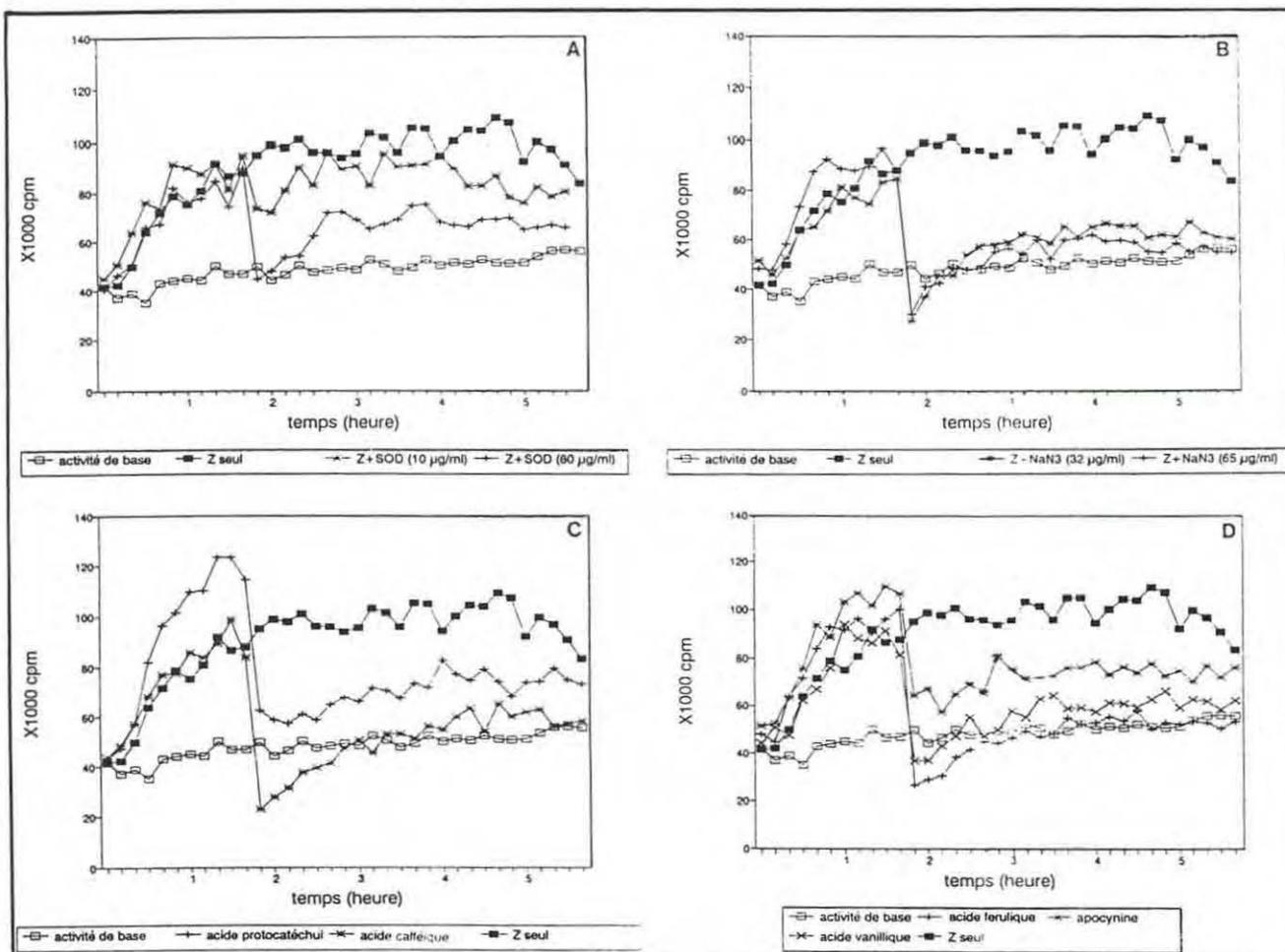


Fig. 50 : Effet de différents inhibiteurs sur la réponse de LDCL, en fonction du temps ($2 \cdot 10^5$ hémocytes/fiole ; 80 zymosan/hémocyte)
A : effet de la superoxyde dismutase, à différentes concentrations
B : effet de l'azide de sodium, à différentes concentrations
C : effet de catéchols, à différentes concentrations
D : effet de O-méthoxy catéchols, à différentes concentrations

Percoll (Fig. 48B), alors que la LDCL n'a pas été modifiée pour une concentration de 10 et 30 %.

Une expérience complémentaire a été réalisée pour essayer de caractériser les populations hématocytaires séparées isopycniquement sur la base de critères morphologiques et antigéniques, en intégrant simultanément leur capacité de phagocytose liée à l'activité de LDCL. Dans ce but, des hématocytes ont été collectés aux interfaces d'un gradient de Percoll et utilisés d'une part, pour effectuer des mesures de LDCL et d'autre part, pour préparer des lames qui seront analysées en IIF en vue de déterminer le pourcentage de cellules réagissant avec l'anticorps de classe I (13B9-2F8), spécifiques des granulocytes basophiles. Ainsi, les cellules fluorescentes correspondent à des granulocytes basophiles et les cellules non réactionnelles sont séparées selon un critère de taille, les petites cellules étant assimilées à des hyalinocytes et les grandes cellules à des granulocytes éosinophiles. Les valeurs de LDCL ont été de l'ordre de l'activité de base pour les hématocytes de l'interface 20-30 %, alors qu'elles ont été similaires à celles de la population totale pour les hématocytes collectés à l'interface 30-40 % et bien supérieures avec les cellules recueillies à l'interface 40-50 % (Fig. 49A). Parallèlement, le pourcentage de cellules de l'interface 40-50 %, positives en IIF a été plus faible que celui des cellules des interfaces 30-40 % ou 20-30 %. Le nombre de grandes cellules qui ont été négatives en IIF et assimilées de ce fait à des granulocytes éosinophiles, a augmenté progressivement avec la densité de Percoll (Fig. 49B). Ces résultats suggèrent que les granulocytes éosinophiles aient des capacités plus grandes de générer des radicaux oxygène que les autres types cellulaires.

1.2. Effet de différents inhibiteurs sur l'activité de LDCL

1.2.1. Mobilisation de l'ion superoxyde

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la formation de H₂O₂ à partir de l'ion superoxyde, selon une réaction de dismutation :



Au moment du pic d'activité, l'ajout de SOD à la concentration finale de 10 µg/ml a peu affecté le signal de LDCL (Fig. 50A). Par contre, à la concentration de 80 µg/ml la LDCL a été fortement réduite.

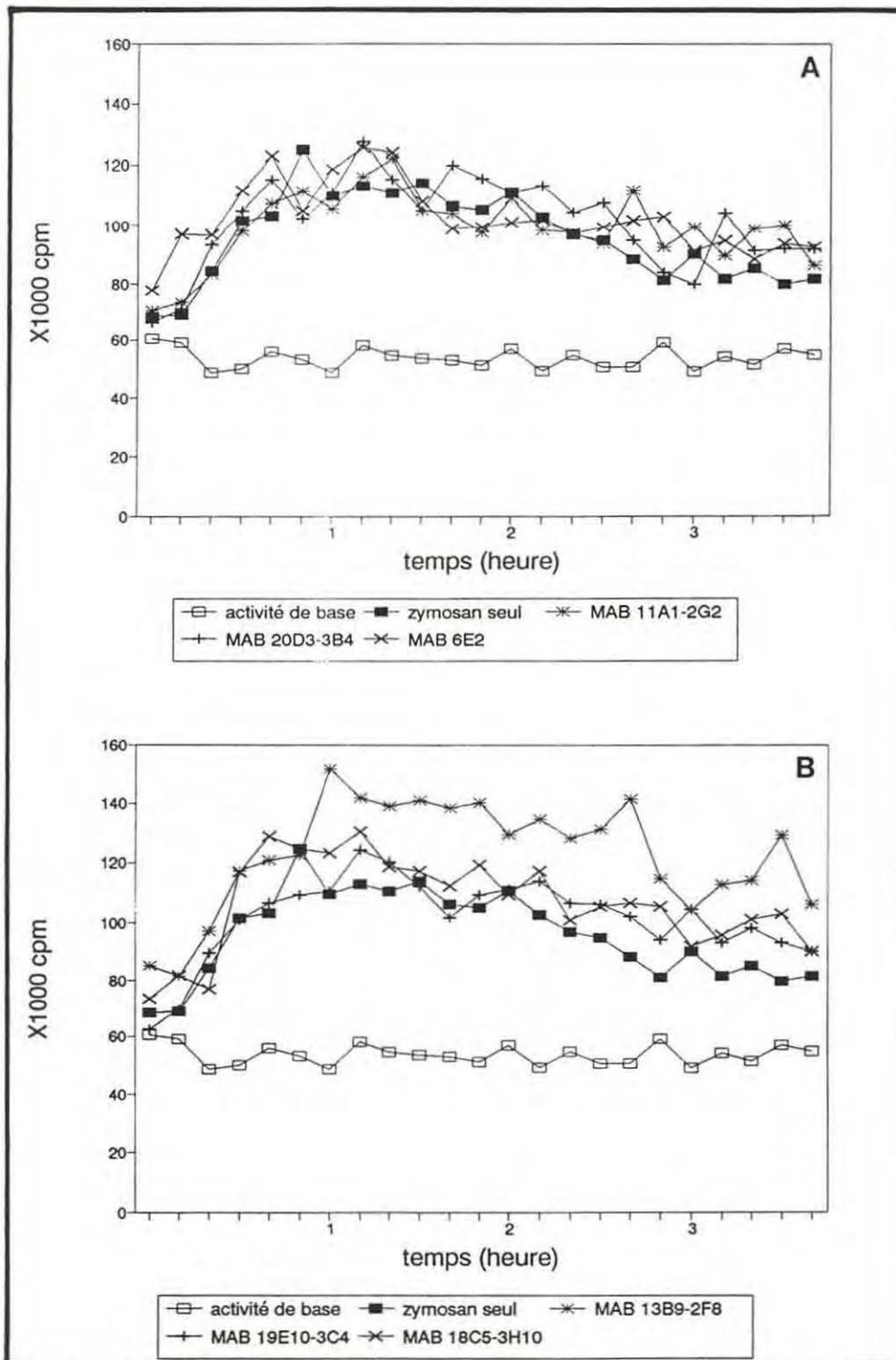


Fig. 51 : Effet sur l'activité de LDCL d'une incubation des hémocytes dans des surnageants de culture contenant des AcMs spécifiques ($2 \cdot 10^5$ cellules/2 ml/fiole ; 80 zymosan/hémocyte)
A : effet des AcMs de classe III (11A1-2G2) et IV (20D3-3B4 et 6E2)
B : effet des AcMs de classe I (13B9-2F8) et II (19E10-3C4 et 18C5-3H10)

1.2.2. Inhibition de la peroxydase

L'effet de l'azide de sodium (NaN_3), mobilisateur de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ et inhibiteur métabolique de la peroxydase mais aussi de la catalase, est mesuré au moment du pic d'activité.

L'addition de NaN_3 , quelle que soit la concentration utilisée (32 et 65 $\mu\text{g/ml}$), a provoqué une chute rapide de la réponse de LDCL au-dessous de l'activité de base (Fig. 50B). L'activité de LDCL s'est stabilisée ensuite rapidement au niveau de l'activité de base (approximativement 50.10^3 cpm).

1.2.3. Inhibition de la NADPH oxydase

Les phénols de type catéchol sont convertis en quinones après réaction avec le peroxyde d'hydrogène et empêchent l'assemblage d'une NADPH-oxydase fonctionnelle à la surface de la membrane plasmique, inhibant ainsi la formation d'ions superoxyde.

Une réduction importante de la LDCL a été enregistrée dès l'addition, au moment du pic d'activité, des phénols de type catéchol (acide protocatéchuique et acide cafféique). L'activité de LDCL s'est ensuite stabilisée progressivement au niveau de l'activité de base ou légèrement au-dessus dans le cas de l'acide protocatéchuique (Fig. 50C).

Une réduction similaire de la réponse de LDCL a été observée lors de l'addition de catéchols O-méthoxy-substitués : acide vanillique, acide ferulique et apocynine (Fig. 50D).

1.3. Effet des AcMs spécifiques des hémocytes de *M. edulis*

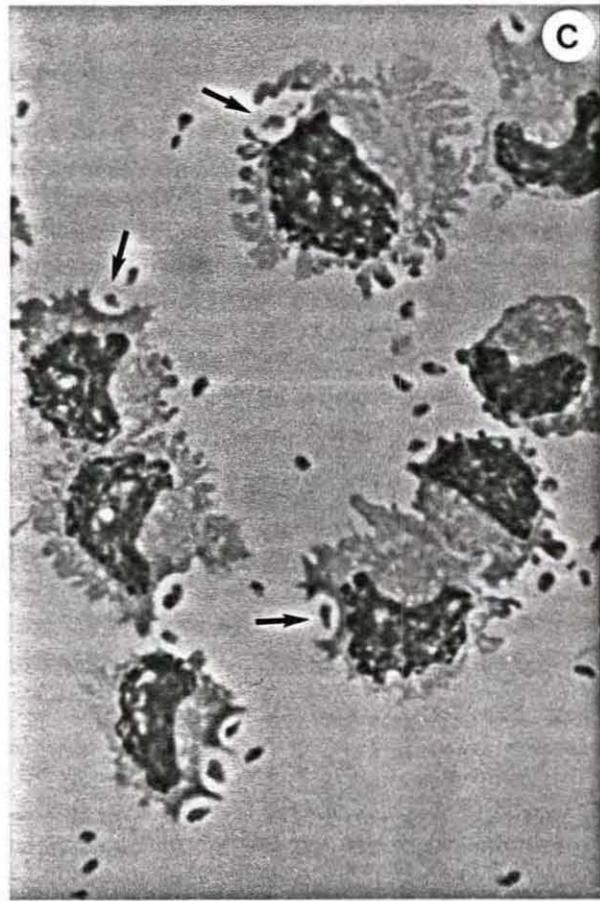
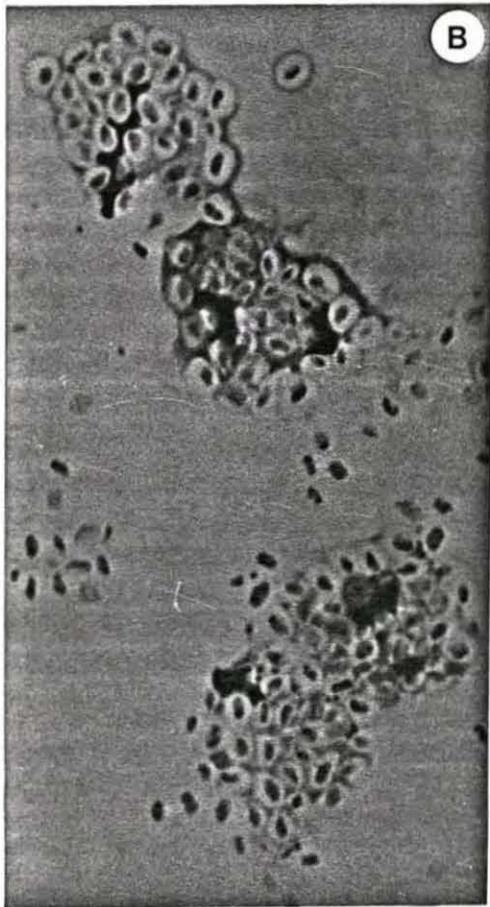
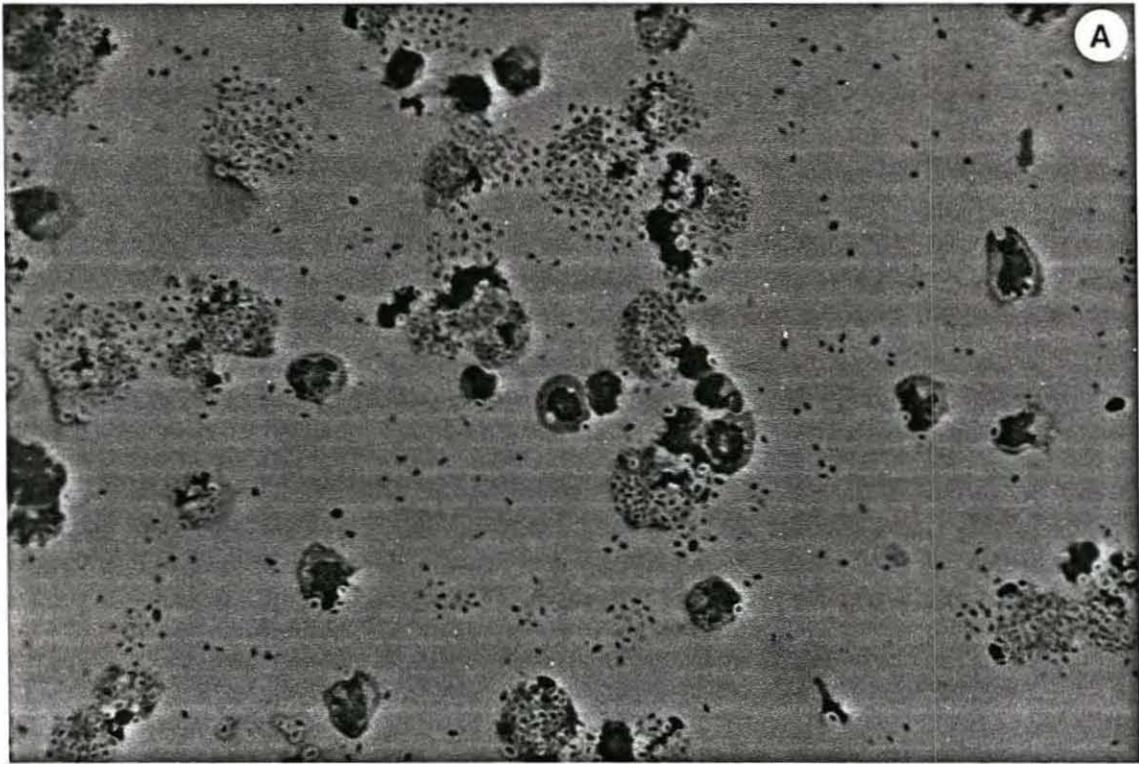
Des hémocytes ont été incubés avec des surnageants de culture contenant les AcMs spécifiques et ils ont été analysés afin de rechercher un éventuel effet des AcMs sur leur activité de LDCL. Les AcMs appartenant aux classes II, III et IV n'ont pas modifié la réponse de LDCL, comparativement à celle du témoin stimulé par du zymosan, les pics d'activité se situant entre 120.10^3 et 130.10^3 cpm (Fig. 51A). Par contre, l'incubation avec l'anticorps de la classe I (13B9-2F8), reconnaissant les granules des granulocytes basophiles, a conduit à une légère augmentation de l'activité de LDCL des hémocytes dont la valeur maximale a atteint 151.10^3 cpm (Fig. 51B).

Fig. 52 : Activité phagocytaire de primocultures d'hémocytes normaux et néoplasiques de *Mytilus*, en suspension (5 particules de zymosan/hémocyte)

A : cytocentrifugation d'une population mixte d'hémocytes normaux et néoplasiques provenant d'un individu *M. trossulus* à un stade avancé de la néoplasie (X200)

B : cytocentrifugation d'hémocytes normaux de *M. edulis* (X 1000)

C : cytocentrifugation d'hémocytes néoplasiques d'une moule *M. trossulus* à un stade terminal de la néoplasie (X 1000) ; ingestion de zéro à trois particules de zymosan par hémocyte (→)



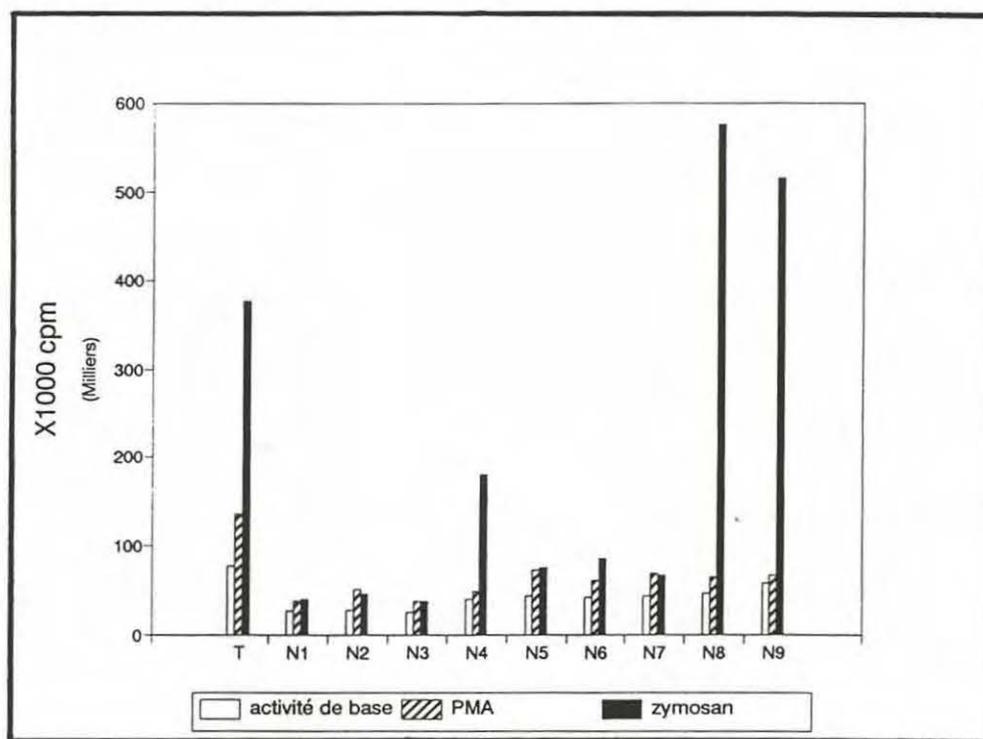


Fig. 53 : Réponses de LDCL (pics d'activité) de différents échantillons d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* ($2 \cdot 10^5$ hémocytes/2 ml/fiole ; 80 zymosan/hémocyte) (N1 à N9 : hémocytes néoplasiques provenant de 9 individus différents ; T : témoin, hémocytes normaux de *M. edulis*)

2. CAPACITE DE PHAGOCYTOSE DES HEMOCYTES NEOPLASIQUES DE *M. TROSSULUS*

Les cellules néoplasiques ont été identifiées, après examen à l'état frais, selon des caractéristiques morphologiques et comportementales.

2.1. Recherche d'une activité phagocytaire

Des primocultures d'hémocytes néoplasiques (voir Matériels et Méthodes) provenant de différents individus fortement atteints ont été incubées en présence de particules de zymosan, puis examinées en microscopie photonique. Comparativement à la capacité phagocytaire d'hémocytes normaux de *M. trossulus* ou de *M. edulis* en primocultures (Fig. 52A, B), la majorité des hémocytes néoplasiques ont révélé une activité phagocytaire nulle ou réduite (Fig. 52A, C). En effet, une à deux particules de levure seulement ont été ingérées par ces cellules néoplasiques (Fig. 52C), alors qu'une vingtaine de particules ont été généralement internalisées par les hémocytes normaux des deux espèces (Fig. 52A, B).

2.2. Mesure de l'activité de LDCL

L'activité de LDCL d'hémocytes néoplasiques provenant de neuf individus *M. trossulus* a été étudiée selon le protocole établi pour les hémocytes normaux. Aucune réponse des hémocytes à la stimulation par du PMA ou du zymosan n'a été observée pour six échantillons (Fig. 53). L'observation ultérieure de ces hémocytes, après cyto-centrifugation, a montré que peu de cellules ont phagocyté les particules.

Deux échantillons ont présenté une activité de LDCL importante, supérieure à la réponse obtenue chez le témoin correspondant à des hémocytes normaux de *M. edulis* (Fig. 53, n° 8 et 9). L'observation histologique a révélé la présence, dans ces échantillons, de nombreux hémocytes normaux contenant une grande quantité de particules de zymosan.

Enfin, un signal de LDCL a également été généré par les hémocytes de l'échantillon N4, le pic d'activité étant inférieur à celui du témoin (Fig. 53). Après cyto-centrifugation, il s'est avéré que les hémocytes de cet échantillon étaient en majorité néoplasiques mais que des hémocytes normaux avaient une activité phagocytaire normale.

enzyme	hemocytes normaux	hem. néoplasiques
phosphatase alcaline	-	-
estérase (C4)	++++	++++
estérase lipase (C8)	++++	++++
lipase (C14)	-	-
leucine arylamidase	+++++	+++++
valine arylamidase	+++	+++
cystine arylamidase	+	++
trypsine	-	-
α -chymotrypsine	-	-
phosphatase acide *	+++++	++++
naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	++	++
α -galactosidase	-	-
β -galactosidase	+	+
β -glucuronidase *	+++	-
α -glucosidase *	++	-
β -glucosidase	-	-
N-acétyl- β -glucosaminidase *	++++	-
α -mannosidase *	+	±
α -fucosidase *	+++	+

Fig. 54 : Activités enzymatiques détectées dans les hémocytes (hem.) normaux de *M. edulis* et néoplasiques de *M. trossulus* à l'aide du test Apizym et estimation du nombre de nanomoles libérées (- : réaction négative ; + : \approx 5 nmoles ; ++ : \approx 10 nmoles ; +++ : \approx 20 nmoles ; ++++ : \approx 30 nmoles ; +++++ : \geq 40 nmoles) (* : activités enzymatiques qualitativement ou quantitativement différentes entre les deux types d'hémocytes)

3. CARACTERISATION ENZYMATIQUE DES HEMOCYTES NORMAUX DE *M. EDULIS* ET NEOPLASIQUES DE *M. TROSSULUS*

Les contenus enzymatiques des hémocytes normaux de *M. edulis* et des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* ont été déterminés à l'aide du test miniaturisé ApiZym. Dix-neuf activités enzymatiques ont été ainsi recherchées et semi-quantifiées.

Six activités enzymatiques (estérase, estérase lipase, leucine arylamidase, valine arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β -galactosidase) ont été détectées dans les deux types de cellules, ces activités enzymatiques étant quantitativement similaires. Six enzymes (phosphatase alcaline, lipase, trypsine, α -chymotrypsine, α -galactosidase, β -glucosidase) n'ont pas été détectées, ni dans les cellules normales, ni dans les cellules néoplasiques (Fig. 54).

Chez les hémocytes néoplasiques, une faible réduction d'activité a été observée pour trois enzymes (α -mannosidase, phosphatase acide, α -fucosidase), cette réduction semblant plus nette pour la dernière. Par contre, une légère augmentation de l'activité de l'enzyme cystine arylamidase a été notée (Fig. 54).

Une perte totale et nette de trois activités enzymatiques a été observée chez les cellules néoplasiques : la β -glucuronidase, la α -glucosidase et la N-acétyl- β -glucosaminidase (Fig. 54).

4. INTERACTIONS *IN VITRO* DES CELLULES NEOPLASIQUES DE *M. TROSSULUS* AVEC LES HEMOCYTES NORMAUX DE *M. EDULIS* OU DE *M. TROSSULUS*

4.1. Etude du processus de reconnaissance des cellules néoplasiques

Des hémocytes néoplasiques prélevés à partir d'individus *M. trossulus* fortement néoplasiques ont été mis en présence d'hémocytes normaux de *M. edulis*, *in vitro*. L'incubation des hémocytes, en suspension dans de l'eau de mer additionnée d'antibiotiques, a été réalisée selon un protocole optimisé pour des primocultures d'hémocytes d'huîtres (Hervio, 1992). Des prélèvements ont été effectués à intervalles de temps réguliers pour examen histologique.

Pendant les deux premières heures de culture, il a été montré que les hémocytes normaux entrent en contact avec les cellules néoplasiques (Fig. 55A), les deux types de cellules restant généralement individualisés.

Entre la troisième et la sixième heure d'incubation, de nombreuses images d'hémocytes normaux à différents stades de phagocytose des cellules néoplasiques ont

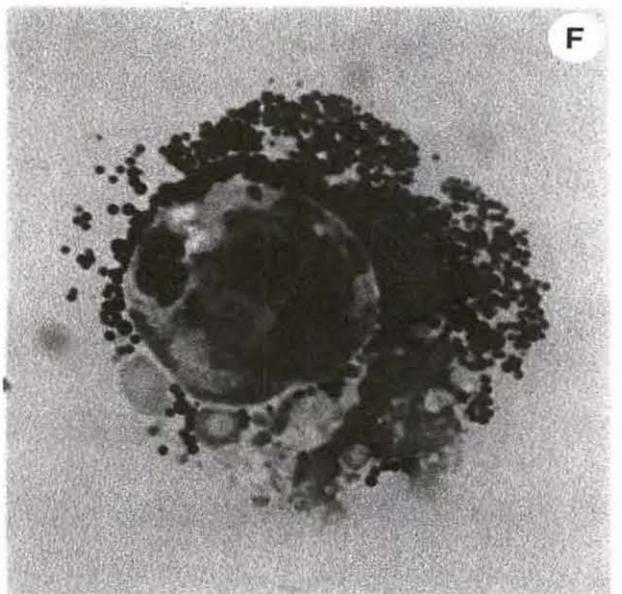
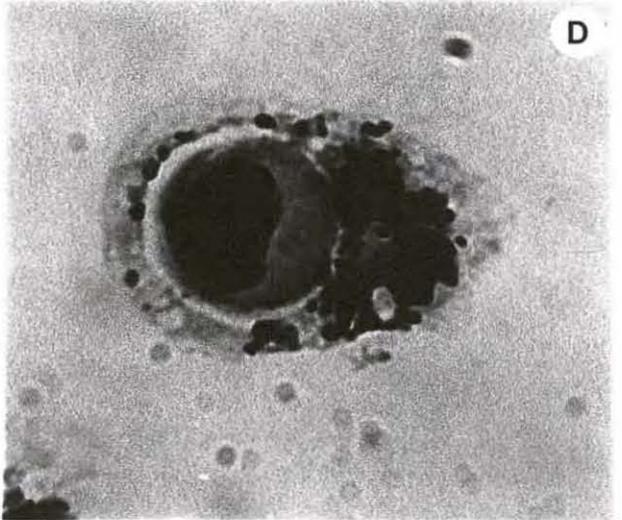
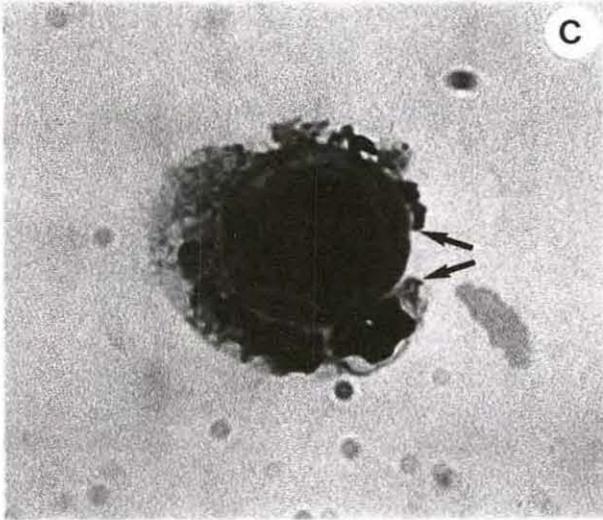
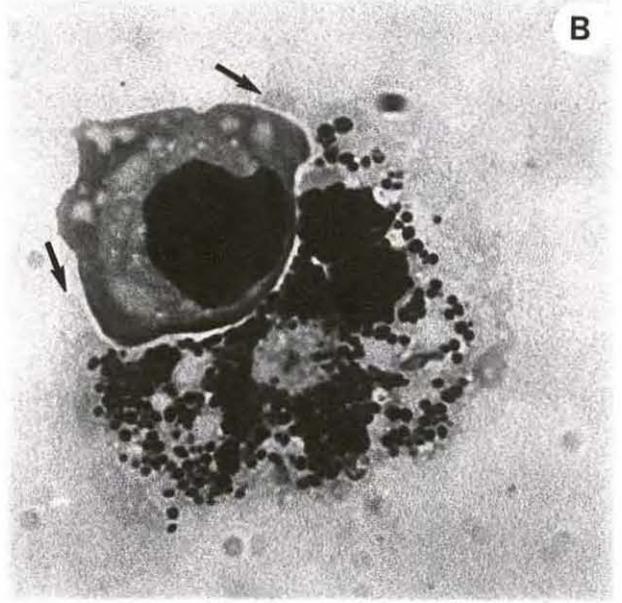
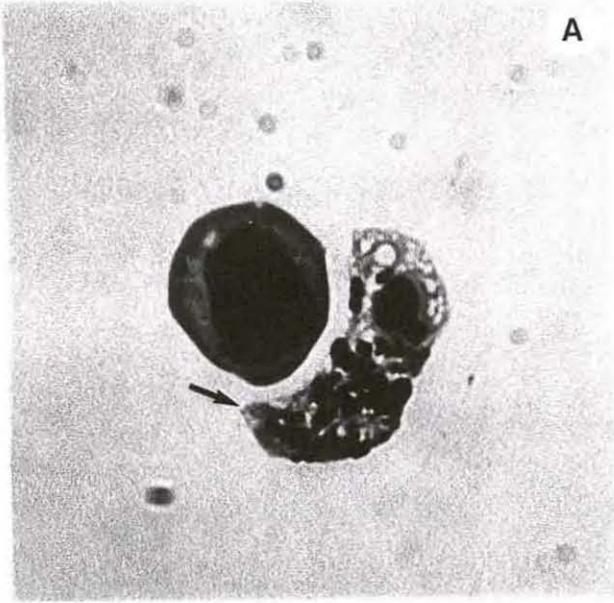
Fig. 55 : Capacité de reconnaissance et de phagocytose des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* par les hémocytes normaux de *M. edulis* (X 1000)

A : contact entre une cellule néoplasique et un hémocyte normal

B et C : formation de pseudopodes (→) qui entourent progressivement la cellule néoplasique

D et E : endocytose de un à plusieurs hémocytes néoplasiques par un hémocyte normal

F : dégradation d'un hémocyte néoplasique par un hémocyte normal



été observées. Les hémocytes normaux projettent des pseudopodes qui entourent progressivement les cellules tumorales (Fig. 55B, C) pour finalement l'englober (Fig. 55D). Parfois, des hémocytes normaux phagocytant deux à trois cellules néoplasiques (Fig. 55E) ont été observés ainsi que des hémocytes coopérant entre eux pour phagocyter plusieurs hémocytes. Le nombre de cellules néoplasiques libres a nettement diminué.

Au bout de quatorze et vingt-quatre heures, les cellules néoplasiques ont été en grande majorité phagocytées par les hémocytes normaux et certaines images suggèrent qu'une dégradation des cellules ingérées se produise à l'intérieur de la vacuole de phagocytose (Fig. 55F).

Des expériences complémentaires ont été alors réalisées en incubant d'une part, des cellules néoplasiques de *M. trossulus* avec des hémocytes normaux provenant de *M. edulis* ou de *M. trossulus* et d'autre part, des hémocytes normaux des deux espèces.

Les capacités phagocytaires des hémocytes normaux de *M. edulis* vis-à-vis de particules de zymosan ou de cellules néoplasiques ont été à nouveau mises en évidence par une internalisation importante. L'incubation des hémocytes normaux de *M. edulis* et de *M. trossulus* a conduit à l'observation d'images de phagocytose de cellules apparemment normales, sans qu'il soit possible d'établir l'identité respective des cellules ingérées et ingérantes. Par ailleurs, des images de phagocytose ont été aussi observées pour des primocultures d'hémocytes seuls de *M. edulis*. Dans ces deux cas, le nombre d'images de phagocytose apparaît comparable, mais nettement inférieur à celui observé lors de l'incubation des hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* avec des hémocytes normaux de *M. edulis*. Ceci suggère que les hémocytes néoplasiques soient plus facilement reconnus comme étrangers par les hémocytes normaux de *M. edulis* que ne le sont les hémocytes normaux de *M. trossulus*.

L'incubation d'hémocytes normaux et néoplasiques de *M. trossulus* provenant de deux animaux différents a indiqué que peu de cellules néoplasiques ont été phagocytées, même après dix heures de culture, la différence étant particulièrement claire avec les observations relatives aux hémocytes normaux de *M. edulis*. A partir de ce laps de temps, les cellules néoplasiques sont regroupées en amas, infiltrés parfois par des hémocytes normaux. Il semble donc que le phénomène de reconnaissance des cellules néoplasiques par les hémocytes normaux de *M. trossulus* soit faible.

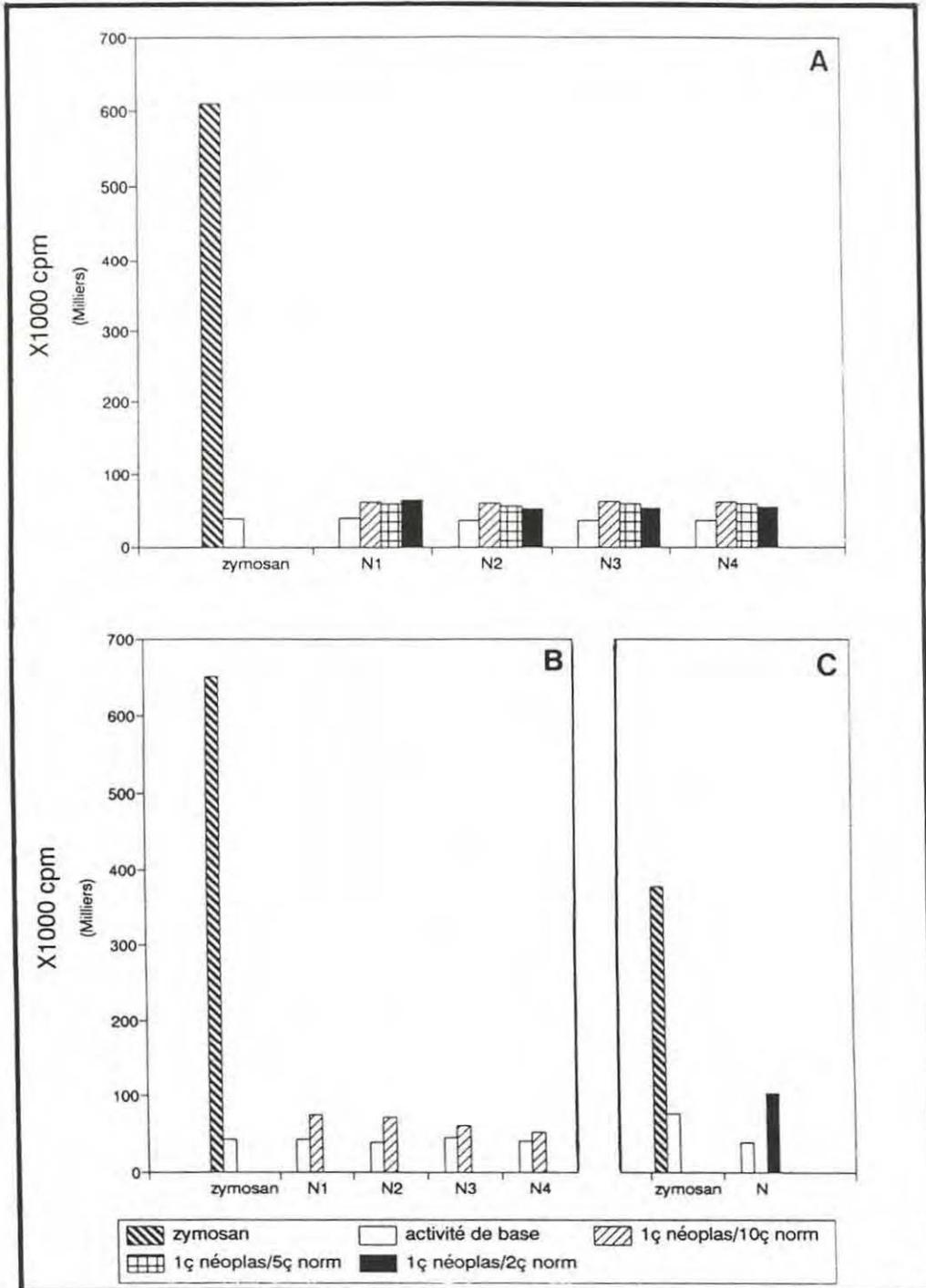


Fig. 56 : Réponses de LDCL (pics d'activité) de différents échantillons d'hémocytes normaux de *M. edulis* ($2 \cdot 10^5$ hémocytes/2 ml/fiole) vis-à-vis d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* à différentes concentrations (N à N5 : hémocytes néoplasiques provenant de 5 individus *M. trossulus*)
A : hémocytes normaux d'un individu *M. edulis* T1
B : hémocytes normaux d'un individu *M. edulis* T2
C : hémocytes normaux de plusieurs individus *M. edulis*)

4.2. Recherche d'une activité de LDCL associée à la phagocytose des cellules néoplasiques par les hémocytes normaux

Quel que soit le rapport cellules néoplasiques (*M. trossulus*)/hémocytes normaux (*M. edulis*) : 1/10 ; 1/5 ; 1/2, aucune activité de LDCL des hémocytes normaux vis-à-vis des cellules néoplasiques n'a pu être détectée (Fig. 56A), bien que des images de phagocytose aient été observées après cyto centrifugations et colorations des préparations d'hémocytes. D'autres expériences répétées avec les hémocytes normaux d'un autre animal (Fig. 56B) ou regroupés à partir de plusieurs moules (Fig. 56C) ont conduits aux mêmes résultats.

5. DISCUSSION

Chez les hémocytes de la moule *Mytilus edulis*, la génération de radicaux libres de l'oxygène a été récemment démontrée, de façon qualitative, par une étude histo chimique (Pipe, 1992). Cependant, l'analyse quantitative en chimioluminescence de ce processus ainsi que la compréhension des mécanismes enzymatiques mis en jeu restaient à établir. De plus, la mise au point de la technique de chimioluminescence avait pour but de comparer les activités de LDCL des hémocytes normaux et néoplasiques et d'étudier les interactions *in vitro* entre des hémocytes normaux et néoplasiques.

Certains paramètres expérimentaux tels que le milieu de prélèvement et de maintien des hémocytes, ainsi que la concentration en luminol ont été directement extrapolés des données établies pour les hémocytes d'huîtres par Bachère *et al.* (1991). Outre un stimulus particulière, l'utilisation de PMA a été envisagée pour son éventuelle efficacité de stimulation de tous les hémocytes, indépendamment de leur capacité de phagocytose (Adema *et al.*, 1991). Cette substance s'est révélée efficace pour stimuler les hémocytes de *Mytilus* bien que la réponse de LDCL soit beaucoup plus faible que celle observée après stimulation par du zymosan, ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec les hémocytes de *Lymnaea stagnalis* (Dikkeboom *et al.*, 1987).

La stimulation avec des particules de zymosan selon un rapport 80 particules/hémocyte a donc été retenue pour les expériences ultérieures car elle permet d'obtenir des valeurs de LDCL facilement détectables. De plus, la concentration cellulaire de 2.10^5 cellules/fiole permet de préparer plusieurs échantillons à partir d'un seul prélèvement d'hémolymphe, de 1 à 3.10^6 cellules/animal étant généralement recueillies. Ces conditions sont similaires à celles retenues pour les mesures de LDCL des huîtres et des coquilles Saint-Jacques (Bachère *et al.*, 1991 ; Le Gall *et al.*, 1991), ce

qui permet des comparaisons intraspécifiques et interspécifiques. Ainsi, alors que les palourdes *Ruditapes decussatus* ne génèrent pas de radicaux libres de l'oxygène (Lopez, 1992), les activités moyennes de LDCL chez la moule sont de l'ordre de $2,6 \pm 1,7.10^5$ cpm. Elles apparaissent inférieures à celles de l'huître *Crassostrea gigas* : $9,7 \pm 6,3.10^5$ cpm et beaucoup plus faibles que celles de l'huître *Ostrea edulis* : $23,5 \pm 16,7.10^5$ cpm (Bachère *et al.*, 1991) et de la coquille St-Jacques *Pecten maximus* : $66,3 \pm 3,4.10^5$ cpm (Le Gall *et al.*, 1991). Ces variations interspécifiques doivent être, cependant, analysées avec précaution car des différences importantes d'activités de LDCL ont été observées chez *Mytilus*, suivant les périodes de l'année (données non présentées). Ces variations pourraient refléter l'état physiologique des animaux, lié notamment aux époques de reproduction. D'autre part, des modifications dans les activités de LDCL chez l'huître *C. gigas* ont été associées à l'exposition à des agents polluants, tels que des métaux lourds ou des pesticides (Larson *et al.*, 1989). Ces valeurs de LDCL semblent en contradiction avec les observations histologiques qui suggèrent une phagocytose beaucoup plus importante des particules de levure par les hémocytes de *M. edulis* comparativement à ceux de *C. gigas* ou *O. edulis*.

Les résultats rapportés avec des échantillons individuels d'hémolymphe ou avec des sous-populations d'hémocytes indiquent une activité différentielle de LDCL suivant le type cellulaire. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le nombre de hyalinocytes et de granulocytes basophiles diminue avec une densité plus élevée de Percoll, alors que le nombre de cellules pouvant être assimilées à des granulocytes éosinophiles augmente et ceci, parallèlement à une augmentation des signaux de LDCL. Ces résultats pourraient suggérer que les granulocytes éosinophiles soient les formes les plus matures des sous-populations hémocytaires, l'activité phagocytaire étant, chez les Vertébrés, directement proportionnelle à la maturité des cellules (Klebanoff and Clark, 1978). Cette hypothèse rejoindrait les conclusions de l'étude antigénique. Il est cependant difficile, avec ces premiers éléments de réponse, d'associer une capacité phagocytaire élevée aux seuls granulocytes éosinophiles sans une séparation efficace de ce type cellulaire. En effet, on observe un enrichissement plutôt qu'une séparation des sous-types hémocytaires après centrifugation isopycnique ; le critère de densité ne semble donc pas suffisant pour séparer des sous-populations. Par contre, des techniques d'immunoaffinité (Flo *et al.*, 1991), utilisant l'AcM de classe III qui réagit avec des composants membranaires, pourrait permettre la séparation des granulocytes basophiles et éosinophiles d'une part, et des hyalinocytes, d'autre part. La LDCL des granulocytes pourrait alors être prise en compte en relation avec le pourcentage de granulocytes basophiles, présents dans différentes fractions de Percoll et détectés à l'aide de l'AcM de classe I.

Les processus biochimiques impliqués dans la LDCL des hémocytes de *Mytilus* ont été analysés en mesurant l'effet de différents inhibiteurs métaboliques. Ainsi, l'inhibition de

la réponse de LDCL par la SOD démontre la production d'ions superoxyde pendant la phagocytose (Webb, 1974). D'autre part, la forte inhibition par l'azide de sodium précise que des radicaux libres de l'oxygène, autres que l'ion superoxyde ($1O_2$, H_2O_2), sont également générés lors de ce phénomène (Nakagawara *et al.*, 1981 ; Rosen and Klebanoff, 1977). Ces résultats sont en accord avec ceux de Pipe (1992) qui a récemment mis en évidence, par histoenzymologie, la production d'ions superoxyde et de peroxyde d'hydrogène et sont comparables à ceux obtenus pour d'autres Mollusques marins (Bachère *et al.*, 1991 ; Le Gall *et al.*, 1991), des gastéropodes (Dikkeboom *et al.*, 1987) et des cellules sanguines humaines (de Chatelet, 1982).

Le mode d'action des phénols de type catéchol a été étudié chez les neutrophiles (Simons *et al.*, 1990b) et les macrophages de Vertébrés (Cottelle *et al.*, 1991). Ces composés réagissent avec le peroxyde d'hydrogène pour former des quinones qui, par conjugaison avec des groupes thiols essentiels, empêchent l'assemblage de complexes NADPH oxydase fonctionnels, leur formation continue étant nécessaire à la poursuite du "burst" respiratoire (Hart *et al.*, 1990a). La nette diminution de l'activité de LDCL des hémocytes de *Mytilus edulis* en présence de catéchols suggère une inhibition de la production d'ions superoxyde par la NADPH oxydase. L'hypothèse de la présence de cette enzyme dans les hémocytes de *Mytilus* est renforcée par sa mise en évidence en cytochimie sur la membrane plasmique des hémocytes de Mollusques (Chagot, 1989 ; Adema, comm. pers.). Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires pour démontrer sa participation dans le métabolisme oxydatif de *Mytilus*, notamment la démonstration que la réduction du cytochrome C n'est pas inhibée par la catalase et que la production de radicaux oxygène n'est pas bloquée par des chélateurs d'ions métaux.

Les O-méthoxy catéchols agissent de manière similaire mais sont dépendants d'une activité peroxydasique (Thompson *et al.*, 1989). En effet, la LDCL des macrophages alvéolaires de rat qui ne possèdent pas de myéloperoxydase, n'est pas inhibée par ces composés (Welch *et al.*, 1980 ; Hart *et al.*, 1990b). La forte diminution du signal de LDCL des hémocytes de *Mytilus*, enregistrée en présence de O-méthoxy catéchols, prouve ainsi le rôle d'une peroxydase dans leur métabolisme. Cette première démonstration d'une activité peroxydasique dans les hémocytes de moule était suggérée par une étude histochimique qui avait révélée une faible oxydation de son substrat DAB (diamino benzidine), en présence de peroxyde d'hydrogène exogène (données non présentées).

Après incubation avec des anticorps spécifiques, les réponses de LDCL des hémocytes n'ont pas été réduites par rapport à celles obtenues après stimulation par du zymosan seul. Ces observations laissent supposer que les épitopes reconnus par ces AcMs n'interviennent pas dans le phénomène de reconnaissance des particules ingérées. L'implication de composants membranaires dans les phénomènes de reconnaissance de parasites par des cellules immunitaires a été fréquemment démontrée à l'aide

d'anticorps spécifiques (Hollingdale *et al.*, 1984). Par contre, une augmentation sensible des signaux de LDCL a été enregistrée après incubation avec l'anticorps de classe I. Des résultats comparables d'activation de neutrophiles par des anticorps spécifiques de protéines de granules (principalement la protéinase 3, la protéine cationique 57 et la myéloperoxydase) ont été observés chez l'homme (Charles *et al.*, 1991). Ces auteurs ont démontré que ces anticorps étaient liés à la surface de neutrophiles activés, indiquant que les antigènes normalement confinés dans les granules sont présents à la surface membranaire après stimulation. Ces observations suggèrent que l'AcM de classe I se comporte de manière similaire puisque l'épitope a été localisé dans les granules, ce qui pourrait indiquer qu'il appartient à une protéine de type enzymatique.

La forte diminution, voire la perte des capacités phagocytaires observées avec les hémocytes néoplasiques sont en accord avec les observations préliminaires de Kent *et al.* (1989). Le nombre d'échantillons que nous avons testés étant plus élevé, il est mieux représentatif du phénomène de néoplasie. En outre, ces auteurs avaient observé une perte totale de phagocytose alors que quelques particules semblent être en contact ou internalisées par certains hémocytes néoplasiques dans nos expériences. Une étude sur un nombre plus important d'individus à différents stades de la néoplasie permettrait de préciser l'évolution du processus de transformation, en parallèle avec la perte des capacités phagocytaires. Une perte des capacités de phagocytose de particules de zymosan par les hémocytes néoplasiques de *Mya arenaria* a également été mise en évidence par examen histologique (Beckmann *et al.*, 1992). Des différences dans l'organisation du cytosquelette des cellules néoplasiques ayant été observées (Moore *et al.*, 1988), leur incapacité à polymériser ou dépolymériser les filaments d'actine pourrait expliquer leur incapacité à ingérer les particules de levure.

La perte du métabolisme oxydatif de ces hémocytes néoplasiques pouvait donc être suspectée et a été vérifiée en chimioluminescence. Elle correspond probablement à une dédifférenciation des cellules tumorales, comme cela a été établi chez les Vertébrés (Klebanoff and Clark, 1978).

Au vu de la perte des capacités de phagocytose et de chimioluminescence, l'analyse de l'équipement enzymatique de ces hémocytes néoplasiques, comparativement à celui des hémocytes normaux, a été entreprise pour compléter cette étude fonctionnelle. Il est intéressant de noter que les trois activités enzymatiques qui disparaissent (β -glucuronidase, N-acétyl- β -glucosaminidase, α -glucosidase) et les trois enzymes dont l'activité est réduite (phosphatase acide, α -mannosidase, α -fucosidase) appartiennent à la famille des hydrolases acides. Ces enzymes sont toutes associées à la dégradation de matériels phagocytés (Moore and Gelder, 1985) et les deux premières ont été localisées

dans les granules des hémocytes de *M. edulis* (Lowe and Moore, 1978 ; Pipe, 1990b). Ces résultats concordent avec la perte chez les hémocytes néoplasiques de granules observée en ultrastructure, ainsi que la perte de phagocytose et de chimioluminescence. Ces données sont en accord avec les modifications fonctionnelles observées chez un certain nombre de leucémies humaines (Klebanoff and Clark, 1978). Il semble donc que les différents mécanismes de défense associés à la phagocytose soient fortement altérés chez les hémocytes néoplasiques. Ceci est cependant en contradiction avec les résultats de Beckmann *et al.* (1992) qui montrent une augmentation de certaines hydrolases acides (phosphatase acide, estérases non-spécifiques, β -glucuronidase) dans les hémocytes néoplasiques de *Mya arenaria*. Ces auteurs suggèrent trois hypothèses différentes pour expliquer la plus forte activité enzymatique de ces cellules néoplasiques : une hypersynthèse ; un stress qui léserait l'intégrité des membranes lysosomiales et activerait les enzymes latentes associées ; une accumulation intracytoplasmique des enzymes qui ne sont pas transportées vers l'extérieur par un cytosquelette altéré. Cependant, ces auteurs ont recherché la présence des différentes activités enzymatiques par des techniques histochimiques, après stimulation par des particules de zymosan.

Des phénomènes de rémission ayant été observés *in vivo* (Elston *et al.*, 1988a), une étude *in vitro* des interactions entre des hémocytes normaux et des cellules néoplasiques a été entreprise, selon des protocoles récemment mis au point pour l'étude des interactions entre des pathogènes et des hémocytes de Mollusques (Le Gall *et al.*, 1989 ; Mourton *et al.*, 1992). Les premières expériences réalisées avec des hémocytes normaux de *M. edulis* mettent en évidence une phagocytose active des cellules néoplasiques. En effet, très rapidement, les hémocytes normaux entrent en contact avec les cellules néoplasiques qui sont ensuite phagocytées. Parallèlement à l'augmentation du pourcentage de cellules néoplasiques phagocytées, le pourcentage de ces cellules libres diminue. Ces premières observations suggèrent que les cellules néoplasiques soient reconnues comme "non-soi" par les hémocytes normaux d'une autre espèce. Ces expériences ayant été réalisées avec des cellules néoplasiques provenant de moules *M. trossulus* et des hémocytes normaux de moules *M. edulis*, il était important de déterminer le rôle de la phagocytose dans l'élimination des cellules tumorales par les cellules immunitaires de la même espèce, comme reporté chez les Vertébrés (Esgro *et al.*, 1990).

Des expériences complémentaires ont donc été réalisées pour déterminer si les cellules néoplasiques sont reconnues sur la base de déterminants spécifiques de l'espèce ou spécifiques de l'état tumoral. Il a été observé que les images de phagocytose sont moins nombreuses dans les interactions des hémocytes normaux de *M. edulis* avec des hémocytes normaux de *M. trossulus*. Ces observations ont été en fait similaires à celles

correspondant à des hémocytes normaux de *M. edulis* seuls. Il semblerait que dans ce cas, la phagocytose soit essentiellement liée à l'élimination de cellules mortes plutôt qu'à une reconnaissance de cellules étrangères. Cette hypothèse est supportée par la diminution de la viabilité des hémocytes d'*Ostrea edulis* en culture, estimée à 16% après deux heures d'incubation dans de l'eau de mer additionnée d'Alsever (Hervio, 1992). Les faibles capacités de phagocytose des hémocytes normaux de *M. trossulus* vis-à-vis des cellules néoplasiques semblent indiquer une capacité anti-tumorale réduite et expliqueraient la rapidité de développement de la néoplasie chez les animaux atteints. De plus, la formation d'amas de cellules néoplasiques pourrait suggérer une coopération de ces cellules pour contrecarrer la réponse immunitaire de l'hôte, la signification de ce phénomène restant à établir.

L'ensemble de ces observations suggère donc que chez *M. edulis*, les hémocytes normaux aient des capacités de phagocytose des cellules tumorales plus importantes que chez *M. trossulus*. Cette observation est renforcée par le fait que la transmission de la maladie à des individus *M. edulis* semble limitée et que des stades ultimes premortem de la néoplasie n'aient pas été observés.

Il est surprenant que le métabolisme oxydatif des hémocytes de *Mytilus* ne semble pas impliqué dans les réactions de défense de l'hôte vis-à-vis des hémocytes néoplasiques. En effet, le mode d'action principal des macrophages et des granulocytes de Vertébrés, à l'égard des cellules tumorales, semble être lié à ce mode d'action (Zimmerman *et al.*, 1989). Cependant, d'autres mécanismes peuvent jouer un rôle dans ce processus et notamment, la production de protéases qui sécrétées par des macrophages de vertébrés provoquent la dégradation de cellules tumorales (Tomida, 1985 ; Drysdale *et al.*, 1988). La participation du métabolisme de l'oxyde nitrique dans l'élimination des cellules néoplasiques par des cellules endothéliales a également été démontrée (Li *et al.*, 1991). Ce mécanisme est cependant, dépendant d'une activation des cellules effectrices par des cytokines. Bien que de telles molécules n'aient pas été isolées chez les Invertébrés, nos expériences utilisant des anticorps anti-rIL1 β et anti-IL6 ont mis en évidence des réactions croisées sur les hémocytes de *M. edulis*, alors qu'une faible positivité avait été obtenue avec un anticorps anti-TNF (données non présentées). La signification d'une telle réactivité croisée avec des anticorps spécifiques de molécules humaines devra être analysée. Cependant, des études récentes ont montré que des substances de type TNF ou IL1 sont détectées dans l'hémolymphe de *Mytilus* (Hughes *et al.*, 1991a ; Hughes *et al.*, 1991b ; Hughes *et al.*, 1992). Cette découverte importante permet donc d'envisager outre la participation du mécanisme de l'oxyde nitrique, l'action cytolytique directe de telles molécules dans la cytocidie des cellules tumorales de *Mytilus* (Schreiber *et al.*, 1990).

RESULTATS - CHAPITRE IV

**CARACTERISATION GENETIQUE
DES HEMOCYTES**

Les données histologiques, en dépit de leur caractère ténu, laissaient supposer qu'un rétrovirus puisse être à l'origine de la néoplasie infectieuse de *M. trossulus*. L'impossibilité à mettre en évidence une activité transcriptase réverse (Elston, comm. pers.) nous a conduit à la recherche d'un gène *pol* codant pour une activité transcriptase réverse dans le génome des hémocytes néoplasiques. D'autre part, la caractérisation génétique de ces derniers a été initiée par la recherche de proto-oncogènes dans le génome de la moule. L'objectif de ce travail était d'ouvrir la voie à l'étude des oncogènes dans les cellules néoplasiques. Parmi les gènes dont les séquences sont bien conservées dans des espèces phylogénétiquement proches et éloignées des Mollusques, les gènes *rho* et *abl* ont été considérés comme les plus intéressants pour l'identification d'oligonucléotides consensus et l'application de la technique d'amplification enzymatique ou PCR.

1. RECHERCHE DE SEQUENCES DE TYPE RETROVIRAL

Le gène de la polymérase *pol* montrant une importante conservation chez tous les rétrovirus (Xiong and Eickbush, 1988), une portion de séquence hautement conservée au niveau acides aminés a été identifiée dans la portion de ce gène qui code pour la transcriptase réverse (Mack and Sninsky, 1988 ; Shih *et al.*, 1989). Des amorces oligonucléotidiques dégénérées ont été construites et utilisées pour amplifier un fragment de 175 pb (Donehower *et al.*, 1990). Un rétrovirus non caractérisé a pu ainsi être identifié. Ce système d'amorces (Fig. 57) a été synthétisé et utilisé pour rechercher un gène de polymérase à partir d'ADN génomique de moule normale et d'hémocytes néoplasiques, par PCR.

amorce (n°)	position	séquence (5'-3')	longueur (mers)	Tm (°C)
25	5'	ctcggatccGTI ^C TICCA ^A G T G	23	75
26	3'	ctcgtcgac ^A TC ^A TCCAT ^A TA G G G	21	63

Fig. 57 : Caractéristiques des amorces dégénérées *pol* (Donehower et al., 1990) (lettres minuscules : régions non-complémentaires contenant des sites de restriction ; I : inosyl)

A: Expérience 1

tube n°	origine de l'ADN	paires d'amorces	MgCl ₂ (mM)	température (°C)
1	ADN normal	25-26	2,5	45
2	"	"	3,5	45
3	"	"	4,5	45
4	"	"	5,5	45
5	ADN néoplasique	25-26	2,5	45
6	"	"	3,5	45
7	"	"	4,5	45
8	"	"	5,5	45
9	TE	25-26	4,5	45

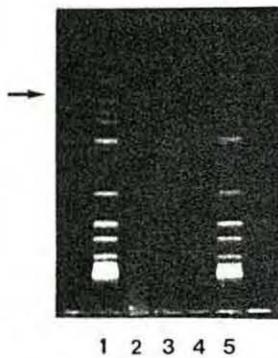


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1. ADN normal; 2,5 mM MgCl₂
2. Marqueurs de poids moléculaires
3. ADN normal; 3,5 mM MgCl₂
4. ADN normal; 4,5 mM MgCl₂
5. ADN normal; 5,5 mM MgCl₂
6. ADN néoplasique; 2,5 mM MgCl₂
7. ADN néoplasique; 3,5 mM MgCl₂
8. ADN néoplasique; 4,5 mM MgCl₂
9. ADN néoplasique; 5,5 mM MgCl₂
10. Témoin TE

B: Expérience 2

tube n°	origine de l'ADn	paires d'amorces	MgCl ₂ (mM)	température (°C)
1	ADN normal	25-26	5,5	50
2	ADN néoplasique	25-26	3,5	50
3	TE	25-26	4,5	50



1. Marqueurs de poids moléculaires
2. ADN normal; 5,5 mM MgCl₂
3. ADN néoplasique; 3,5 mM MgCl₂
4. Témoin TE
5. Marqueurs de poids moléculaires

C: Expérience 3

tube n°	origine de l'ADN	paires d'amorces	MgCl ₂ (mM)	température (°C)
1	ADN normal	25-26	5,5	55
2	ADN néoplasique	25-26	3,5	55
3	TE	25-26	4,5	55

Fig. 58 : Paramètres utilisés lors des différentes expériences d'amplification par P.C.R. avec les amorces *pol*, à partir d'ADN génomique d'hémocytes normaux ou tumoraux de moule. Visualisation des fragments amplifiés après électrophorèse sur gel d'agarose

Les résultats des expériences d'amplifications sont résumés dans la figure 58.

Une première expérience d'amplification réalisée à 45°C a conduit à l'observation de plusieurs fragments après séparation électrophorétique : un correspondant à une bande majeure de 280 pb et plusieurs bandes minoritaires, la plus petite de 230 pb. Ces résultats ont été obtenus quelle que soit l'origine de l'ADN, d'hémocytes normaux de *M. edulis* ou d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus* (Fig. 58A).

Une deuxième série d'amplifications a été réalisée à 50°C afin d'essayer d'augmenter la spécificité de l'hybridation et par conséquent de limiter le nombre de fragments amplifiés. Le bruit de fond a été fortement réduit mais tous les fragments précédemment amplifiés ont été à nouveau visualisés (Fig. 58B).

L'augmentation de la température à 55°C dans une dernière expérience (Fig. 58C) n'a pas permis de réduire le nombre de bandes (données non présentées).

Etant donné le nombre de fragments amplifiés dont aucun ne correspond à la taille du fragment attendu, les expériences n'ont pas été poursuivies.

2. RECHERCHE DE SEQUENCES DE PROTO-ONCOGENES CHEZ LA MOULE

Dans un premier temps, l'ensemble des séquences de proto-oncogènes et d'oncogènes a été pris en compte. Ensuite, sur la base d'une disponibilité d'informations relatives à des groupes zoologiques éloignés, une sélection a été faite pour entreprendre des analyses d'alignement. En bilan, deux proto-oncogènes seulement, *abl* et *rho*, ont été retenus car des amorces oligonucléotidiques ont pu être déterminées de façon relativement précise pour pouvoir effectuer des essais de PCR.

2.1. Recherche de séquences de type *abl*

2.1.1. Analyse des séquences des gènes *abl*

L'analyse des séquences des gènes *abl* a été réalisée sur banques de données à l'aide du système d'exploitation BISANCE.

Les séquences des gènes *abl* de *Caenorhabditis elegans* (nématode), *Drosophila melanogaster* et *Calliphora erythrocephala* (insectes), de l'homme et *v-abl* (Goddard *et al.*, 1986) ont été comparées. L'analyse de ces séquences, à l'aide du programme "Alignement multiple de 2 à 100 séquences et dendrogrammes (CLUSTAL)" a révélé une bonne conservation d'une portion du gène située dans l'exon 4, entre les nucléotides 1534 et 1731 de *C. elegans* (Annexe 3.1). Cette région est remarquablement conservée par

rapport à celle de *D. melanogaster* et de *v-abl* puisque le pourcentage d'homologie au niveau des acides aminés est de 83 % et 79 % et au niveau nucléotidique de 73 % et 68 %, respectivement (Goddard *et al.*, 1986). Un degré d'homologie similaire a été observé avec les séquences de *C. erythrocephala* et de l'homme.

2.1.2. Choix des amorces

Une amorce en 5' (27) et deux amorces en 3' (une "interne" : 28 et une "externe" : 29) ont été sélectionnées à partir des zones de forte conservation définies dans l'analyse précédente (Annexe 3.1). Le choix de ces amorces a tenu compte de la présence d'un résidu tyrosine qui est phosphorylé dans la protéine virale et hautement conservé dans la famille des gènes *abl* et *src*. La bonne conservation au niveau nucléotidique a permis de définir des amorces avec peu de résidus inosyl et légèrement dégénérées (Fig. 59). L'utilisation d'inosyl a été privilégiée lorsque le choix entre trois à quatre nucléotides était nécessaire. Par contre, dans les cas où le choix entre deux nucléotides semblait difficile, les deux possibilités ont été retenues.

amorce (n°)	position	séquence (5'-3')	longueur (mers)	Tm (°C)	dégénérescence
27	5'	GCGTC ^G GG ^A AATGIIITA ^{TT} TGGA C C CC	23	60	16 + 3I
28	3'	GCATG ^G GC ^C GT ^G TA ^G GTGTC T T A C	20	60	16
29	3'	GTCCATTTGATIGG ^A AACTTGGC G	23	62	2 + 1I

Fig. 59: Caractéristiques des différentes amorces *abl*
(en gras: résidu tyrosine)

Etant donné la distance relativement courte entre les deux amorces externes, il n'a pas été possible de dessiner une autre amorce interne. Ainsi, la taille des deux fragments amplifiés devrait théoriquement être de 148 et 175 pb, selon la paire d'amorces utilisée (Fig. 60).

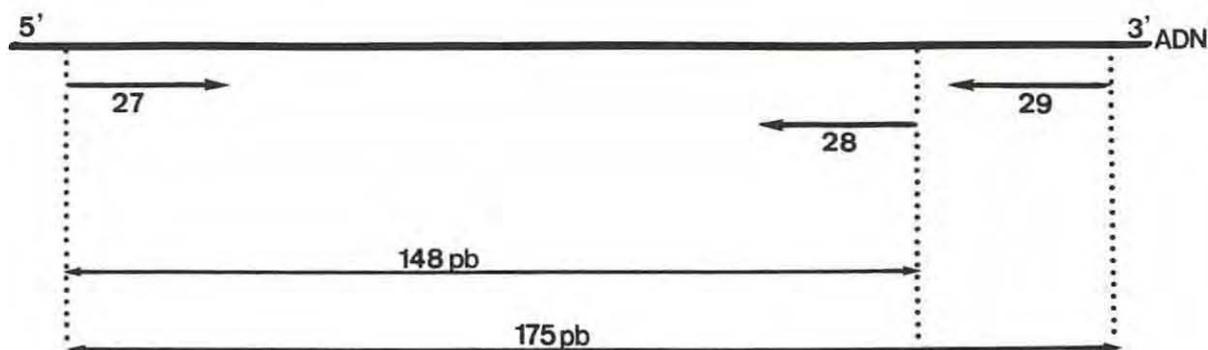


Fig. 60 : Position des amorces *abl* sur l'ADN génomique de *Caenorhabditis elegans* et taille théorique des fragments amplifiés en fonction des paires d'amorces utilisées

2.1.3. Amplification de séquences de type *abl*

Deux types d'ADN matrice ont été utilisés dans les expériences suivantes : l'ADN génomique de moule *M. edulis* et l'ADN génomique d'hémocytes néoplasiques *M. trossulus*.

Une première expérience avec la paire d'amorces externes (27 et 29) a été effectuée à la température d'appariement de 45°C et avec différentes concentrations en MgCl₂. Plusieurs fragments ont été amplifiés quelles que soient les matrices génomiques (données non présentées).

Une deuxième expérience a alors été réalisée en augmentant la température à 50°C pour tenter d'accroître la spécificité de l'amplification. A nouveau, de nombreuses bandes ont été détectées, dont une correspond à la taille de 200 pb lorsque l'ADN matrice provient de moule normale (taille attendue 175 pb) et 210 pb quand l'ADN est issu d'hémocytes néoplasiques (Fig. 61B).

L'augmentation de la température à 55°C n'a pas permis de diminuer le nombre de fragments amplifiés avec les amorces 27 et 28, quel que soit l'ADN génomique utilisé. Lorsque les amorces 27 et 29 ont été utilisées, seules deux bandes à 160 et à 240 pb ont été observées à partir d'ADN néoplasique (Fig. 61C). Aucune amplification n'est détectée avec l'ADN normal.

Au vu de ces résultats, les bandes correspondant aux fragments de 200 et 210 pb (Fig. 61B) ont été extraites du gel, purifiées et ont été utilisées comme matrices dans une

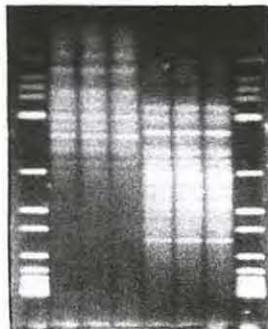
A: Expérience 1

tube n°	origine de l'ADN	paires d'amorces	MgCl ₂ (mM)	température (°C)
1	ADN normal	27-29	2,5	45
2	"	"	3,5	45
3	"	"	4,5	45
4	"	"	5,5	45
5	ADN néoplasique	27-29	2,5	45
6	"	"	3,5	45
7	"	"	4,5	45
8	"	"	5,5	45
9	TE	27-29	4,5	45

B: Expérience 2

tube n°	origine de l'ADN	paires d'amorces	MgCl ₂ (mM)	température (°C)
1	ADN normal	27-29	3,5	50
2	"	"	4,5	50
3	ADN néoplasique	27-29	2,5	50
4	"	"	3,5	50
5	TE	27-29	4,5	50

pb 200
210 →



1 2 3 4 5 6 7 8

1-8. Marqueurs de poids moléculaires
2 à 4. ADN normal; 3,5 mM MgCl₂
5 à 7. ADN néoplasique; 3,5 mM MgCl₂

C: Expérience 3

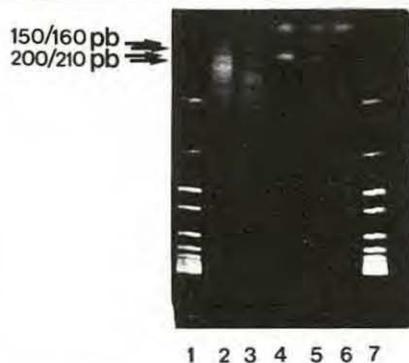
tube n°	origine de l'ADN	paires d'amorces	MgCl ₂ (mM)	température (°C)
1	ADN normal	27-28	3,5	55
2	"	27-29	3,5	55
3	ADN néoplasique	27-28	3,5	55
4	"	27-29	3,5	55



1. Marqueurs de poids moléculaires
2. ADN normal; amorces 27-28
3. ADN normal; amorces 27-29
4. ADN néoplasique; amorces 27-28
5. ADN néoplasique; amorces 27-29

D: Expérience 4

tube n°	origine de l'ADN	paires d'amorces	MgCl ₂ (mM)	température (°C)
1	tube 1/exp. 2	27-28	3,5	50
2	tube 4/exp. 2	27-28	4,5	50
3	175pb tube1/exp2	27-28	3,5	50
4	175pb tube4/exp2	27-28	4,5	50



- 1-7. Marqueurs de poids moléculaires
2. ADN tube 1/exp. 2
3. ADN tube 4/exp. 2
4. fragment de 175 pb tube 1/exp. 2
5. fragment de 175 pb tube 4/exp. 2
6. Témoin TE

Fig. 61 : Paramètres utilisés lors de différentes expériences d'amplifications par P.C.R. avec des amorces *abl*, à partir d'ADN génomique d'hémostocytes néoplasiques ou de tissus normaux de moule. Visualisation des fragments amplifiés après électrophorèse sur gel d'agarose

```

1
GGGTCGGGCA TGGGGTATTT GGAAAAGACG CTGTAGAATC CTCCACGGTA GTTTGCTTAC
----->
      amorce 5' (27)
61
AAAAAAGAG ATTAAATGCG TTTGATTTTT CATATCGTCT TCTATATATT CATTATTTAC

121                                     167
CAACAAAGGG GGGTAATTGT CGAAGGCTGTCGA CCAAATACCC CATTCCC

```

Fig. 62 : Séquence nucléotidique du clone *abl3-8*

```

1
GGGTCGGGCA TGGTGGATTT GGACTAAGAT CGGCATTTGG AAGAGCCTCA AATTGTGAAA
----->
      amorce 5' (27)
61
AGGAAGTCAT TAAAGTTTTA ATGACTGTAC TATATCTTTT TGAAACTTTA TTTCTTTGC

121
AATATATTTG TTTACTGTTT ATTCATCTG GAATAACATT GAAAGTCTCA ATTTCCAAAT

181      191
ACCCCATTC C

```

Fig. 63 : Séquence nucléotidique du clone *abl4-4*

autre expérience d'amplification utilisant à nouveau l'amorce 27 en 5' et l'amorce interne 28 en 3'. Cette expérience avait pour objectif d'amplifier, à l'aide des amorces "internes" le fragment amplifié précédemment, dans le but d'augmenter la spécificité de l'hybridation. Dans ce cas, seules deux bandes à environ 150 et 200 pb ont été obtenues à partir des fragments de 200 pb issu d'ADN normal et deux bandes à 160 et 220 pb ont été observées à partir du fragment de 210 pb issu d'ADN néoplasique (Fig. 61D). Ces quatre bandes ont été ensuite extraites du gel, purifiées, clonées et séquencées.

2.1.4. Clonage et séquençage des fragments amplifiés à l'aide des amorces *abl*

Les quatre fragments, observés après double amplification avec les amorces 27-29 puis 27-28 (Fig. 61D) ont été clonés. Il s'agit des fragments de 150 pb (*abl3P*) et de 200 pb (*abl3*) issu d'ADN génomique normal et de 160 pb (*abl4P*) et de 220 pb (*abl4*) issus d'ADN génomique néoplasique. Des minipréparations d'ADN plasmidique ont été réalisées pour contrôler la taille des inserts de quelques colonies, après coupure par les enzymes de restriction *Xho I* et *Cla I*.

Les séquences des fragments *abl3* et *abl4* intégrés dans deux colonies bactériennes ont été déterminées. Les séquences nucléotidiques sont reportées dans les figures 62 et 63.

2.1.5. Recherche d'homologies de séquences à l'aide du système d'exploitation des banques de données BISANCE

La traduction en acides aminés, dans les trois cadres de lecture possibles, a été effectuée et les comparaisons de séquences au niveau acides aminés ou acides nucléiques ont été réalisées à l'aide du programme FASTA. Aucune homologie de séquences avec des gènes *abl* n'a été trouvée (données non présentées).

2.2. Recherche de séquences de type *rho*

2.2.1. Analyse des séquences des gènes *rho*

Un gène *rho* ("*ras*-homologue") appartenant à une nouvelle famille de gènes liés aux gènes *ras* a été récemment identifié chez le Mollusque marin *Aplysia californica*

(Madaule and Axel, 1985). Ce gène code pour une protéine qui montre 35% d'homologie au niveau acides aminés avec H-*ras*. Une importante conservation dans une portion du gène *rho* a été détectée chez différentes espèces, au moyen du programme précédemment cité (Annexe 3.2).

2.2.2. Choix des amorces pour le gène *rho*

A partir des régions de fortes homologies déterminées précédemment, deux amorces externes (30 en 5' et 32 en 3') et deux amorces internes (31 en 5' et 33 en 3') ont été choisies (Fig. 64). Ces amorces sont faiblement dégénérées mais l'utilisation d'inosyl a été privilégiée dans les cas où le choix entre trois à quatre nucléotides était nécessaire.

amorce (n°)	position	séquence (5'-3')	longueur (mers)	T _m (°C)	dégénérescence
30	5'	TTICCIGAIGTITACGTICCIACIGTITT	29	60	8I
31	5'	TGGGAIACIGCIGGICAIGAIGAITA	26	60	7I
32	3'	TCI ^{AC} TTTITTICCIACIAGIATIATIGG TT	29	56	4 + 8I
33	3'	ACAI ^{CGG} GACAIAAITGIIIIACITCIGG TTT	29	56	8 + 9I

Fig. 64 : Caractéristiques des différentes amorces *rho*

La taille théorique des fragments qui devraient être amplifiés est indiquée dans la figure 65.

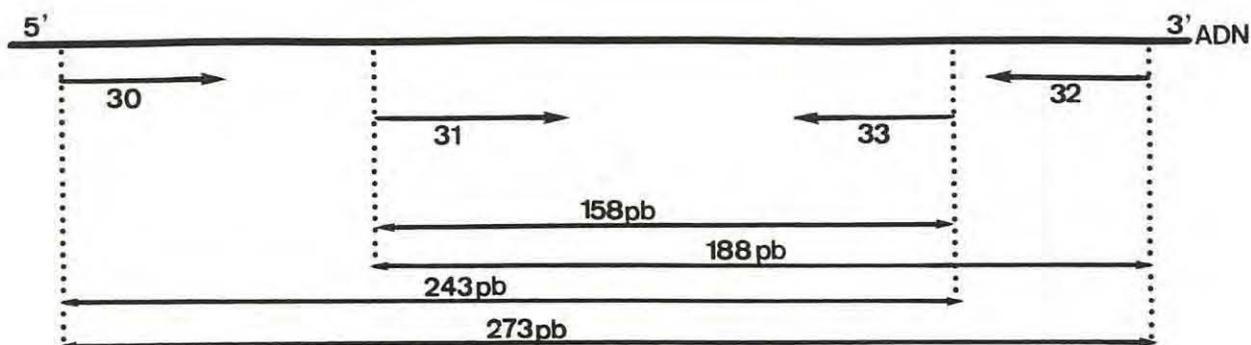


Fig. 65 : Position des amorces rho sur l'ADN génomique de *Aplysia californica* et taille théorique des fragments amplifiés en fonction des paires d'amorces utilisées

2.2.3. Expériences d'amplification par P.C.R. de séquences de type rho

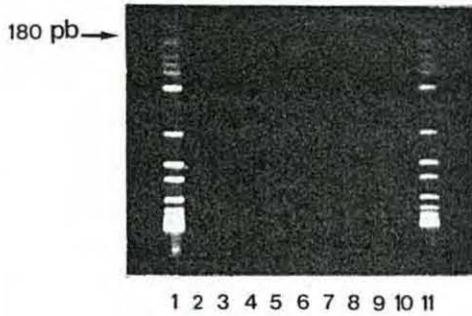
Une première expérience a consisté à déterminer les conditions d'amplification avec la paire d'amorces externes 30 et 32 (température d'appariement de 45°C et différentes concentrations en MgCl₂). Quelle soit la concentration saline, une seule bande de faible intensité à environ 180 pb a été amplifiée à partir d'ADN de moule normale, la taille attendue du fragment amplifié étant de 273 pb (Fig. 66A). Aucune amplification n'a été obtenue à partir d'ADN néoplasique.

Cette expérience a été renouvelée à la même température et à la concentration en MgCl₂ de 4,5 mM mais deux paires d'amorces ont été testées : les amorces "externes" 30-32 et "internes" 31-33. Une amplification difficilement détectable d'un fragment d'environ 180 pb a été obtenue avec les amorces externes à partir d'ADN normal (Fig. 66B) alors qu'aucune amplification n'a été observée pour l'ADN néoplasique (données non présentées). Par contre, les amorces internes ont permis d'amplifier plusieurs fragments dont un majoritaire, d'une taille de 180 pb à partir des deux types d'ADN (Fig. 66B).

Les résultats précédents ayant révélé la présence d'un fragment amplifié d'une taille sensiblement voisine à celle attendue en utilisant les amorces 31-33 (180 pb au lieu de 158 pb), seules les paires d'amorces 31-32 et 31-33 ont été choisies dans une dernière expérience. Celle-ci a consisté à utiliser comme matrice l'ADN génomique normal et néoplasique et en parallèle de l'ADNc préparé à partir d'embryons de *M. edulis* ou d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus*. L'ADNc a été préparé à partir de ces tissus, une transcription active respectivement, de proto-oncogènes ou d'oncogènes, devant pouvoir être détectée plus facilement. Lorsque la matrice nucléique a été de l'ADNc issu

A: Expérience 1

tube n°	origine de l'ADN	paires d'amorces	MgCl ₂ (mM)	température (°C)
1	ADN normal	30-32	2,5	45
2	"	"	3,5	45
3	"	"	4,5	45
4	"	"	5,5	45
5	ADN néoplasique	30-32	2,5	45
6	"	"	3,5	45
7	"	"	4,5	45
8	"	"	5,5	45
9	TE	30-32	4,5	45

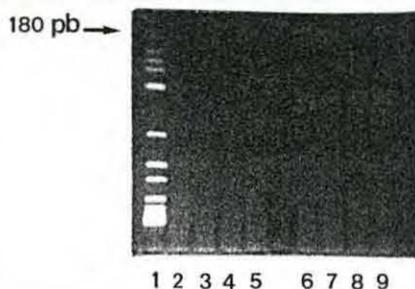


1-11. Marqueurs de poids moléculaires

- 2. ADN normal; 2,5 mM MgCl₂
- 3. ADN normal; 3,5 mM MgCl₂
- 4. ADN normal; 4,5 mM MgCl₂
- 5. ADN normal; 5,5 mM MgCl₂
- 6. ADN néoplasique; 2,5 mM MgCl₂
- 7. ADN néoplasique; 3,5 mM MgCl₂
- 8. ADN néoplasique; 4,5 mM MgCl₂
- 9. ADN néoplasique; 5,5 mM MgCl₂
- 10. Témoin TE

B: Expérience 2

tube n°	origine de l'ADN	paires d'amorces	MgCl ₂ (mM)	température (°C)
1	ADN normal	30-32	4,5	45
2	"	31-33	4,5	45
3	ADN néoplasique	30-32	4,5	45
4	"	31-33	4,5	45
5	TE	31-33	4,5	45

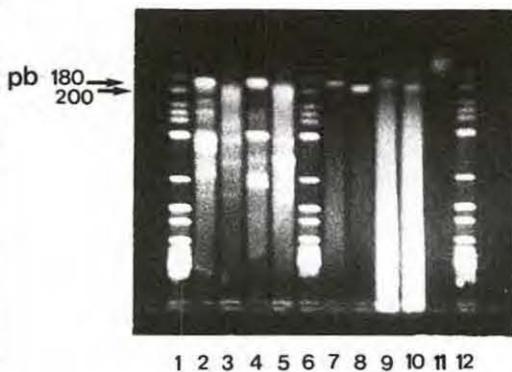


1. Marqueurs de poids moléculaires

- 2 à 5. ADN normal; amorces 30-32
- 6 à 9. ADN normal; amorces 31-33

C: Expérience 3

tube n°	origine de l'ADN	paires d'amorces	MgCl ₂ (mM)	température (°C)
1	ADN normal	31-33	4,5	45
5	"	31-32	4,5	45
2	ADN néoplasique	31-33	4,5	45
6	"	31-32	4,5	45
3	ADNc d'embryons	31-33	4,5	45
7	"	31-32	4,5	45
4	ADNc néoplasique	31-33	4,5	45
8	"	31-32	4,5	45
9	TE	31-32-33	4,5	45



1-6-12. Marqueurs de poids moléculaires

2. ADN normal; amorces 31-33
3. ADN normal; amorces 31-32
4. ADN néoplasique; amorces 31-33
5. ADN néoplasique; amorces 31-32
7. ADNc d'embryons; amorces 31-33
8. ADNc d'embryons; amorces 31-32
9. ADNc néoplasique; amorces 31-33
10. ADNc néoplasique; amorces 31-32
11. Témoin TE

Fig. 66 : Paramètres utilisés lors de différentes expériences d'amplification par P.C.R. avec les amorces *rho*, à partir d'ADN génomique ou complémentaire d'hémocytes néoplasiques ou de tissus normaux de moule. Visualisation des fragments amplifiés après électrophorèse sur gel d'agarose

```

1           16           31
GAC AGA CTC CGC CCA CTT TCC TAC CCA GAT ACA GAT GTC ATT CTT
D   R   L   R   P   L   S   Y   P   D   T   D   V   I   L

46           61           76
ATG TGC TTC TCT ATA GAT AGT CCT GAC AGC TTA GAA AAT ATA CCA
M   C   F   S   I   D   S   P   D   S   L   E   N   I   P

91           102
GAA AAA TGG ACT
E   K   W   T

```

Fig. 67 : Séquence nucléotidique du clone 10-rho3 et séquence peptidique déduite

```

M. edulis           1           34
DRLRPLSYPDPTDVILMCFSIDSPDSLENIPEKWT
=====
A. californica     71           104
DRLRPLSYPDPTDVILMCFSIDSPDSLENIPEKWT

```

Fig. 68 : Comparaison de la séquence peptidique du clone 10-rho3 de *M. edulis* et de celle correspondant au gène rho d'*A. californica*

```

M.edulis           1
GAC AGA CTC CGC CCA CTT TCC TAC CCA GAT ACA GAT GTC ATT CTT
::: ::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
A.califor.       212
GAC AGA CTG AGG CCG CTG TCT TAC CCT GAC ACA GAT GTC ATC CTC

M.edulis           102
ATG TGC TTC TCT ATA GAT AGT CCT GAC AGC TTA GAA AAT ATA CCA
::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
A.califor.       313
ATG TGT TTC TCT ATA GAC AGT CCA GAC AGT CTG GAG AAC ATA CCG

M.edulis           102
GAA AAA TGG ACT
:: : : : :
A.califor.       313
GAG AAG TGG ACT

```

Fig. 69 : Comparaison de la séquence nucléotidique du clone 10-rho3 de *M. edulis* et de celle du gène rho d'*A. californica*

soit d'embryons, soit d'hémocytes néoplasiques, une seule bande a été à nouveau observée à environ 180 pb après amplification à l'aide des amorces 31 et 33 (taille attendue : 158 pb) et à 200 pb avec les oligonucléotides 31 et 32 (taille théorique : 188 pb). Ces bandes ont été également majoritaires avec les ADN génomiques, bien que plusieurs amplifications non spécifiques aient été obtenues (Fig. 66C).

2.2.4. Clonage et séquençage des fragments amplifiés à l'aide des amorces rho

Le clonage de quatre fragments différents a été entrepris (Fig. 66C) : les fragments de 180 pb amplifiés avec les amorces 31-33, à partir de l'ADNc issu d'embryons (*rho3*) et d'hémocytes néoplasiques (*rho4*) et les fragments de 200 pb amplifiés avec les amorces 31-32, à partir de l'ADNc issu d'embryons (*rho7*) et d'hémocytes néoplasiques (*rho8*). Après clonage et minipréparation de l'ADN plasmidique, la taille des fragments intégrés de quelques colonies a été vérifiée par coupure avec les enzymes de restriction Xho I et Cla I.

L'insert de la colonie 10-*rho3* a été séquençé et sa séquence nucléotidique ainsi que la traduction en acides aminés est présentée dans la figure 67.

2.2.5. Recherche d'homologies de séquences à l'aide du système d'exploitation des banques de données BISANCE

La séquence peptidique déduite du fragment de 102 pb compris entre les deux amorces oligonucléotidiques du clone 10-*rho3* de *Mytilus edulis* a été comparée avec celle correspondant au gène *rho* d'*A. californica* (Fig. 68). Un pourcentage d'homologie de 100 % au niveau acides aminés est obtenu entre les deux séquences. Une comparaison de cette séquence avec des séquences protéiques de la banque de données protéiques NBRF par un programme FASTA révèle 100% d'homologie avec les séquences peptidiques *rho* de mammifères, 97% avec la séquence *rhoB* humaine et 78,8 % avec celle de la levure (Annexe 3.3).

La comparaison de la séquence nucléotidique du même clone 10-*rho3* de *Mytilus edulis* et celle du gène *rho* d'*A. californica* a ensuite été réalisée, en utilisant un programme de type Kanehisha. L'homologie observée a également été importante puisque 79,2 % des nucléotides sont identiques entre les deux espèces (Fig. 69).

Lorsque la séquence nucléotidique du clone 10-*rho3* a été comparée avec les séquences répertoriées dans la banque de données GENBANK par un programme de

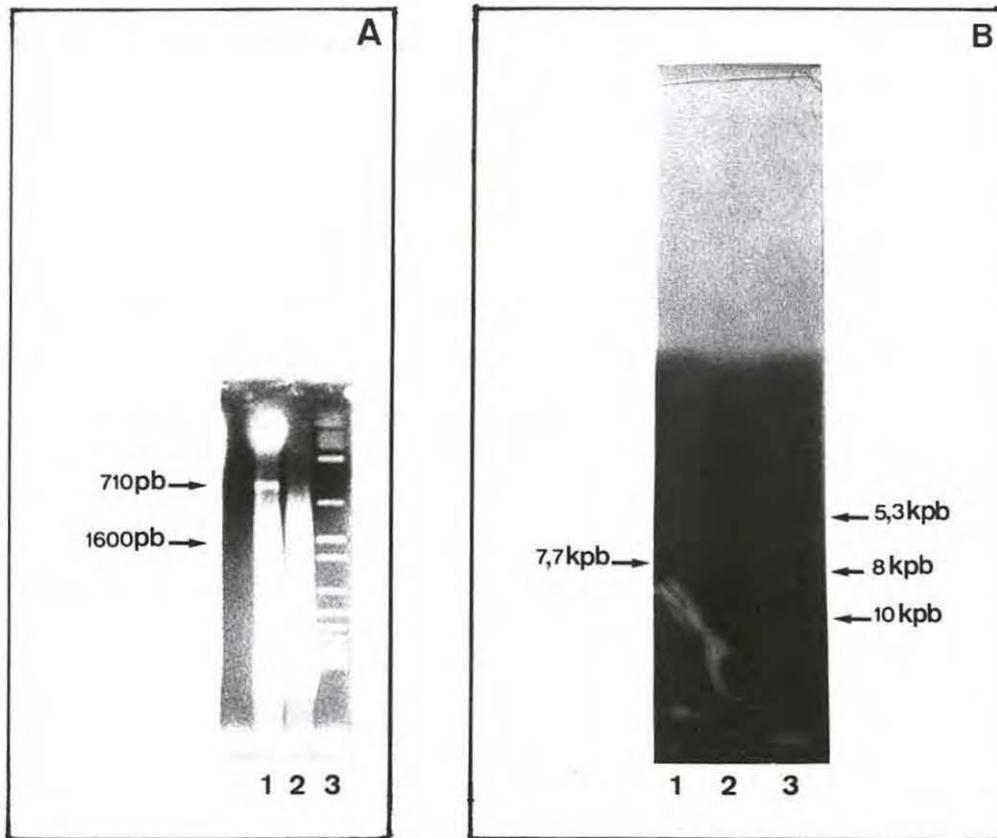


Fig. 70 : A- Electrophorèse d'ADN génomique, coupé par *EcoRI*, sur gel d'agarose 1 %

1 : 10 µg d'ADN de moule saine *M. edulis*

2 : 10 µg d'ADN d'hémocytes néoplasiques *M. trossulus*

3 : Marqueurs de poids moléculaires

B- Southern blot, ADN génomique hybridé avec le fragment *pSH-RHO2* de *Penaeus monodon*

1 : Marqueurs de poids moléculaires

2 : ADN de moule saine *M. edulis*

3 : ADN d'hémocytes néoplasiques *M. trossulus*

type FASTA, les meilleurs pourcentages d'homologie obtenus correspondent à des séquences de la famille de gènes *rho* (Annexe 3.4). Il s'avère que la conservation au niveau nucléotidique est sensiblement identique entre le clone 10-*rho*3 et les gènes *rho* de mammifères et d'*A. californica* ($\pm 80\%$) alors qu'elle est légèrement inférieure entre le clone 10-*rho*3 et le gène *rho* de levure (71,6%).

2.2.6. Southern blot

Les ADN génomiques de moule normale *M. edulis* et d'hémocytes néoplasiques *M. trossulus* ont été coupés par l'enzyme de restriction EcoRI avant de subir une électrophorèse sur gel d'agarose. A partir de l'ADN génomique issu d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus*, trois bandes répétées à 350, 710 et 1600 pb ont été détectées sur le gel, après migration et coloration au bromure d'éthidium, alors qu'un "smear" a été observé à partir d'ADN normal (Fig. 70A). Après transfert sur membrane de nylon, les ADN ont été hybridés avec une sonde de 102 pb (pSH-RHO2) correspondant à un fragment du gène *rho* de *Penaeus monodon* (Lee, comm. pers.). Dans le cas de l'ADN génomique de *M. edulis*, une bande est observée à 7,7 kpb (Fig. 70B). Dans le cas de l'ADN génomique issu d'hémocytes néoplasiques, trois bandes sont détectées à 5,3 ; 8 et 10 kpb (Fig. 70B).

3. DISCUSSION

La recherche de séquences de type *pol* a été entreprise par la technique d'amplification enzymatique, à la suite de la description d'amorces "universelles" (Donehower *et al.*, 1990). Elle a été réalisée à partir de l'ADN génomique d'hémocytes néoplasiques, en vue d'une extrapolation ultérieure à la recherche de telles séquences à partir d'ADNc obtenu d'animaux malades. Bien que l'identification de séquences de type rétroviral puisse être compliquée par la présence éventuelle de rétrovirus endogènes, comme décrits dans les cellules de Vertébrés (Vasseur, 1989), aucun fragment de la taille théorique n'a été observé, quels soient les paramètres expérimentaux. Plusieurs commentaires peuvent être énoncés. Tout d'abord, la taille des fragments complémentaires des amorces (12 et 13 nucléotides) est peut-être limitante puisqu'il est estimé qu'une longueur de 20 à 30 nucléotides est préférable pour réaliser des expériences de PCR (Innis *et al.*, 1990). De plus, les séquences du gène *pol* qui ont été comparées appartiennent à des rétrovirus isolés de mammifères et donc d'hôtes phylogénétiquement éloignés (Donehower *et al.*, 1990). Enfin, la recherche de séquences

de type rétroviral, selon cette méthode, est généralement effectuée à partir de suspensions de particules, au moins partiellement purifiées. Par référence aux travaux de Sunila chez *M. arenaria* (comm. pers.) qui suggèrent que les particules rétrovirales ne soient pas contenues dans les hémocytes néoplasiques mais dans les ovules des animaux malades, d'autres expériences pourraient être réalisées avec des ovules de *M. trossulus*.

Le choix des deux proto-oncogènes recherchés dans cette étude a été basé sur plusieurs critères : la fréquence de détection de l'oncogène *ras* dans des leucémies myéloïdes humaines (Bos, 1988) et de l'oncogène *abl* dans divers types de leucémies de mammifères (Henkemeyer *et al.*, 1988), la mise en évidence de séquences s'hybridant avec v-Ha-*ras* à partir d'ARN d'hémocytes néoplasiques (Elston, comm. pers.) et surtout la disponibilité de séquences caractérisées à la fois chez des Vertébrés et chez des Invertébrés.

La détection de séquences de proto-oncogènes a été envisagée selon la technique de PCR préférentiellement à l'hybridation avec des sondes oligonucléotidiques, qui s'est révélée infructueuse pour cribler des banques d'ADNc ou génomiques de nématodes (Sakanari *et al.*, 1989). L'analyse des homologies de séquences entre les proto-oncogènes de Vertébrés et d'Invertébrés a permis de déterminer des oligo-désoxynucléotides utilisables comme amorces. L'utilisation d'amorces internes qui amplifient un fragment plus petit compris dans une séquence précédemment amplifiée par les amorces externes a été privilégiée de manière à augmenter la spécificité de l'amplification. La technique de PCR semble très bien adaptée à la recherche de gènes qui présentent des zones de forte conservation chez des groupes zoologiques différents. Ainsi, cette technique a permis l'amplification d'une portion du gène *rho* qui présente 100 % d'homologie au niveau acides aminés avec la séquence du gène *rho* de *A. californica* et de plusieurs espèces de Vertébrés. Ce fragment cloné pourra être utilisé comme sonde pour caractériser le gène à partir d'une banque génomique de moule. L'utilisation de la sonde *pSH-RHO2* de *P. monodon*, qui présente 80 % d'homologies au niveau acides nucléiques avec le fragment 10-*rho3* de *M. edulis*, a permis de mettre en évidence une différence dans le profil de Southern puisque trois fragments ont été détectés sur l'ADN génomique d'hémocytes néoplasiques. La signification de cette différence reste à analyser dans la mesure où les ADN proviennent de deux espèces de *Mytilus*. De même, la signification des fragments répétés à 350, 710 et 1600 pb, observés sur l'ADN des hémocytes néoplasiques est à déterminer, en tenant compte de l'espèce et du degré de ploïdie mis en évidence chez les deux types de cellules tumorales.

Le séquençage des fragments obtenus après amplification avec des amorces du gène *abl* n'a pas permis de mettre en évidence chez la moule une homologie de séquences avec

d'autres gènes *abl* de Vertébrés ou d'Invertébrés. Deux clones seulement ayant été séquencés, il serait important de vérifier la séquence des autres clones. De plus, par référence aux résultats obtenus lors de la recherche d'un gène *rho* chez la moule, la détection d'un fragment correspondant à un gène *abl* devrait être améliorée en effectuant l'amplification sur de l'ADNc préparé à partir d'embryons de moule *M. edulis* ou d'hémocytes néoplasiques de *M. trossulus*.

La technique PCR pour identifier la séquence d'un fragment du proto-oncogène *rho* s'est révélée efficace et correspond à une approche originale chez les Mollusques bivalves. Elle ouvre la voie à la caractérisation de gènes après analyse des homologies de séquences publiées pour des groupes zoologiques différents. L'utilisation de cette méthode pour disposer de réactifs spécifiques sera utile pour étudier l'expression des oncogènes en relation avec la néoplasie hémocytaire, deux bandes supplémentaires s'hybridant avec une sonde *rho* de *Penaeus* ayant d'ores et déjà été identifiées sur l'ADN génomique des hémocytes néoplasiques. D'autre part, l'analyse de l'expression spatio-temporelle de ce proto-oncogène *rho* devrait permettre de mieux comprendre son rôle dans le développement embryonnaire de la moule et préciser sa fonction au sein de la famille des gènes *ras*.

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans ce mémoire ont tenté d'aborder chez les moules l'étude des hémocytes et d'une néoplasie hémocytaire sous différents aspects. Une telle approche à caractère "global" était en fait dictée par le manque quasi-total d'informations relatives aux tumeurs d'Invertébrés. De ce fait, plusieurs voies ont été explorées en se référant largement aux données acquises pour les tumeurs de Vertébrés mais en intégrant évidemment les spécificités de ces Mollusques et leur importance en aquaculture marine.

Concernant la conchyliculture, les maladies tumorales ont été jusqu'à présent considérées comme mineures et pratiquement sans impact sur les productions. Cette analyse tend à évoluer dans la mesure où les milieux côtiers sont de plus en plus soumis à des pollutions qui sont soupçonnées d'engendrer des cas de tumeurs (Reinisch *et al.*, 1984 ; Craig *et al.*, 1989). Les contrôles épidémiologiques effectués sur les cheptels semblent indiquer un accroissement des cas de tumeurs, celui-ci pouvant en fait aussi résulter d'une plus grande attention portée à ce type de syndromes. Cependant, ces derniers sont certainement trop simplement imputés à des altérations du milieu et de fait, il y a des risques d'apparition d'épidémies liées à des maladies tumorales de nature infectieuse. La mise en évidence d'une étiologie infectieuse de la néoplasie hémocytaire de la moule *Mytilus trossulus* et surtout le caractère permissif de *M. edulis* constituent des éléments importants qui devront être pris en compte par les instances internationales régissant les transferts internationaux de coquillages (Organisation Internationale des Epizooties, Conseil International pour l'Exploitation de la Mer, CEE). Actuellement la liste des maladies qui font l'objet de réglementations particulières, notamment en terme de diagnostics obligatoires, est très succincte et aucune tumeur n'est prise en compte (directive CEE 91/67 sur le transfert de produits d'aquaculture). Compte tenu, d'une part de l'importance des productions de moules *M. edulis* en Europe, et d'autre part, des observations en faveur d'une sensibilité de cette espèce à l'agent pathogène de *M. trossulus*, il semble primordial de mettre en place un contrôle épidémiologique des cheptels sur les côtes ouest et est des USA et du Canada et sur les côtes européennes. Il faut rappeler qu'une maladie parasitaire de l'huître plate, la bonamiose, a été introduite selon un circuit similaire dans les années 1979, et que depuis la production de cette espèce est réduite de 80 % (Grizel, 1985). Une autre maladie, d'origine virale (Comps *et al.*, 1976), a décimé en deux années les stocks d'huîtres portugaises, *Crassostrea angulata*, sur le littoral atlantique français (Comps and Gras, 1973). Dans ce contexte, la disponibilité de deux types d'immunodiagnostic associant des avantages et des performances complémentaires devrait faciliter la surveillance des cheptels et peut-être éviter la surprise du déclenchement d'une épidémie.

La nature virale de la néoplasie peut être fortement suspectée sur la base des résultats des expérimentations réalisées sur *M. edulis* mais aussi sur *M. trossulus* par R. Elston. Les difficultés rencontrées pour préciser l'étiologie de la tumeur reflètent l'état d'avancement de la virologie des Mollusques. A ce jour, aucun virus n'a pu être isolé et cultivé au laboratoire. Cette situation est largement expliquée par l'absence de lignées cellulaires de Mollusques bivalves en dépit des travaux relativement nombreux développés sur ce thème depuis une trentaine d'années (Mialhe *et al.*, 1988). Plusieurs équipes abordent actuellement des voies nouvelles, notamment l'immortalisation, mais les résultats pouvant être escomptés de ces recherches sont aléatoires car de nombreux points restent à solutionner concernant les milieux de cultures et, de plus, certains scientifiques considèrent que des facteurs de croissance indispensables pourraient être produits par des microorganismes associés (Collwell, comm. pers.). En intégrant la difficulté liée à l'absence de lignée cellulaire, il apparaît que la néoplasie hémocytaire de moule pourrait constituer un premier modèle expérimental pour développer des recherches en virologie et tenter de préciser la nature de l'agent concerné. En effet, plusieurs caractéristiques de cette néoplasie, associées à des acquis méthodologiques plus ou moins récents, permettent d'envisager l'établissement de systèmes de culture du virus au laboratoire. A l'échelle de l'animal, les infections expérimentales de moules, notamment *M. trossulus*, peuvent être facilement pratiquées par injection dans le sinus intramusculaire. Les moules pouvant être anesthésiées par immersion dans une solution de dichlorvos (Blateau, comm. pers.), il est aisé de pratiquer des biopsies, en particulier d'hémolymphe dans des conditions d'aseptie fiables. Ainsi des travaux à l'échelle cellulaire pourraient être réalisés sur des primocultures en bénéficiant progressivement des travaux actuellement réalisés sur l'optimisation des milieux (Réseau national sur la culture de cellules de Mollusques). Enfin, la mise au point de protocoles de microinjection d'ovocytes et d'embryons de moules (Cadoret, 1992) est un atout expérimental notable pour étudier la virose et même envisager l'embryoculture du virus puisque, dans ces conditions, le milieu de culture est simplement de l'eau de mer. Selon ce principe d'embryoculture, des premiers résultats ont été acquis pour une rickettsie de la coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus* (Cadoret *et al.*, comm. pers.). Dans le cadre de cette thèse, les travaux n'ont pas été davantage poussés dans cette direction en raison du caractère extrêmement aléatoire de leurs résultats. Par contre, cette recherche a été inscrite dans les projets de l'équipe de virologistes de la future unité mixte IFREMER/CNRS (Montpellier) dont l'orientation vers la biologie moléculaire permettra d'aborder l'identification d'éventuelles séquences provirales par des approches qui étaient difficiles dans le contexte du laboratoire de La Tremblade. L'intérêt porté à la caractérisation du virus, notamment en retenant l'hypothèse d'un rétrovirus, est motivé par le développement possible de recherches sur la transformation génétique des

Mollusques en vue de leur conférer des caractères de résistance. La disponibilité d'un tel virus, qui pourrait par ailleurs avoir un tropisme pour les ovocytes (Sunila, comm. pers.), constituerait un avantage expérimental notable pour des travaux de transfection et de transformation réalisables à l'échelle cellulaire ou embryonnaire.

Les ouvertures de ce travail dans le domaine de l'Immunologie des Mollusques sont certainement les plus nombreuses et les plus fiables. En effet, alors que le processus de transformation a été étudié de façon assez complète, du point de vue des pertes fonctionnelles des hémocytes, les phénomènes de reconnaissance et de destruction des hémocytes tumoraux devront être analysés de façon approfondie. Ce thème de recherches, qui méritera assurément d'être développé en étroite collaboration avec des spécialistes de ce domaine chez les Vertébrés, pourrait être important pour la compréhension des mécanismes antitumoraux et leur évolution phylogénétique. Les bases expérimentales et méthodologiques qui ont été établies au cours de cette thèse, en particulier le système d'études *in vitro* des interactions hémocytaires, ainsi que les réactifs immunologiques qui ont été préparés, permettront une poursuite efficace des études notamment dans l'identification génétique de molécules impliquées dans des processus de cytocidie. A l'échelle de l'immunologie des Mollusques, il faut noter le caractère original de ces travaux qui sont susceptibles de déboucher sur des applications dans le domaine de la transformation génétique pour la création de souches à capacité immunitaires accrues comme cela est déjà le cas chez les plantes (Jaynes *et al.*, 1987). Un autre aspect concerne l'ontogénie et les lignées des cellules immunitaires. Les contacts établis au cours de ce travail avec différents spécialistes a permis d'associer les caractérisations antigéniques aux critères morphologiques et biochimiques. Ces travaux, qui seront poursuivis par ces équipes, devraient être largement dévolus à l'immunoséparation et la culture *in vitro* des hémocytes pour préciser les processus de différenciation (Falkenberg *et al.*, 1989). L'importance des progrès réalisés dans le domaine de la culture *in vitro* de cellules de Mollusques apparaît, là encore, primordiale.

La recherche de proto-oncogènes ou d'oncogènes viraux a constitué la dernière facette de l'étude de la néoplasie de moule. L'effort pour amorcer des travaux sur ce thème a été fortement stimulé par les fantastiques ouvertures scientifiques et les applications possibles relatives à la connaissance et la caractérisation de ces gènes chez les Mollusques. En effet, l'expression spatio-temporelle de ces gènes est totalement inconnue, que ce soit au cours du développement embryonnaire ou au cours de phénomènes néoplasiques. Dans l'optique d'entreprendre chez les Mollusques des essais d'immortalisation de cellules en primocultures ou d'embryons par le biais du transfert de gènes, la connaissance préalable des proto-oncogènes spécifiques apparaît

indispensable. L'oncologie des Mollusques étant totalement vierge, l'approche méthodologique qui a été retenue pour entreprendre leur caractérisation a consisté à exploiter les données acquises dans d'autres groupes zoologiques. Les résultats positifs indiquent que cette stratégie pourra être certainement extrapolée à d'autres proto-oncogènes, que ce soit par la technique de PCR ou par d'autres méthodes qui étaient plus difficiles à mettre en oeuvre au laboratoire encore peu spécialisé en biologie moléculaire.

Pour conclure, je voudrais dire que ce travail, qui en raison de son caractère extrêmement pionnier a nécessité d'explorer plusieurs voies, m'a permis de découvrir un intérêt tout particulier pour l'oncologie, domaine dans lequel je pense poursuivre ma formation scientifique.

BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackermann M. F.**, Lamm K. R., Wiegand G. W. and Luster M. I., 1989. Antitumor activity of murine neutrophils demonstrated by cytometric analysis. *Cancer Res.* 49 : 528-532.
- Adema C. M.**, Van Der Knapp W. P. W. and Sminia T., 1991. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Rev. aquat. Sciences* 4 : 201-223.
- Amargier A.**, Vago C., Duthoit J. L. et Meynadier G., 1979. Formation tumorale d'origine parvovirale chez *Sibine fusca* (Lep.: Limacodidae). *Entomophaga* 24 : 259-271.
- Ambrosio L.**, Mahowald A. P. and Perrimon N., 1989. Requirement of the *Drosophila raf* homologue for *torso* function. *Nature* 342 : 288-291.
- Aoki K.** and Matsudaira H., 1977. Induction of hepatic tumors in a teleost (*Oryzias latipes*) after treatment with methylazoxymethanol acetate. *J. Natl. Cancer Inst.* 59 : 1747-1749.
- Bachère 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.
- Bachère E.**, Hervio D., Mialhe E. and Grizel H., 1990. Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Dev. comp. Immunol.* 14 : 261-268.
- Bachère E.**, Hervio D. and Mialhe E., 1991. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. aquat. Org.* 11 : 173-180.
- Barbacid M.**, 1990. Ras oncogenes: their role in neoplasia. *Eur. J. clin. Invest.* 20 : 225-235.
- Beckmann N.**, Morse M. P. and Moore C. M., 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 59 : 124-132.
- Berns A.**, Breuer M., Verbeek S. and van Lohuizen M., 1989. Transgenic mice as a means to study synergism between oncogenes. *Int. J. Cancer* 4 : 22-25.

- Blasi E., Radzioch D., Durum S. K. and Varesio L., 1987.** A murine macrophage cell line, immortalized by *v-raf* and *v-myc* oncogenes, exhibits normal macrophage functions. *Eur. J. Immunol.* 17 : 1491-1498.
- Blot M., Legendre B. and Albert P., 1990.** Restriction fragment length polymorphism of mitochondrial DNA in subantarctic mussels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 141 : 79-86.
- Bos J. L., 1988.** The *ras* gene family and human carcinogenesis. *Mutation Res.* 195 : 255-271.
- Boulo V., Mialhe E., Rogier H., Paolucci F. and Grizel H., 1989a.** Immunodiagnosis of *Bonamia ostreae* (Asctospora) infection of *Ostrea edulis* L. and subcellular identification of epitopes by monoclonal antibodies. *J. Fish Dis.* 12 : 257-262.
- Boulo V., 1989b.** Préparation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques de *Bonamia ostreae* (Asctospora) et mise au point d'immunodosages. Applications taxonomiques et épidémiologiques. Thèse de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Montpellier, pp. 66.
- Boulter C. A., Aguzzi A., Williams R. L., Wagner E. F., Evans M. J. and Beddington R., 1991.** Expression of *v-src* induces aberrant development and twinning in chimaeric mice. *Development* 111 : 357-366.
- Bradshaw T. K., 1986.** Cell transformation: the role of oncogenes and growth factors. *Mutagenesis* 1 : 91-97.
- Braylan R. C., Benson N. A. and Nourse V. A., 1984.** Cellular DNA of human neoplastic B-cells measured by flow cytometry. *Cancer Res.* 55 : 5010-5016.
- Brison O., 1986.** Le rôle des oncogènes dans la croissance des cellules normales et tumorales. *Bull. Cancer* 73 : 345-348.
- Britton K. E. and Granowska M., 1987.** Radioimmunosciintigraphy in tumour identification. *Cancer Surveys* 6 : 247-267.
- Brock V., 1989.** Supra-, inter- and intra-specific distances in a complex of Cardiidae (mollusca, bivalvia): Studies of immunological heterogeneity, biometry and DNA-variation. In: Current topics in marine biotechnology. Proceedings of the first international marine biotechnology conference, Sept 3-6, Tokyo, Japon, 315-318.
- Brooks K., 1991.** The genetics and epizootiology of hemic neoplasia. PhD thesis, University of Washington, Seattle.
- Brousseau D. J. and Baglivo J. A., 1991.** Field and laboratory comparisons of mortality in normal and neoplastic *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 57 : 59-65.

- Burny A. Y.**, Cleuter R., Kettman R., Mammerickx M., Marbaix G., Portetelle D., van der Broeke A., Willems L. and Thomas R., 1988. *Veterinary Microbiol.* 17 : 197-218.
- Cadore J. P.**, 1992. Mise au point de méthodes de manipulation embryonnaire de Mollusques bivalves. Application en génétique et pathologie infectieuse. Thèse de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Montpellier, pp. 100.
- Caudy M.**, Vässin H., Brand M., Tuma R., Jan L. Y. and Jan Y. N., 1988. *Daughterless*, a *Drosophila* gene essential for both neurogenesis and sex determination, has sequence similarities to *myc* and the *achaete-scute* complex. *Cell* 55 : 1061-1067.
- Chagot D.**, 1989. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Ascetospora). Thèse de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Montpellier, pp. 72.
- Charles L. A.**, Caldas, M. L. R., Falk R. J., Terrell R. S. and Jennette J. C., 1991. Antibodies against granule proteins activate neutrophils *in vitro*. *J. Leuk. Biol.* 50 : 539-546.
- Cheng T. C.**, 1981. Bivalves. In: Invertebrate blood cells, Ratcliff N. A. and Rowley A. F. (Eds). Academic Press, London, 233-300.
- Cheng T. C.**, 1983. The role of lysosomes in molluscan inflammation. *Am. Zool.* 23 : 129-144.
- Chong A. S.-F.**, Scuderi P., Grimes W. J. and Hersh E. M., 1989. Tumor targets stimulate IL-2 activated killer cells to produce interferon- γ and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 142 : 2133-2139.
- Cochennec N.**, Hervio D., Panatier B., Boulo V., Mialhe E., Rogier H., Grizel H. and Paolucci F., 1992. A direct monoclonal antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (Ascetospora) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca: Bivalvia). *Dis. aquat. Org.* 12 : 129-134.
- Cohen P. M.**, Seeger R. C., Triche T. J. and Israel M. A., 1988. Detection of N-*myc* gene expression in neuroblastoma tumors by *in situ* hybridization. *Amer. J. Pathol.* 131 : 391-397.
- Comps M.** and Gras P., 1973. Evolution de la mortalité des huîtres portugaises *C. angulata* dans le bassin de Marennes. C.I.E.M. CM1973/15, pp. 3.
- Comps M.**, Bonami J. R., Vago C. and Campillo A., 1976. Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata*) LmKL). *C. R. Acad. Sci. Paris* 282 : 1991-1993.

- Cooper K. R.**, Brown R. S. and Chang P. W., 1982. Accuracy of blood cytological screening techniques for the diagnosis of a possible hematopoietic neoplasm in the bivalve mollusc, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 39 : 281-289.
- Cornelisse C. J.**, van de Velde C. J. H., Caspers R. J. C., Moolenaar A. J. and Hermans J., 1987. DNA ploidy and survival in breast cancer patients. *Cytometry* 8 : 225-234.
- Cosson-Mannevy M. A.**, 1984. Putative neoplastic disorders in mussels (*Mytilus edulis*) from Southern Vancouver Island waters, British Columbia. *J. Invertebr. Pathol.* 44 : 151-160.
- Cotelle N.**, Moreau S., Bernier J. L., Catteau J. P. and Henichart J. P., 1991. Antioxidant properties of natural hydroquinones from the marine colonial tunicate *Aplidium californicum*. *Free Radical Biol. Med.* 11 : 63-68.
- Couch J. A.**, Courtney L. A., Winstead J. T. and Foss S. S., 1979. The american oyster (*Crassostrea virginica*) as an indicator of carcinogens in the aquatic environment. In: Animals as monitors of environmental pollutants. Natl. Acad. Sci., Washington D. C., 65-83.
- Craig A. C.**, Yanong R. P. E. and Reinisch C. L., 1989. Prevalence of leukemia in hemolymph of soft-shell clams, *Mya arenaria*, in Dorchester Bay, Boston Harbor. *Mar. Environ. Res.* 28 : 383-387.
- Czerniak B.**, Herz F., Wersto R. P., Alster P., Puszkina E., Schwartz E. and Koss L. G., 1990. Quantitation of oncogene products by computer-assisted image analysis and flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* 38 : 463-466.
- de Chatelet L. R.**, Long G. D., Shirley P. S., Bass D. A., Thomas M. J., Henderson F. W. and Cohen M. S., 1982. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J. Immunol.* 129 : 1589-1593.
- De Clercq E.**, Heremans U., Descamps J., Verhelst G., De Ley M. and Billiau A., 1981. Effects of E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine and other selective anti-herpes compounds on the induction of retrovirus particles in mouse BALB/3T3 cells. *Mol. Pharmacol.* 19 : 122-129.
- Delsol G.**, Woodman-Memeteau F. and Caverivière P., 1989. Les anticorps monoclonaux à visée diagnostique en pathologie tumorale. *Path. Biol.* 37 : 96-97.
- Diano M.**, Le Bivic A. and Hirn M., 1987. A method for the production of highly specific polyclonal antibodies. *Anal. Biochem.* 166 : 224-229.

- Diaz-Guerra M.**, Quintanilla M., Palmero I., Sastre L. and Renart J., 1989. Differential expression of a gene highly homologous to *c-ras* during the development of the brine shrimp *Artemia*. *Biochem. biophys. Res. Com.* 162 : 802-808.
- Dikkeboom R.**, van der Knapp W. P. W., Maaskant J. J. and de Jonge A. J. R., 1985. Different subpopulations of haemocytes in juvenile, adult and *Trichobilharzia ocellata* infected *Lymnaea stagnalis*: a characterization using monoclonal antibodies. *Z. Parasitenkd.* 71 : 815-819.
- Dikkeboom R.**, Tijnagel J. M. G. H., Mulder E. C. and van der Knapp W. P. W., 1987. Haemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. *J. Invertebr. Pathol.* 49 : 321-331.
- Dikkeboom R.**, van der Knapp W. P. W., van der Bovenkamp W., Tijnagel J. M. G. H. and Bayne C. J., 1988. The production of toxic oxygen metabolites by haemocytes of different snail species. *Dev. comp. Immunol.* 12 : 509-520.
- Donehower L. A.**, Bohannon R. C., Ford R. J. and Gibbs R. A., 1990. The use of primers from highly conserved *pol* regions to identify uncharacterized retroviruses by the polymerase chain reaction. *J. virol. Methods* 28 : 33-46.
- Drysdale B. E.**, Agarwal S. and Shin H. S., 1988. Macrophage-mediated tumoricidal activity: mechanisms of activation and cytotoxicity. In: Progress in allergy, Ishizaka K., Kallos P., Lachmann P. J. and Waksman B. H. (Eds). Karger, Basel, Switzerland, 40 : 111-161.
- Durica D. S.**, Restrepo M. A., Thomas T. L. and Beckingham K., 1987. Isolation and characterization of *abl* gene sequences in *Calliphora erythrocephala*. *Gene* 59 : 63-76.
- Elston R. A.**, Kent M. L. and Drum A. S., 1988a. Progression, lethality and remission of hemic neoplasia in the bay mussel, *Mytilus edulis*. *Dis. aquat. Org.* 4 : 135-142.
- Elston R. A.**, Kent M. L. and Drum A. S., 1988b. Transmission of hemic neoplasia in the bay mussel, *Mytilus edulis*, using whole cells and cell homogenate. *Dev. comp. Immunol.* 12 : 719-727.
- Elston R. A.**, Drum A. S. and Allen S. K., 1990. Progressive development of circulating polyploid cells in *Mytilus* with hemic neoplasia. *Dis. aquat. Org.* 8 : 51-59.
- Emami S.**, Mir L., Gespach C. and Rosselin G., 1989. Transfection of fetal rat intestinal epithelial cells by viral oncogenes: Establishment and characterization of the epithelial cells by viral oncogenes: Establishment and characterization of the E1A-immortalized SLC-11 cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 : 3194-3198.

- Esgro J. J.**, Withworth P. and Fidler I. J., 1990. *Human Cancer Immunol.* 10 : 7705-7729.
- Falkenberg U.**, Leenen P. J. M. and Falkenberg F. W., 1989. Characterization of mouse macrophage differentiation antigens by monoclonal antibodies. *Cell Immunol.* 124 : 77-94.
- Farley C. A.**, 1969. Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussels (*Mytilus edulis*). *J. Natl. Cancer Inst.* 43 : 509-516.
- Farley C. A.** and Sparks A. K., 1969. Proliferative diseases of hemocytes, endothelial cells and connective tissue cells in Mollusks. *Comp. Leuk. Res.* 36 : 610-617.
- Farley C. A.**, Otto S. V. and Reinisch C. L., 1986. New occurrence of epizootic sarcoma in Chesapeake Bay of soft-shell clams, *Mya arenaria*. *Fish. Bull.* 84 : 851-857.
- Ferré F.**, Martin P., Begue A., Ghysdael J., Saule S., Stéhelin D. et Tubiana M., 1986. Biologie moléculaire-Préparation et caractérisation d'antisera spécifiques dirigés contre différents domaines polypeptidiques codés par l'oncogène *c-myc* humain pour étudier l'expression de ce gène introduit dans des cellules de caille ou de rat. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 303 : 633-636.
- Fields B. N.**, 1990. *Virology*, vol I et II. Raven Press, 1-2336.
- Fisher C.** and Skibinski D. O., 1990. Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus*. *Proc. R. Soc. Lond.* 242 : 149-156.
- Flo R. W.**, Naess A., Lund-Johansen F., Maehle B. O., Sjursen H., Lehman V. and Solberg C. O., 1991. Negative selection of human monocytes using magnetic particles covered by anti-lymphocyte antibodies. *J. Immunol. Methods* 137 : 89-94.
- Foley E. J.**, 1953. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* 13 : 835-837.
- Freedman D.** and Auersperg N., 1986. Detection of an intracellular transforming protein (*v-Ki-ras* p21) using the flow activated cell sorter (FACS). *In Vitro cell. dev. Biol.* 22 : 621-624.
- Fridman W. H.**, 1991. L'immunothérapie des cancers. *La Recherche* 237 : 46-53.
- Funke I.**, Schlimok G., Bock B., Schweiberer B. and Riethmüller G., 1989. Targeting monoclonal antibodies to micrometastatic cells in colon and breast cancer patients. In : *Human Tumor Antigens and Specific Tumor Therapy*.
- Garrett C. T.**, 1986. Oncogenes. *Clinica Chimica Acta* 156 : 1-40.

- Gateff E.**, Gissmann L., Shrestha R., Plus N., Pfister H., Schröder J. and Hausen H. Z., 1980. Characterization of two tumorous blood cell lines of *Drosophila melanogaster* and the viruses they contain. In: *Invertebrate systems in vitro*, Kurstak, Maramorosch, Dübendorfer (Eds). Elsevier, North Holland Biomedical Press, 517-533.
- Ghadially F. N.**, 1985. Diagnostic electron microscopy of tumours. 2d edition Butterworths, London, pp. 497.
- Goddard J. M.**, Weiland J. J. and Capecchi M. R., 1986. Isolation and characterization of *Caenorhabditis elegans* DNA sequences homologous to the *v-abl* oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 : 2172-2176.
- Gorelik E.**, Gunji Y. and Goldfarb R. H., 1988. Interaction of tumor cells and immune system in the metastatic process. *Biochem. Cell Biol.* 66 : 617-625.
- Goz B.**, 1978. The effects of incorporation of 5-halogenated deoxyuridines into the DNA of eukaryotic cells. *Pharmacol. Rev.* 29 : 249-272.
- Green M.**, 1985. Transformation and oncogenesis: DNA viruses. In: *Virology*, Fields B. N. (Ed). Raven Press, New York, 183-234.
- Gregersen J. P.**, Wege H., Preiss L. and Jentsch K. D., 1988. Detection of human immunodeficiency virus and other retroviruses in cell culture supernatants by a reverse transcriptase microassay. *J. virol. Methods* 19 : 161-168.
- Grizel H.**, 1985. Etude des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné et leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse d'Etat, Montpellier, pp. 145.
- Guillermo-Suarez H.**, 1989. Activated oncogenes in human tumors. *Anticancer Res.* 9 : 1331-1344.
- Guillouzo A.** et Guguen-Guillouzo C., 1991. Des cellules isolées différenciées et immortelles : mythe ou réalité prochaine. *Médecine et Science* 7 : 2-3.
- Gutierrez M.** and Sarasquete M. C., 1986. Un caso de hemocitosarcoma hialino en el mejillon *Mytilus edulis* L. (Pelecypoda : Mytilidae) de la costa N.O. de Espana. *Investigacion Pesquera* 50 : 265-269.
- Hanahan D.**, 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 : 557-580.
- Harada T.**, Hatanaka J., Kubota S. S. and Enomoto M., 1990. Lymphoblastic lymphoma in medaka, *Oryzias latipes* (Temminck et Schlegel). *J. Fish Dis.* 13 : 169-173.

- Hart B. A. T.**, Simons J. M., Rijkers G. T., Hoogvliet J. C., van Dijk H. and Labadie R. P., 1990a. Reaction products of 1-naphtol with reactive oxygen species prevent NADPH oxidase activation in activated human neutrophils, but leave phagocytosis intact. *Free Radical Biol. Med.* 8 : 241-249.
- Hart B. A. T.**, Simons J. M., Knaan-Shanzer S. K., Bakker N. P. M. and Labadie R. P., 1990b. Antiarthritic activity of the newly developed neutrophil oxidative burst antagonist apocynin. *Free Radical Biol. Med.* 9 : 127-131.
- Hawkins W. E.**, Fournie J. W., Overstreet R. M. and Walker W. W., 1986. Intraocular neoplasms induced by methylazoxymethanol acetate in the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Natl. Cancer Inst.* 76 : 453-465.
- Hawkins W. E.**, Walker W. W., Overstreet R. M., Lytle J. S. and Lytle T. F., in press. Effects of some polynuclear aromatic hydrocarbons on small fish carcinogenesis models. *Transact. Am. Fish. Soc.*
- Henkemeyer M. J.**, Bennett R. L., Gertler F. B. and Hoffmann F. M., 1988. DNA sequence, structure and tyrosine kinase activity of the *Drosophila melanogaster* Abelson protooncogene homolog. *Mol. cell. Biol.* 8 : 843-853.
- Héral M.**, 1985. Evaluation de la capacité biotique des écosystèmes conchylicoles. Séminaire int. Recherche Développement Aménagement Conchylicole, La Rochelle, 4-9 Mars, pp. 30.
- Héral M.**, Drinkwaard A. C., Bohle B., Figueras A., Figueras A. J., Lavoie R. E. and Maurer D., 1990. Management of oyster and mussel culture. Aquaculture Europe'89 - Business Joins Science. De Pauw N. and Billard R. (Eds). European Aquaculture Society, Special Publication n° 12, Bredene, Belgium, pp. 147-162.
- Herberman R. B.** and Gorelik E., 1989. Role of the natural immune system in control of primary tumors and metastasis. In: Functions of the natural immune system, Reynolds C. W. and Wiltrout R. H. (Eds). Plenum Publishing Corporation, 3-37.
- Hervio D.**, 1992. Contribution à l'étude de *Bonamia ostreae* (Ascétospora), protozoaire parasite de l'huître *Ostrea edulis* (Bivalvia), et à l'analyse des interactions hôte-parasite. Thèse de Doctorat de l'Université Blaise Pascal de Biologie Fondamentale et Appliquée, option Protistologie, Clermont-Ferrand, pp. 170.
- Hollingdale M. R.**, Nardin E. H., Tharavanij S., Schwartz A. L. and Nussenzweig R. S., 1984. Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells. An *in vitro* assay of protective antibodies. *J. Immunol.* 132 : 909-913.
- Horisberger M.** and Rosset J., 1977. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 25 : 295-305.

- Hughes T. K. Jr**, Smith E. M., Barnett J. A., Charles R. and Stefano G. B., 1991a. Lipopolysaccharide and opioids activate distinct populations of *Mytilus edulis* immunocytes. *Cell Tissue Res.* 264 : 317-320.
- Hughes T. K. Jr**, Smith E. M., Barnett J. A., Charles R. and Stefano G. B., 1991b. LPS stimulated invertebrate hemocytes: a role for immunoreactive TNF and IL-1. *Dev. comp. Immunol.* 15 : 117-122.
- Hughes T. K.**, Chin R., Smith E. M., Leung M. K. and Stefano G. B., 1992. Similarities of signal systems in vertebrates and invertebrates: detection, action, and interactions of immunoreactive monokines in the mussel, *Mytilus edulis*. In: *Advances in Neuroimmunology*, vol. 1. Manchester U. P., 59-69.
- Hyodo-Taguchi Y.** and Matsudaira H., 1984. Induction of transplantable melanoma by treatment with N-methyl-N'-nitrosoguanidine in an inbred strain of the teleost *Oryzias latipes*. *J. Natl. Cancer Inst.* 73 : 1219-1227.
- Innis M. A.** and Gelfand D. H., 1990. Optimization of PCRs. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. and White T. J. (Eds). Academic press, San Diego, pp. 482.
- Ishikawa K.**, Kurata N., Aoki H., Kato T. and Marunouchi T., 1991. Production and characterization of a monoclonal antibody to the v-mos oncogene protein. *Hybridoma* 10 : 357-368.
- Jaffe E. S.**, 1988. Immune markers in the diagnosis of malignant lymphomas. *J. virol. Meth.* 21 : 265-274.
- 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. *Bioessays* 6 : 263-269.
- Jeanpierre M.**, 1987. A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucl. Ac. Res.* 22 : 9611.
- Jenkins J. R.**, Rudge K. and Currie G. A., 1984. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 312 : 651- 654.
- Jeurissen S. H. M.**, Janse E. M., Koch G. and De Boer G. F., 1988. The monoclonal antibody CVI-CHNL-68.1 recognizes cells of the monocyte-macrophage lineage in chickens. *Dev. comp. Immunol.* 12 : 855-864.
- Kahn A.** et Briand P., 1991. Etablissement de lignées cellulaires par oncogénèse ciblée. *Médecine et Science* 7 : 4-9.

- Kawasaki E. S.**, Clark S. S., Coyne M. Y., Smith S. D., Champlin R., Witte O. N. and Mc Cormick F. P., 1988. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 : 5698-5702.
- Kelekar A.** and Cole M. D., 1987. Immortalization by *c-myc*, *H-ras*, and E1A oncogenes induces differential cellular gene expression and growth factor responses. *Mol. cell. Biol.* 7 : 3899-3907.
- Kent M. L.**, Elston R. A., Wilkinson M. T. and Drum A. S., 1989. Impaired defense mechanisms in bay mussels, *Mytilus edulis*, with hemic neoplasia. *J. Invertebr. Pathol.* 53 : 378-386.
- Kent M. L.**, Wilkinson M. T., Drum A. S. and Elston R. A., 1991. Failure of transmission of hemic neoplasia of bay mussels, *Mytilus trossulus*, to other bivalve species. *J. Invertebr. Pathol.* 57 : 435-436.
- Kiesel A.**, 1992. Bouchots et filières. L'europe aime les moules. *Le Marin* 2356 : 20-22.
- Kim H.**, Pangalis G. A., Payne B. C., Kadin M. E. and Rappaport H., 1982. Ultrastructural identification of neoplastic histiocytes-monocytes. An application of a newly developed cytochemical method. *Am. J. Pathol.* 106 : 204-223.
- Kimura T.**, Yoshimizu M. and Tanaka M., 1981. Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou* - II. Oncogenic nature. *Fish Pathol.* 15 : 149-153.
- Kimura I.**, Taniguchi N., Kumai H., Tomita I., Kinase N., Yoshizaki K., Ito M. and Ishikawa T., 1984. Correlation of epizootiological observations with experimental data: chemical induction of chromatophoromas in the croaker, *Nibea mitsukurii*. *Natl. Cancer Int. Monogr.* 65 : 139-154.
- Kitabayashi I.**, Saka F., Gachelin G. and Yokoyama K., 1990. Nucleotide sequence of rat *c-jun* protooncogene. *Nuc. Acids Res.* 18 : 3400.
- Klebanoff S. J.** and Clark R. A., 1978. The neutrophil: function and clinical disorders. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 810.
- Klein J.**, 1982. Immunology. The science of self-nonsel discrimination. Wiley Interscience Publication, New York, pp. 687.
- Köhler G.** and Milstein C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 : 495-497.
- Koji T.**, Izumi S., Tanno M., Moriuchi T. and Nakane P. K., 1988. Localization *in situ* of *c-myc* mRNA and *c-myc* protein in adult mouse testis. *Histochem. J.* 20 : 551-557.

- Komatsubara S.**, Mori, K., Hatanaka M., Amagai T., Inaba K., Shimizu S. and Muramatsu S., 1988. Immortalization of murine leukocytes by oncogenes. II. Phenotypic characterization of transformants immortalized by *v-src* or *Ha-ras* oncogenes: Expression of B220, a B-cell lineage specific antigen. *Microbiol. Immunol.* 32 : 869-875.
- Kroschinski J.** and Renwantz L., 1988. Determination of pH values inside the digestive vacuoles of hemocytes from *Mytilus edulis*. *J. invertebr. Pathol.* 51 : 73-79.
- Kumar R.** and Barbacid M., 1988. Oncogene detection at the single cell level. *Oncogene* 3 : 647-651.
- Kuzumaki N.**, Oda A., Yamagiwa S., Taniguchi N., Kobayashi H. and Oikawa T., 1986. Establishment of four mouse hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies reactive with *ras* oncogene product p21. *J.N.C.I.* 77 : 1273-1279.
- Lanza G.**, 1988. *ras* p21 oncoprotein expression in human colonic neoplasia - an immunohistochemical study with monoclonal antibody RAP-5. *Histopathology* 12 : 595-609.
- Larson K. G.**, Roberson B. S. and Hetrick F. M., 1989. Effect of environmental pollutants on the chemiluminescence of hemocytes from the american oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. aquat. Org.* 6 : 131-136.
- Larzul D.**, 1989. Une évolution dans le diagnostic : l'amplification enzymatique *in vitro*. *Biofutur* 75 : 45-49.
- Lassam N.**, Feigenbaum L., Vogel J. and Jay G., 1989. Transgenic approach for the study of pathogenesis induced by human viruses. *Mol. Biol. Med.* 6 : 319-331.
- Lauckner G.**, 1983. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: Diseases of marine animals, vol II, Kinne O. (Ed.). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, 477-961.
- Leavitt D. F.**, McDonald Capuzzo J., Smolowitz R. M., Miosky D. L., Lancaster B. A. and Reinisch C. L., 1990. Hematopoietic neoplasia in *Mya arenaria*: prevalence and indices of physiological condition. *Mar. Biol.* 105 : 313-321.
- Le Gall G.**, Bachère E., Mialhe E. and Grizel H., 1989. Zymosan and specific-rickettsia interaction of oxygen free radical production in *Pecten maximus* hemocytes. *Dev. comp. Immunol.* 13 : 448.
- Le Gall G.**, Bachère E. and Mialhe E., 1991. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific Rickettsiales-like organisms. *Dis. aquat. Org.* 11 : 181-186.

- Leippe M.** and Renwranz L., 1988. Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. *Dev. comp. Immunol.* 12 : 297.
- Lemieux S.**, Ouellet-Talbot F., Lusignan Y., Morelli L., Labreche N., Gosselin P. and Lecomte J., 1991. Identification of murine natural killer cell subsets with monoclonal antibodies derived from 129 anti-C57BL/6 immune spleen cells. *Cell. immunol.* 134 : 191-204.
- Li L.**, Kilbourn R. G., Adams J. and Fidler I. J., 1991. Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Res.* 51 : 2531-2535.
- Lichtenstein A. K.**, Ganz T., Selsted M. E. and Lehrer L. I., 1988. Synergistic cytotoxicity mediated by hydrogen peroxide combined with peptide defensins. *Cellular Immunol.* 114 : 104-116.
- Lichtenstein A.**, 1990. Granulocytes as possible effectors of tumor immunity. *Immunol. Allergy Clinics North America* 10 : 731-746.
- Lightner D. V.** and Brock J. A., 1987. A lymphoma-like neoplasm arising from hematopoietic tissue in the white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea : Decapoda). *J. Invertebr. Pathol.* 49 : 188-193.
- Lopez Gomez C.**, Goggin L., Bachère E. and Villalba A., 1992. Preliminary study of cellular defense mechanism of *Ruditapes decussatus*. Fifth International Colloquium on Pathology in marine aquaculture, Montpellier, France, April 2-4.
- Lowe D. M.** and Moore M. N., 1978. Cytology and quantitative cytochemistry of a proliferative atypical hemocytic condition in *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mollusca). *J. Natl. Cancer Inst.* 60 : 1455-1459.
- Löwer J.**, Wondrak E. M. and Kurth R., 1987. Genome analysis and reverse transcriptase activity of human taretocarcinoma-derived retroviruses. *J. gen. Virol.* 68 : 2807-2815.
- Lowy D. R.**, 1985. Transformation and oncogenesis: retroviruses. In: *Virology*, Fields B. N. (Ed), Raven Press, New York, 235-263.
- Lundberg S.**, Carstensen J. and Rundquist I., 1987. DNA flow cytometry and histopathological grading of paraffin-embedded prostate biopsy specimens in a survival study. *Cancer Res.* 47 : 1973-1977.
- Mac Cormick F.**, 1989. The polymerase chain reaction and cancer diagnosis. *Cancer cells* 1 : 56-61.
- Mac Donald J. H.** and Koehn R. K., 1988. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. *Mar. Biol.* 99 : 111-118.

- Mac Mahon G.**, Huber L. J., Stegeman J. J. and Wogan G. N., 1988. Identification of the *K-ras* oncogene in a neoplasm isolated from winter flounder. *Mar Environ. Res.* 24 : 345-350.
- Mack D. H.** and Sninsky J. J., 1988. A sensitive method for the identification of uncharacterized viruses related to known virus groups: hepadnavirus model system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 : 6977-6981.
- Madaule P.** and Axel R., 1985. A novel *ras*-related gene family. *Cell* 41 : 31-40.
- Martin-Zanca D.**, Barbacid M. and Parada L. F., 1990. Expression of the *trk* proto-oncogene is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development. *Genes Dev.* 4 : 683-694.
- Masahito P.**, Ishikawa T. and Sugano H., 1988. Fish tumors and their importance in cancer research. *Jpn. J. Cancer Res.* 79 : 545-555.
- Masuko T.**, Sugahara K., Kozono M., Otsuki S., Akiyama T., Yamamoto T., Toyoshima K. and Hashimoto Y., 1989. A murine monoclonal antibody that recognizes a extracellular domain of the human *c-erbB-2* protooncogene product. *Jpn J. Cancer Res.* 80 : 10-14.
- Mäueler W.**, Raulf F. and Schartl M., 1988. Expression of proto-oncogenes in embryonic, adult and transformed tissue of *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae). *Oncogene* 2 : 421-430.
- Méchal M.**, Evan G. et Gusse M., 1989. Rôle de la protéine *c-myc* dans le développement embryonnaire précoce chez le Xénope. *C. R. Acad. Sci.*, Paris 308 : 213-218.
- Mialhe E.**, Bachère E., Le Bec C. and Grizel H., 1985. Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa: Ascetospora) parasites de bivalves marins. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série III*, 301 : 137-142.
- Mialhe E.**, Boulo V. and Grizel, H., 1988. Bivalve mollusc cell culture. In: Disease processes in marine bivalve Molluscs, Fisher W. S. (Ed). American Fisheries Society, Bethesda, U.S.A, *Special publication* 18 : 311-315.
- Mifflin D.** and Robinson J. J., 1988. Proto-oncogene homologous sequences in the sea urchin genome. *Bioscience Reports* 8 : 415-419.
- Miller N. W.**, Bly J. E., van Ginkel F., Elisaesser C. F. and Clem L. W., 1987. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of fonctionnally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. *Dev. comp. Immunol.* 11 : 739-747.

- Miosky D. L.**, Smolowitz R. M. and Reinisch C. L., 1989. Leukemia cell specific protein of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 53 : 32-40.
- Mix M. C.** and Schaffer R. L., 1979. Benzo(α)pyrene concentrations in mussels (*Mytilus edulis*) from Yaquina Bay, Oregon, during June 1976-May 1978. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 23 : 677-684.
- Mix M. C.**, 1983. Haemic neoplasms of bay mussels, *Mytilus edulis* L., from Oregon: occurrence, prevalence, seasonality and histopathological progression. *J. Fish Dis.* 6 : 239-248.
- Mix M. C.**, 1986. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: a critical literature review. In: Marine Environmental Research Special Issue, Heath G. W. (Ed.). Elsevier Applied Science, 20 : 1-141.
- Mohandas A.**, Cheng T. C. and Cheng J. B., 1985. Mechanism of lysosomal enzyme release from *Mercenaria mercenaria* granulocytes: a scanning electron microscopy study. *J. Invertebr. Pathol.* 46 : 189-197.
- Monden T.**, Morimoto H., Higashiyama M., Murotani M., Tomita N., Shimano T., Okuda H. and Mori T., 1988. *In situ* detection of Ha-*ras* and c-*myc* mRNA in cancer cell lines and tissue sections of colorectal cancer using sulfonated DNA probes. *Acta Histochem. Cytochem.* 21 : 201-208.
- Moore M. N.** and Lowe D. M., 1979. The cytology and occurrence of granulocytomas in mussels. *Mar. Pollut. Bull.* 10 : 137-141.
- Moore C. A.** and Gelder S. R., 1985. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 104 : 242-249.
- Moore C. A.**, Beckmann N. S. and Morse M. P., 1988. Comparative cytoskeletal structure of normal and diseased hemocytes in *Mya arenaria*. *Amer. Zool.* 28 : 58A (abstract).
- Moore J. D.**, Elston R. A., Drum A. S. and Wilkinson M. T., 1991a. Alternate pathogenesis of systemic neoplasia in the bivalve mollusc *Mytilus*. *J. Invertebr. Pathol.* 58 : 231-243.
- Moore J. D.**, Noël D. and Elston R. A., 1991b. Diagnosis of systemic neoplasia in the bivalve mollusc *Mytilus*. 14th Annual AFS-FHS meeting/32d Annual Western Fish Disease Conference, Newport, Oregon, July 31-August 3.
- Mori K.**, Murayama K., Kanno N., Nakamura M., Ohira E., Kato Y. and Nomura T., 1984. Occurrence and characterization of the defense factors in the Japanese oyster *C. gigas*. *Tohoku J. Agr. Res.* 35 : 55-61.

- Mourton C., Boulo V., Chagot D., Hervio D., Mialhe E. and Grizel H., 1992.** Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): *in vitro* system establishment. *J. Invertebr. Pathol.* 59 : 235-240.
- Müller R., Slamon D. J., Tremblay J. M., Cline M. J. and Verma I. M., 1982.** Differential expression of cellular oncogenes during pre- and postnatal development of the mouse. *Nature* 299 : 640-643.
- Myers J. N., Kokai Y., Cohen J. A. and Greene M. I., 1989.** Monoclonal antibodies to oncogene encoded proteins. In: *The Year in Immunology 1988. Immunoregulatory cytokines and cell growth*, Cruse J. M. and Lewis R. E. Jr (Eds). Year Immunol. Basel, Karger, Switzerland 5 : 178-194.
- Nakagawara A., Nathan C. F. and Cohn Z. A., 1981.** Hydrogen peroxide metabolism in human monocytes during differentiation *in vitro*. *J. clin. Invest.* 68 : 1243-1252.
- Nakatsugawa T., 1990.** Infectious nature of a disease in cultured juvenile abalone with muscular atrophy. *Fish Pathol.* 25 : 207-211.
- Nemoto N., Kodama K., Tazawa A., Masahito P. and Ishikawa T., 1986.** Extensive sequence homology of the goldfish *ras* gene to mammalian *ras* genes. *Differentiation* 32 : 17-23.
- Noël D., 1988.** Etude d'une prolifération hémocytaire chez la moule *Mytilus edulis*. Rapport de D.E.A., spécialité Biologie-Santé, Bordeaux, pp. 21.
- Ojcius D. M., Zheng L. M., Spihicas E. C., Zychlinsky A. and Young J. D., 1991.** Subcellular localization of perforin and serine esterases in lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T cells by immunogold labelling. *J. Immunol.* 146 : 4427-4432.
- Oprandy J. J., Chang P. W., Pronovost A. D., Cooper K. R., Brown R. S. and Yates V. J., 1981.** Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 38 : 45-51.
- Oprandy J. J. and Chang P. W., 1983.** 5-bromodeoxyuridine induction of hematopoietic neoplasia and retrovirus activation in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 42 : 196-206.
- Ordóñez N. G., Sneige N., Hickey R. C. and Brooks T. E., 1988.** Use of monoclonal antibody HMB-45 in the cytologic diagnosis of melanoma. *Int. Acad. Cyt. Acta Cytologica* : 684-688.
- Overstreet R. M. and van Devender T., 1978.** Implication of an environmentally induced hamartoma in commercial shrimps. *J. Invertebr. Pathol.* 31 : 234-238.

- Ozato K.**, Kondoh H., Inohara H., Iwamatsu T., Wakamatsu Y. and Okada T. S., 1986. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken δ -crystallin gene in medaka embryos. *Cell Differ.* 19 : 237-244.
- Paolucci F.**, 1983. Optimisation des techniques de préparation des anticorps monoclonaux par hybridation lymphocytaire. Rapport de D.E.A., spécialité Immunologie, Montpellier, pp. 95.
- Papadimitriou K.**, Yiagnisis M., Tolis G. and Spandidos D. A., 1988. Immunohistochemical analysis of the *ras* oncogene protein product in human thyroid neoplasms. *Anticancer Res.* 8 : 1223-1228.
- Papamichalis G.**, Francia K., Karachaliou F. E., Anastasiades O. TH. and Spandidos D., A., 1988. Expression of the *c-myc* oncoprotein in human metaplastic epithelial cells of fibrocystic disease. *Anticancer Res.* 8 : 1217-1222.
- Papas T. S.**, Dahlberg J. E. and Sonstegard R. A., 1976. Type C virus in lymphosarcoma in northern pike (*Esox lucius*). *Nature* 261 : 506-508.
- Papas T. S.**, Pry T. W., Schafer M. P. and Sonstegard R. A., 1977. Presence of DNA polymerase in lymphosarcoma in northern pike (*Esox lucius*). *Cancer Res.* 37 : 3214-3217.
- Peters E. C.**, 1988. Recent investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. In: Disease processes in marine bivalve molluscs, Fisher W. S. (Ed). American Fisheries Society, Bethesda, USA, *Special Publication* 18 : 74-92.
- Pipe R. K.**, 1990a. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.* 261 : 261-268.
- Pipe R. K.**, 1990b. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* 22 : 595-603.
- Pipe R. K.**, 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. comp. Immunol.* 16 : 111-122.
- Rasmussen L. P. D.**, 1986. Virus-associated granulocytomas in the marine mussel, *Mytilus edulis*, from three sites in Denmark. *J. Invertebr. Pathol.* 48 : 117-123.
- Reinisch C. L.**, Charles A. M. and Troutner J., 1983. Unique antigens on neoplastic cells of the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Dev. comp. Immunol.* 7 : 33-39.
- Reinisch C. L.**, Charles A. M. and Stone A. M., 1984. Epizootic neoplasia in soft shell clams collected from New Bedford Harbor. *Hazardous Waste* 1 : 73-81.

- Renwrantz L., Daniels J. and Hansen P. D., 1985.** Lectin-binding to hemocytes of *Mytilus edulis*. *Dev. comp. Immunol.* 9 : 203-210.
- Renwrantz L., 1986.** Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. *Symp. Zool. Soc. London* 56 : 81.
- Renwrantz L., 1990.** Internal defense system of *Mytilus edulis*. In: *Neurobiology of Mytilus edulis*, Stefano G. B. (Ed). Manchester University Press, Manchester, U. K., 256-275.
- Richmond R. E., Pereira M. A., Carter J. H., Carter H. W. and Long R. E., 1988.** Quantitative and qualitative immunohistochemical detection of *myc* and *src* oncogene proteins in normal, nodule and neoplastic rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* 36 : 179-184.
- Rijsewijk F., Schuermann M., Wagenaar E., Parren P., Weigel D. and Nusse R., 1987.** The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50 : 649-657.
- Roberson S. M. and Walker W. S., 1988.** Immortalization of cloned mouse splenic macrophages with a retrovirus containing the *v-raf/mil* and *v-myc* oncogenes. *Cell. Immunol.* 116 : 341-351.
- Robert-Lézénès J., Meneceur P., Ray D. and Moreau-Gachelin F., 1988.** Protooncogene expression in normal, preleukemic, and leukemic murine erythroid cells and its relationship to differentiation and proliferation. *Cancer Res.* 48 : 3972-3976.
- Rodenburg C. J., Cornelisse C. J., Heintz P. A. M., Hermans J. and Fleuren G. J., 1987.** Tumor ploidy as a major prognostic factor in advanced ovarian cancer. *Cancer* 59 : 317-323.
- Rosen N. and Klebanoff S. J., 1977.** Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J. Biol. Chem.* 252 : 4803-4810.
- Rovinski B. and Benchimol S., 1988.** Immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. *Oncogene* 2 : 445-452.
- Sakanari J. A., Staunton C. E., Eakins A. E. and Craik C. S., 1989.** Serine proteases from nematode and protozoan parasites: isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 86 : 4863-4867.
- Salup R. R. and Herberman R. B., 1988.** Role of natural killer cells in control of metastases and for therapy of murine cancer. *J. Immunol. Immunopharmacol.* 8 : 151-158.

- Sambrook J.**, Fritsch E. F. and Maniatis T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger F.**, Nicklen S. and Coulson A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl. Acad. Sci.* 74 : 5463-5467.
- Sano T.**, Fukuda H., Okamoto N. and Kaneko F., 1983. Yamame tumor virus: lethality and oncogenicity. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48 : 1159-1163.
- Schartl M.**, Wittbrodt J., Maueler W., Raulf F., Adam D., Hannig G., Telling A., Storch F., Andexinger S. and Robertson S. M., 1990. Oncogenes and melanoma formation in *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae). In: *New Trends in Ichthyology*, Schroder J. H. and Schartl M. (Eds). Parey Verlag, Berlin, pp. .
- Schreiber H.**, Gressler V. H., Teng M. N., Rothstein J. L. and Rowley D. A., 1990. Cytokines as effectors in tumor immunity. *Immunol. Allergy Clinics North America* 10 : 747-764.
- Schwab M.** and Amler L. C., 1990. Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1 : 181-193.
- Schwamberger G.**, Flesch I. and Ferber E., 1991. Tumoricidal effector molecules of murine macrophages. *Pathobiol.* 59 : 248-253.
- Shaw P.**, Buckman R., Law J., Baumal R. and Marks A., 1988. Reactivity of tumor cells in malignant effusions with a panel of monoclonal and polyclonal antibodies. *Tumor Biol.* 9 : 101-109.
- Shiba T.** and Saigo K., 1983. Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element *copia* in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 302 : 119-124.
- Shih A.**, Misra R. and Rush M., G., 1989. Detection of multiple, novel reverse transcriptase coding sequences in human nucleic acids: relation to primate retroviruses. *J. Virol.* 63 : 64-75.
- Shilo B.Z.** and Weinberg R. A., 1981. DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78 : 6789-6792.
- Simons J. W. I. M.**, Bols B. L. M. C. and Naaktgeboren J. M., 1990a. Immortalization as an endpoint in studies on malignant transformation. In: *Mutation and the Environment*, Part. D. Wiley-Liss Inc, 207-217.
- Simons J. M.**, Hart B. A. T., Ip Vai Ching T. R. A. M., van Dijk H. and Labadie R. P., 1990b. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radical Biol. Med.* 8 : 251-258.

- Sinnhuber R. O.**, Hendricks J. D., Wales J. H. and Putnam G. B., 1977. Neoplasms in rainbow trout, a sensitive animal model for environmental carcinogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 298 : 389-408.
- Slot J. W.** and Geuze H. J., 1985. A new method of preparing colloidal gold probes for multiple labelling cytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.* 38 : 87-93.
- Sminia T.** and van der Knaap W. P. W., 1987. Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev. comp. Immunol.* 11 : 17-28.
- Smolowitz R. M.** and Reinisch C. L., 1986. Indirect peroxidase staining using monoclonal antibodies specific for *Mya arenaria* neoplastic cells. *J. Invertebr. Pathol.* 48 : 139-145.
- Smolowitz R. M.**, Miosky D., Reinisch C., L., 1989. Ontogeny of leukemic cells of the soft shell clam. *J. Invertebr. Pathol.* 53 : 41-51.
- Sorrentino V.**, Nebreda A. R., Alonso T. and Santos E., 1989. Preparation, characterization and properties of monoclonal antibodies against intact H-ras p21 proteins. *Oncogene* 4 : 215-221.
- Sparks A. K.** and Lightner D. V., 1973. A tumorlike papilliform growth in the brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *J. Invertebr. Pathol.* 22 : 203-212.
- Sparks A. K.**, 1985. Synopsis of Invertebrate Pathology Exclusive of Insects. Elsevier, Amsterdam, pp. 423.
- Sparks A. K.** and Morado J. F., 1987. A putative carcinoma-like neoplasm in the hingut of a red king crab, *Paralithodes camtschatica*. *J. Invertebr. Pathol.* 50 : 45-52.
- Stéhelin D.**, Varmus H. E., Bishop J. M. and Vogt P. K., 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260 : 170-173.
- Stéhelin D.**, 1988. Dissection moléculaire des cancers. *Bull. Inst. Pasteur* 86 : 225-242.
- Studzinski G. P.**, 1989. Oncogenes, growth, and the cell cycle: an overview. *Cell Tissue Kinet.* 22 : 405-424.
- Szentirmay Z.**, Ishizaka Y., Ohgaki H., Tahira T., Nagao M. and Esumi H., 1990. Demonstration by *in situ* hybridization of *ret* proto-oncogene mRNA in developing placenta during mid-term of rat gestation. *Oncogene* 5 : 701-705.
- Takahashi K.**, Mori K. and Nomura T., 1986. Occurrence and characterization of lysozyme in the marine bivalves. *Bull. japan. Soc. Sci. Fisheries* 52 : 863-868.

- Takeya M.**, Hsiao L., Shimokawa Y. and Takahashi K., 1989. Heterogeneity of rat macrophages recognized by monoclonal antibodies: an immunohistochemical and immunoelectron microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.* 37 : 635-641.
- Tambourin P.**, 1990. Oncogènes et oncogénèse. *Médecine/Sciences* 6 : 340-342.
- Taya Y.**, Terada M. and Sugimura T., 1987. Role of oncogene amplification in tumor progression. In: *Advances in viral oncology*, vol. 7, Klein G. (Ed). Raven Press, New York, 141-153.
- Taylor D. W.**, Evans C. B., Hennessy G. W. and Aley S. B., 1986. Use of a two-sited monoclonal antibody assay to detect a heat stable malarial antigen in the sera of mice infected with *Plasmodium yoelii*. *Infect. Immunity* 51 : 884-890.
- Thompson D.**, Norbeck U., Olsson L. I., Constantin-Teodosiu D., van der Zee J. and Moldevs P., 1989. Peroxidase-catalysed oxidation of eugenol: formation of (a) cytotoxic metabolite(s). *J. Biol. Chem.* 264 : 1016-1021.
- Thor A.**, Simpson J., Ohuchi N., Hand P. H., Szpak C. A., Johnston W. W. and Schlom J., 1988. Monoclonal antibodies and human carcinomas: diagnostic and experimental applications. *Advances Immunohistochemistry* : 165-184.
- Tomida M.**, 1985. Regulation of differentiation of normal and leukemic precursors of macrophages. In: *Mononuclear phagocytes: physiology and pathology*, Dean R. T. and Jessup W. (Eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 436.
- Tousignant J.** and Grossin M., 1990. Les marqueurs immunohistochimiques des mélanomes malins. *Ann. Pathol.* 10 : 6-19.
- Trush M. A.**, Wilson M. E. and van Dyke K., 1978. The generation of chemiluminescence (CL) by phagocytic cells. *Meth. Enzymol.* 8 : 462-494.
- Ullrich A.** and Schlessinger J., 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61 : 203-212.
- Vago C.**, 1975. Formations tumorales et proliférations cellulaires chez les invertébrés. *C. R. Soc. Biol.* 169 : 778-784.
- van Beneden R. J.**, Watson D. K., Chen T. T., Lautenberger J. A. and Papas T. S., 1986. Cellular *myc* (*c-myc*) in fish (rainbow trout): its relationship to other vertebrate *myc* genes and to the transforming genes of the MC29 family viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 : 3698-3702.
- van Holde K. E.** and Miller K. I., 1982. Haemocyanins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 15 : 1-129.

- Vasseur M., 1989. Les virus oncogènes. Hermann (Ed), Paris, pp. 566.
- Vize P. D., Vaughan A. and Krieg P., 1990. Expression of the N-myc proto-oncogene during the early development of *Xenopus laevis*. *Development* 110 : 885-896.
- Wadler S. and Schwartz E. L., 1990. Antineoplastic activity of the combination of interferon and cytotoxic agents against experimental and human malignancies: a review. *Cancer Res.* 50 : 3473-3486.
- Walker C. W., Boom J. D. G. and Marsh A. G., 1992. Novel c-myc gene is seasonally expressed in an invertebrate testis. *Oncogene*, in press.
- Wang M. H., Flad H. D., Böhle A., Chen Y. Q. and Ulmer A. J., 1991. Cellular cytotoxicity of human natural killer cells and lymphokine-activated killer cells against bladder carcinoma cell lines. *Immunol. Letters* 27 : 191-198.
- Webb L. S., Keele B. B. and Johnston R. B., 1974. Inhibition of phagocytosis-associated chemiluminescence by superoxide dismutase. *Infect. Immun.* 9 : 1051-1056.
- Welch W. D., Graham C. W., Zaccari J. and Thrupp L. P., 1980. Analysis and comparison of the luminol-dependent chemiluminescence response of alveolar macrophages and neutrophils. *J. Reticulo-endothelial Soc.* 28 : 275-284.
- Weinstein I. B., 1988. The origins of human cancer: Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment - Twenty-seventh G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 48 : 4135-4143.
- Wirgin I., Currie D. and Garte S. J., 1989. Activation of the K-ras oncogene in liver tumors of Hudson River tomcod. *Carcinogenesis* 10 : 2311-2315.
- Wondrak E. M., Löwer J. and Kurth R., 1986. Functional purification and enzymatic characterization of the RNA-dependent DNA polymerase of human deficiency virus. *J. gen. Virol.* 67 : 2791-2797.
- Xiong Y. and Eickbush T. H., 1988. Similarity of reverse transcriptase-like sequences of viruses, transposable elements, and mitochondrial introns. *Mol. Biol. Evol.* 5 : 675-690.
- Yevich P. P. and Barszcz C. A., 1977. Neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*) collected from oil-impacted sites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 298 : 409-426.
- Yolken R. H., 1982. Enzyme immunoassay for the detection of infectious antigens in body fluids. Current limitations and future prospects. *Rev. infect. Dis.* 4 : 35-58.

- Yoshino T. P.** and Cheng T. C., 1976. Fine structural localization of acid phosphatase in granulocytes of the pelecypod *Mercenaria mercenaria*. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 95 : 215-220.
- Yoshino T. P.**, 1983. Lectins and antibodies as molecular probes of molluscan hemocyte surface membranes. *Dev. comp. Immunol.* 7 : 641-644.
- Yoshino T. P.** and Granath W. O. Jr., 1983. Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers. *Cell Tissue Res.* 232 : 553-564.
- Zimmerman R. J.**, Marafino B. J., Chan A., Landre P. and Winkelhake J. L., 1989. The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant human tumor necrosis factor *in vivo*. *J. Immunol.* 142 : 1405-1409.

ANNEXES I - BIBLIOGRAPHIE

ANNEXE 1.1

Principaux groupes d'agents pathogènes décrits chez les Mytilidae
(sauf indication contraire, d'après Lauckner, 1983)

groupe	genre	espèce (référence)
virus	picornavirus	<i>M. edulis</i> (Rasmussen, 1986)
bactéries	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Vibrio sp.</i>	<i>Mytilus sp.</i> <i>Mytilus sp.</i>
rickettsies	<i>Rickettsia sp.</i>	<i>Mytilus sp.</i>
chlamydies	<i>Chlamydia sp.</i>	<i>Mytilus sp.</i>
protozoaires	<u>Apicomplexa</u> : <i>Nematopsis schneideri</i> <u>Ascetospora</u> : <i>Marteilia refringens</i> <i>Marteilia maurini</i> <i>Haplosporidium tumefaciens</i> <u>Ciliophora</u> : <i>Gargarius gargarius</i> <u>Protophyta</u> : <i>Gyrodinium aureolum</i>	<i>M. edulis</i> <i>M. edulis</i> <i>M. galloprovincialis</i> <i>M. californianus</i> <i>M. edulis</i> <i>M. edulis</i>
métazoaires	<u>trématodes</u> : <i>Proisorhynchus squamatus</i> <i>Proctoeces maculatus</i> <i>Hismasthla elongata</i> <i>Cercaria noblei</i> <u>gastéropodes</u> : <i>Odostomia rissoides</i> <u>annélides</u> : <i>Polydora ciliata</i> <u>copépodes</u> : <i>Mytilicola intestinalis</i>	<i>M. edulis</i> et <i>M. galloprovincialis</i> <i>M. edulis</i> et <i>M. galloprovincialis</i> <i>M. edulis</i> <i>M. californianus</i> <i>M. edulis</i> <i>M. edulis</i>

(en gras: maladies les plus importantes)

ANNEXE 1.2

Importance des tumeurs chez les Mollusques
(sauf indication contraire, d'après Mix, 1986 ; Peters, 1988)

type de néoplasie	espèce	localisation
néoplasie hémocytaire	<i>Crassostrea gigas</i>	U.S.A. France
	<i>Crassostrea virginica</i>	U.S.A.
	<i>Ostrea edulis</i>	Espagne Yougoslavie France U.S.A.
	<i>Ostrea lurida</i>	U.S.A.
	<i>Ostrea chilensis</i>	Chili
	<i>Mya arenaria</i>	U.S.A.
	<i>Cerastoderma edule</i>	Irlande France
néoplasme gonadal	<i>Crassostrea virginica</i>	U.S.A.
	<i>Mya arenaria</i>	U.S.A.
	<i>Mercenaria mercenaria</i>	U.S.A.
papillome	<i>Crassostrea commercialis</i>	Australie
	<i>Saxidomus giganteus</i>	U.S.A.
carcinome	<i>Macoma baltica</i>	U.S.A.
tumeur nerveuse	<i>Nordotis discus</i>	Japon (Nakatsuga- wa et al., 1990)

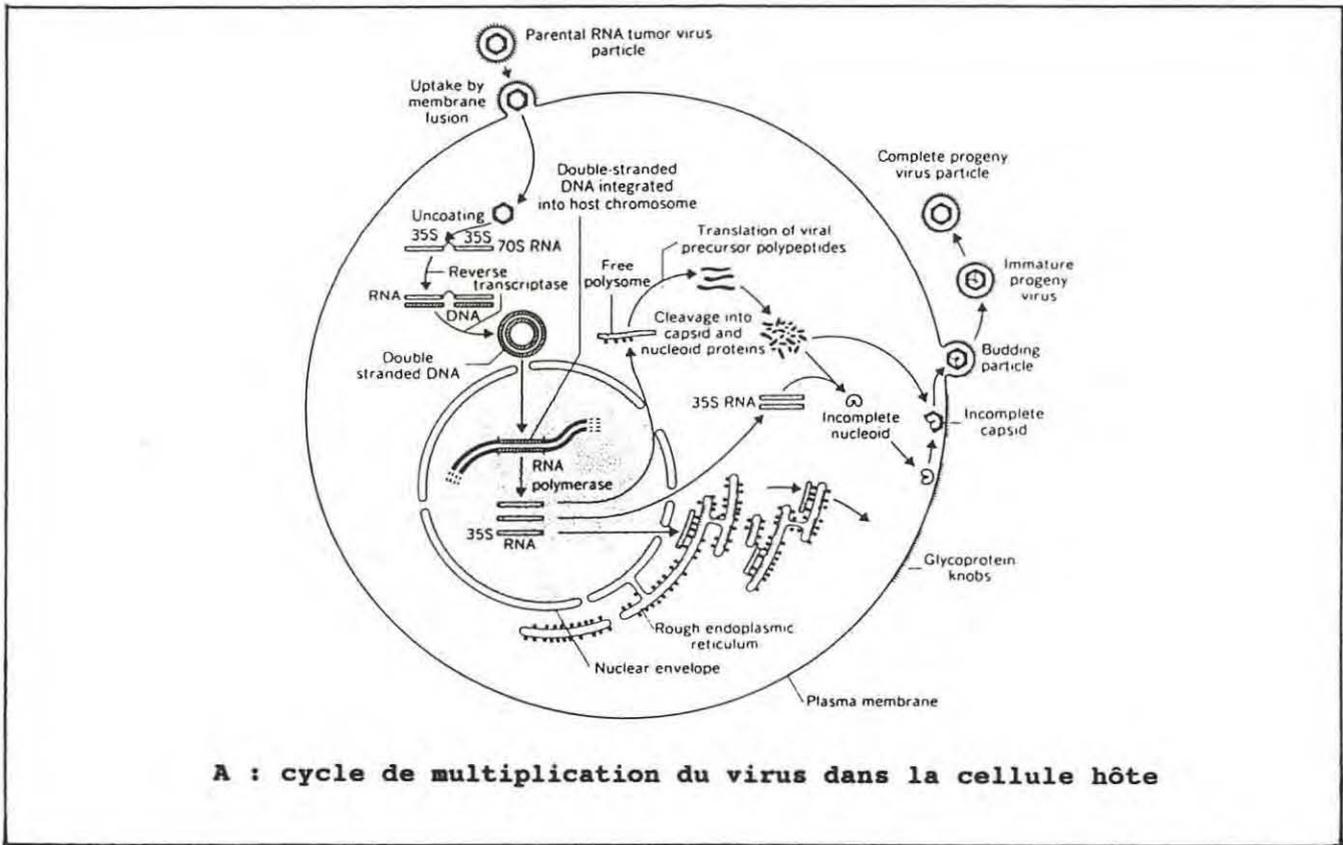
ANNEXE 1.3

Principales caractéristiques des familles de virus oncogènes à ADN
(d'après Fields, 1985 ; Vasseur, 1989)

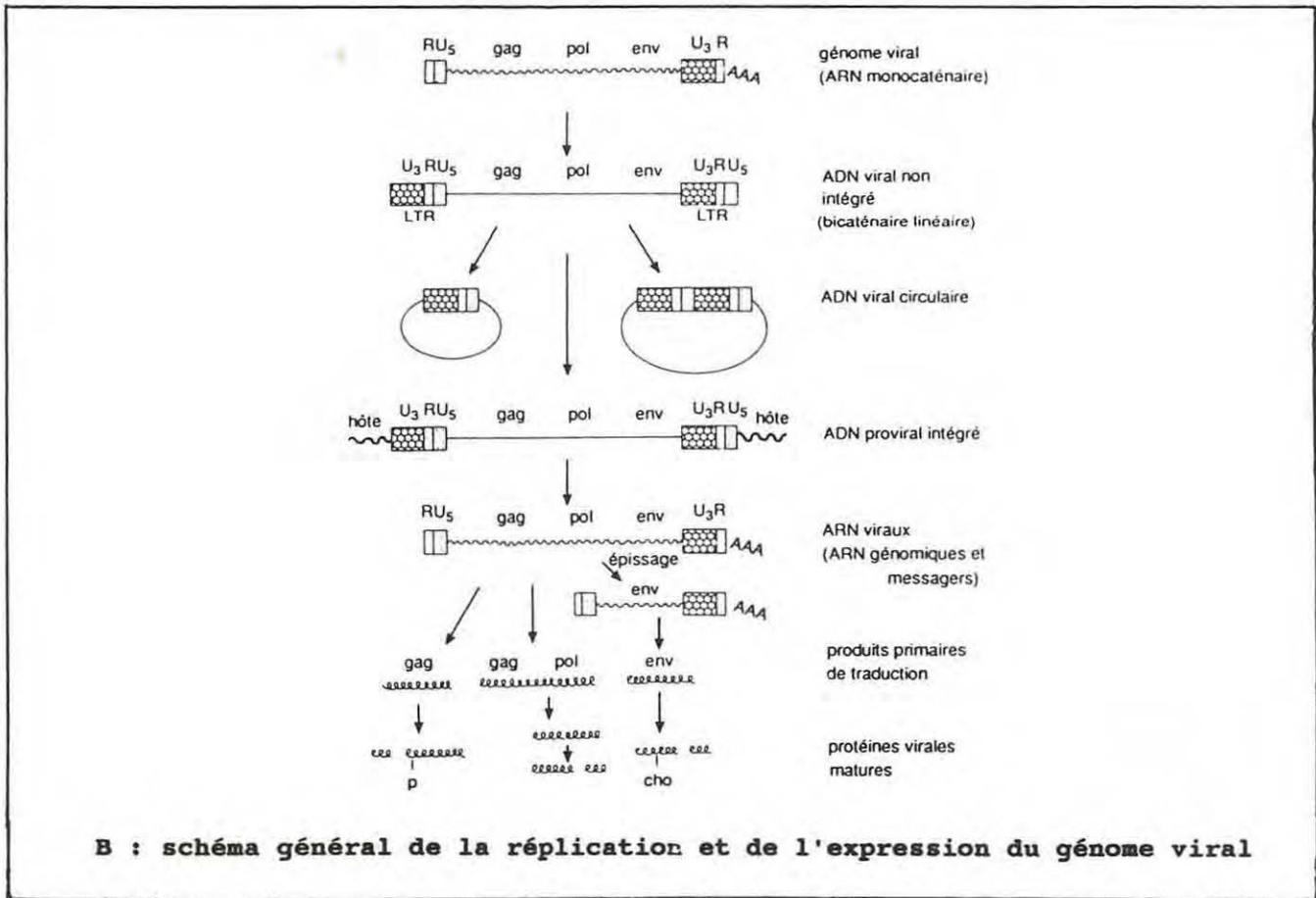
Genre	Principaux représentants	abréviations	espèce hôte	tumeur type	tumeur dans l'espèce	induction de tumeur expérimentale	transformation <i>in vitro</i>	infection
Polyomavirus	virus simien 40	SV 40	singe	large spectre : sarcome carcinome hépatome	non	oui	oui	productive/lytique ou transformation/intégration
	virus du polyome	Py	souris		non	oui	oui	
	virus BK et JC	BKV et JCV	homme		non	oui	oui	
Adénovirus	adénovirus humains	Ad (1 à 37)	homme		non	oui (certains groupes)	oui	productive/lytique ou transformation/intégration
			bovins canins singe murins ovins,...		non	oui	oui	
Papillomavirus	virus du papillome	HPV (1 à 16)	homme bovins canins cheval lapin,...	co-cancé- rigènes : papillome carcinome	oui	oui	non (sauf bovins)	productive/ non lytique ou transformation /épisode ou /intégration
Herpèsvirus	<i>sous-famille α</i> : virus Herpès Simplex virus varicelle/zona virus Herpès équin	HSV1 et HSV2 VZV EHV	homme homme cheval	co-cancé- rigènes : carcinome	non	non	oui	productive/ lytique ou transformation / ?
	<i>sous-famille β</i> : cytomegalovirus	HCMV	homme	sarcome	oui	non	oui	productive/ non lytique transformation/ intégra/épisode
	<i>sous-famille γ</i> : virus d'Epstein-Barr	EBV	homme	lymphome	oui	oui	oui	
virus de type Hépatite-B	virus hépatite-B	HBV WHV GSHV DHBV	homme marmotte écureuil canard	co-cancé- rigènes : hépatocarcinome	oui/longue latence	non	non	productive/ non lytique ou transformation /intégration

ANNEXE 1.4

Cycle de réplication des rétrovirus
(d'après Klein, 1982 ; Lowy, 1985)



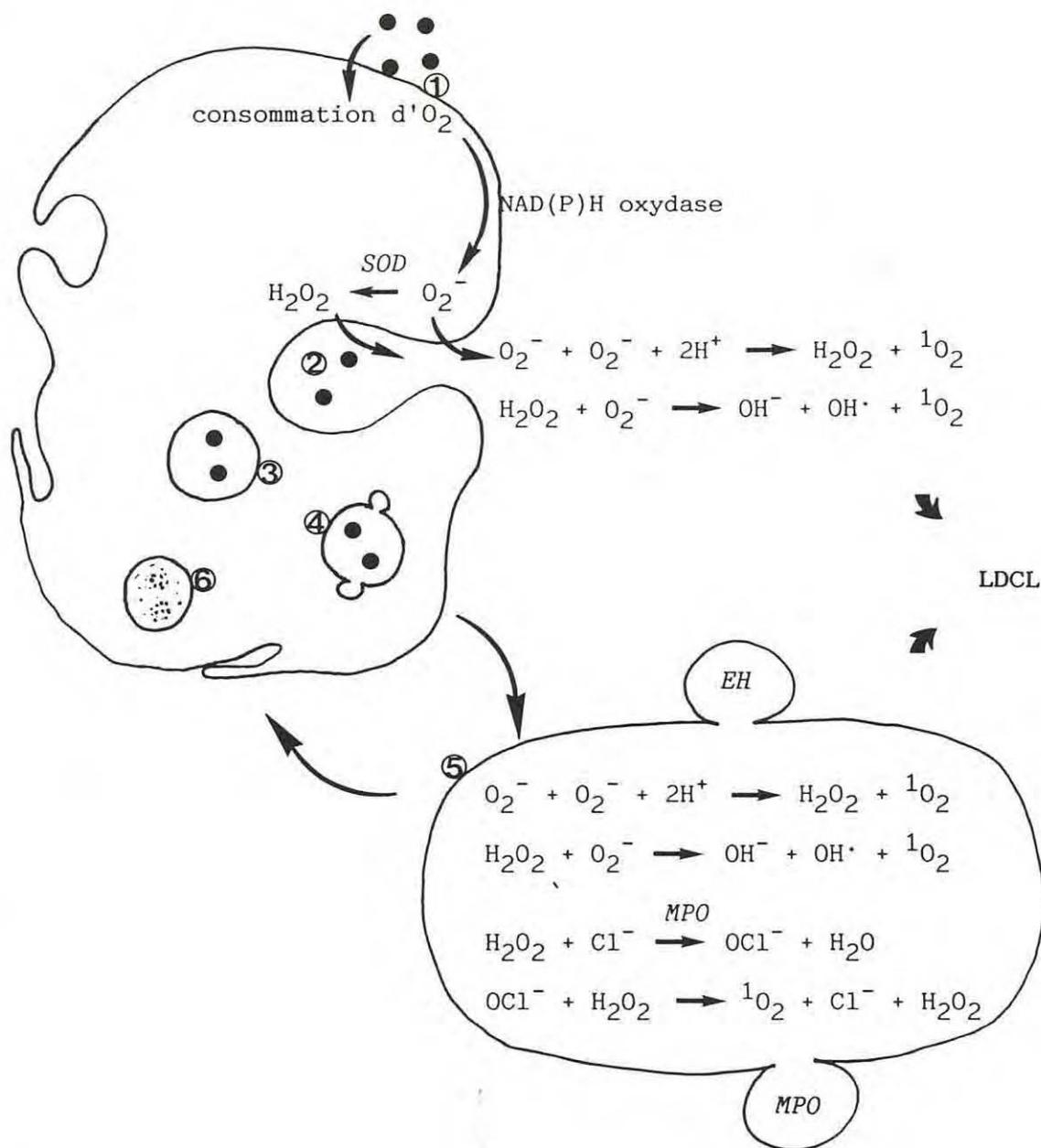
A : cycle de multiplication du virus dans la cellule hôte



B : schéma général de la réplication et de l'expression du génome viral

ANNEXE 1.5

Activité métabolique respiratoire des cellules phagocytaires



- particule opsonisée
- ① reconnaissance et fixation
- ② invagination membranaire et phagocytose
- ③ internalisation et formation du phagosome
- ④ dégranulation et formation du phagolysosome
- ⑤ évènements microbicides
- ⑥ digestion

SOD: superoxyde dismutase

MPO: myéloperoxydase

EH: enzymes hydrolytiques

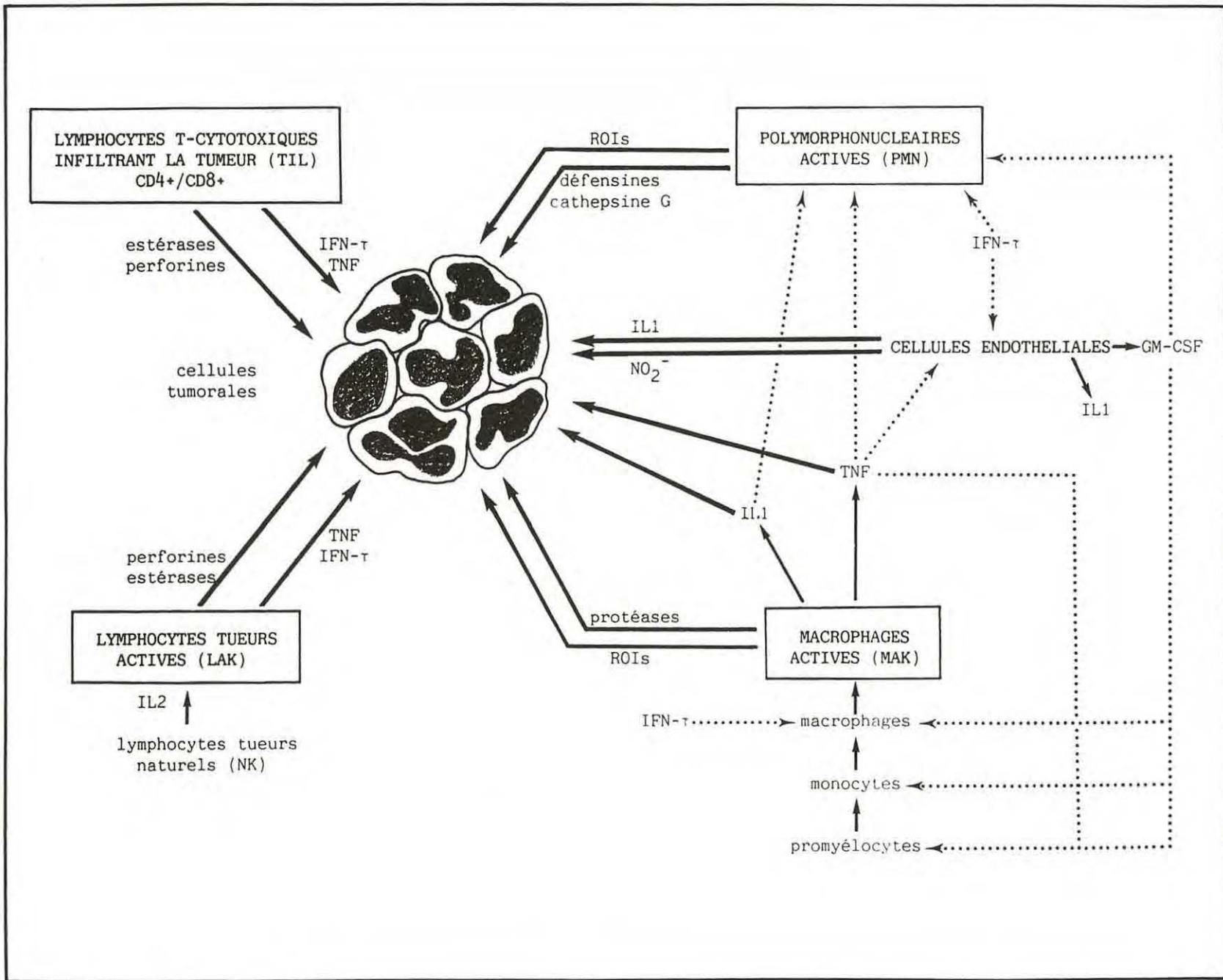


Schéma simplifié des mécanismes de défense anti-tumorale chez les Vertébrés

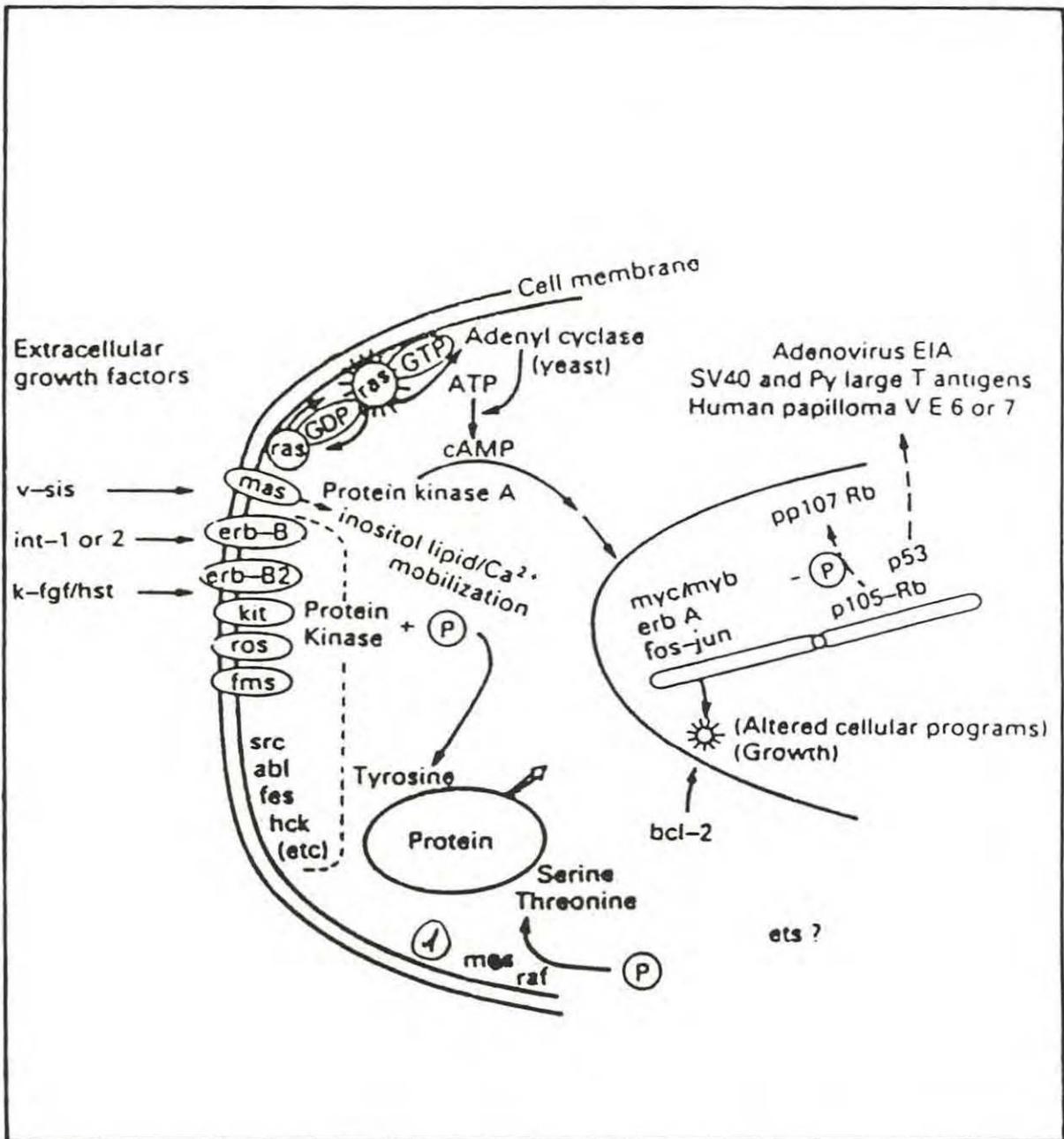
ANNEXE 1.7

Caractéristiques de quelques oncogènes viraux
 et de leurs homologues cellulaires (R : récepteur ; tyr : tyrosine ;
 p : protéine ; pp : phosphoprotéine ; gp : glycoprotéine ;
 PDGF : "platelet-derived growth factor" ;
 FGF : "fibroblast growth factor" ; M-CSF : "macrophage-colony
 stimulating factor" ; EGF : "epidermal growth factor")
 (d'après Garrett, 1986 ; Guillermo-Suarez, 1989)

oncogène	produit du gène		activité	localisation
	viral	cellulaire		
<i>Facteurs de croissance</i>				
<i>sis</i> <i>int-1</i> <i>int-2</i> <i>hst/k-fgf</i>	p28	p14	PDGF chaîne B "wingless" de <i>Drosophila</i> ligand de la famille FGF FGF	excrété excrété excrété excrété
<i>Récepteurs de facteurs de croissance transmembranaires</i>				
<i>erb-B</i> <i>fms</i> <i>neu(erb-B2)</i>	gp65 gp140	gp170 gp170 p185	R de l'EGF (tyr kinase) R du M-CSF (tyr kinase) famille du R à l'EGF (tyrosine kinase)	membrane membrane membrane
<i>ros</i> <i>met</i>	p68	p140	famille du R insuline (tyrosine kinase) tyrosine kinase	cytoplasme membrane membrane
<i>Récepteurs hormonaux</i>				
<i>erb-A</i>	pp75		R à hormone thyroïdienne	noyau
<i>Protéines G</i>				
<i>K,N,H-ras</i>	p21	p21	GTPase, lie le GTP	membrane
<i>Protéines kinases</i>				
<i>abl</i> <i>fps</i>	p120 p140	p150 p98	tyrosine kinase tyrosine kinase	membrane cytoplasme membrane
<i>fes</i> <i>fgr</i> <i>src</i> <i>yes</i> <i>met</i> <i>trk</i>	p85 p70 pp60 p90	p92 pp60 p140 p70	tyrosine kinase tyrosine kinase tyrosine kinase tyrosine kinase tyrosine kinase	cytoplasme cytoplasme membrane membrane
<i>mos</i> <i>raf/mil</i>	p37		sérine/thréonine kinase sérine/thréonine kinase	cytoplasme cytoplasme
<i>Facteurs nucléaires</i>				
<i>myc</i> <i>myb</i> <i>fos</i> <i>jun</i> <i>etr</i> <i>ski</i> <i>rel</i>	p110 p48 pp55 p110/p125	p58 p75/p110 p55/p60	lie l'ADN (gène précoce) prolifération lie l'ADN (gène tardif) lie l'ADN (gène précoce) différentiation facteur transcription AP1 lie l'ADN	noyau noyau noyau noyau noyau noyau noyau

ANNEXE 1.8

Schéma simplifié des voies de transduction du signal de prolifération cellulaire, faisant appel aux produits de proto-oncogènes (d'après Studzinski, 1989)



Annexe 1.9

Quelques exemples de techniques et d'oncogènes utilisés
pour immortaliser des cellules
(Py : Polyome ; gd : grand)

cellules	espèce	technique	promoteur	oncogène	référence
chondrocytes	rat	précipitation au CaPO ₄		p53	Jenkins et al., 1984
cellules de foie	rat	précipitation au CaPO ₄	LTR	c-myc	Kelekar and Cole, 1987
fibroblastes embryonnaires	rat	précipitation au CaPO ₄		p53	Rovinski and Benchimol, 1988
épithélium intestinal embryonnaire	rat	électro perméabi- lisation		E1A ou T de SV40 gd T de Py	Emami et al., 1989
macrophages spéniques	souris	rétrovirus	LTR	v-raf/mil et v-myc	Roberson and Walker, 1988
cellules dendritiques de rate	souris	rétrovirus	LTR	c-Ha-ras ou v-src	Komatsubara et al., 1988
cellules pancréatiques		oncogénèse ciblée	insuline glucagon	T de SV40 T de SV40	Kahn and Briand, 1991
hépatocytes		oncogénèse ciblée	pyruvate kinase L	T de SV40 c-myc	
cellules rénales		oncogénèse ciblée	promoteur enhancer de SV40	T de SV40	
cellules musculaires		oncogénèse ciblée	protamine 1	T de SV40	
cellules thymiques		oncogénèse ciblée	Thy-1	c-myc	
neurones, cellules gliales		oncogénèse ciblée	promoteur enhancer de SV40	grand T de Py	

ANNEXES II
MATERIELS ET METHODES

ANNEXE 2.1

Solutions utilisées pour l'électrophorèse des protéines et leur immunodétection

. Tampon de lyse

Tris, HCl 50 mM, pH 8
NaCl 150 mM
NaN₃ 0,02 %
PMSF 100 µg/ml
aprotinine 1 µg/ml
Triton X-100 1 %

. Tampon de dépôt (2X)

Tris, HCl 100 mM, pH 6,8
SDS 4 %
bleu de bromophénol 0,2 %
glycérol 20 %
dithiothréitol 200 mM (à ajouter extemporanément)

. Solution A

CuSO ₄ 1 %	200 µl
tartrate de sodium et de potassium 2 %	200 µl
Na ₂ CO ₃ 2 %	19,6 ml
Na ₂ CO ₃	2 g
NaOH	0,4 g
H ₂ O	100 ml

. Solution B

réactif de Folin-Ciocalteu	1 ml
H ₂ O	1 ml

. Gel de migration à 7,5 % d'acrylamide

(97 % acrylamide/3 % bis-acrylamide) à 30 %	11,25 ml
tampon de migration	12 ml
eau distillée	21,75 ml
persulfate d'ammonium à 10 %	72 µl
temed (extemporanément)	24 µl
volume total (2 gels)	45 ml

. Gel de migration à 20 % d'acrylamide	
(97 % acrylamide/3 % bis-acrylamide) à 40 %	8 ml
tampon de migration	4 ml
glycérol	4 ml
persulfate d'ammonium à 10 %	24 µl
temed (extemporanément)	8 µl
volume total (2 gels: 15 ml final)	16 ml

. Tampon de migration (gels)	
Tris 1,5 M	90,82 g
SDS 0,4 %	2 g
eau distillée	500 ml
ajuster le pH à 8 avec de l'HCl	

. Tampon de migration (électrophorèse)	
Tris 0,05 M	30 g
glycine	144 g
SDS 0,1 %	5 g
eau distillée	q.s.p. 5000 ml
pH à 8,3, sans ajustement	

. Gel de tassement à 3 %	
acrylamide 30 %	1 ml
bis-acrylamide 1 %	1,3 ml
tampon de tassement	2,5 ml
eau distillée	5,2 ml
persulfate d'ammonium à 10 %	40 µl
temed (extemporanément)	20 µl

. Tampon de tassement	
Tris 1 M	12,11 g
SDS 0,4 %	0,4 g
eau distillée	100 ml
ajuster le pH à 6,8 avec de l'HCl	

. Solution fixante

thiosulfate de sodium 0,1 %	0,2 g
acétate de sodium 0,3 %	0,6 g
éthanol 100	60 ml
glutaraldéhyde 25 %	4 ml
eau distillée	136 ml

. Solution de révélation

formaldéhyde 38 %	160 μ l
sodium carbonate 2,5 %	10 g
eau distillée	400 ml

. Solution BR

thiosulfate de sodium	10 g
Trizma hydrochloride	14,8 g
eau distillée	400 ml

. Tampon de transfert

glycine 39 mM	2,93 g
Tris 48 mM	5,81 g
SDS 0,0375 %	0,375 g
méthanol	200 ml
eau distillée	q.s.p. 1000 ml

. PBSm

NaCl	9 g
Na ₂ HPO ₄	1,48 g
KH ₂ PO ₄	0,43 g
eau distillée	1000 ml
ajuster le pH à 7,2	

. PFB

Tris-HCl 50 mM, pH 7,5	5 ml (stock 1 M)
NaCl 150 mM	30 ml (stock 0,5 M)
eau distillée	65 ml

. Tampon de la phosphatase alcaline

NaCl 100 mM	1 ml (stock 0,5 M)
MgCl ₂ 5 mM	0,5 ml (stock 0,5 M)
Tris-HCl 100mM, pH 9,5	5 ml (stock 1 M)
eau distillée	34,5 ml

. Solution de NBT

NBT (nitro blue tetrazolium)	0,5 g
diméthylformamide 70 %	10 ml

. Solution de BCIP

BCIP (bromo chloro indolyl phosphate)	0,5 g
diméthylformamide 100 %	10 ml

. Tampon TEN

Tris-HCl 50 mM, pH 7,5	5 ml (stock 1 M)
NaCl 150 mM	15 ml (stock 1 M)
EDTA 5 mM	1 ml (stock 1 M)
Triton 0,1 %	0,1 ml
eau distillée	79 ml

ANNEXE 2.2

Solutions utilisées pour l'immunodosage enzymatique

. Tampon PBS

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	2,9 g
KCl	0,2 g
NaN ₃	0,2 g
H ₂ O	1000 ml

. Solution de saturation

Plasmion	20 ml
tampon PBS	80 ml

. Tampon de lavage

NaCl 0,3 M	17,53 g
Tween 20 0,5%	5 ml
H ₂ O	1000 ml

. Solution de substrat

diéthanolamine	1,5 ml
H ₂ O	30 ml

Le pH est ajusté à 9,8 avant d'ajouter extemporanément le substrat
NPP (nitrophényl phosphate)

NPP	30 mg
-----	-------

ANNEXE 2.3

Réactifs utilisés en biologie moléculaire

. Tampon TE

Tris-HCl, pH 8	10 mM
E.D.T.A., pH 8	1 mM

. Tampon d'extraction I

isothiocyanate de guanidine 5 M	10 ml
acétate d'ammonium 5 M	2 ml
Sarkosyl 10 %	4 ml
protéinase K à 10 mg/ml	50 µl

. Tampon d'extraction II

Tris-HCl, pH 8	10 mM
E.D.T.A, pH 8.	100 mM
S.D.S.	0,5 %
A.R.Nase pancréatique à 10 mg/ml	20 µg/ml

. Tampon de réaction 10X (P.C.R.)

Tris-HCl, pH 8,3	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	100 mM
gélatine	0,01 %

. Solution RF1

RbCl	100 mM
MnCl ₂ , 4H ₂ O	50 mM
acétate de potassium	30 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10 mM
glycérol	15 %

Le pH est ajusté à 5,8 avec une solution de CH₃COOH 0,2 M et la solution est stérilisée par filtration (0,22 µm).

. Solution RF2

M.O.P.S.	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	75 mM
glycérol	15 %

Le pH est ajusté à 6,8 avec du NaOH et la solution est stérilisée par filtration (0,22 µm).

. Milieu STET

Tris-HCl, pH 8	10 mM
E.D.T.A., pH 8	1 mM
NaCl	100 mM
Triton X-100	5 %

. Solution de lyse I

Tris-HCl, pH 8	50 mM
E.D.T.A., pH 8	5 mM
saccharose	25 %

. Solution de lyse II

Tris-HCl, pH 8	50 mM
E.D.T.A., pH 8	5 mM
Triton-X100	5 %

. Tampon SSC 20X

Na ₃ citrate 0,3 M	88,2 g
NaCl 3 M	175,3 g
eau distillée	1000 ml

Ajuster le pH à 7,00

ANNEXE 2.4

Milieux de culture

. Milieu SOB liquide

bactotryptone	2 %
extrait de levure	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	0,5 mM

Le milieu (pH 7) est autoclavé à 120°C, 20 min.

. Milieu SOB gélosé

milieu SOB liquide	1000 ml
agar	12 g

. Milieu SOB pour transformation

milieu SOB liquide	1000 ml
ampicilline	100 mg/1 ml H ₂ O
I.P.T.G. 0,2 mM	47,6 mg/1 ml H ₂ O
X-Gal	80 mg/1 ml DMF

Ces solutions (sauf le X-Gal) sont stérilisées par filtration (0,22 µm) avant d'être ajoutées au milieu SOB stérile.

. Milieu SOC

milieu SOB stérile	
glucose	20 mM

La solution de glucose est stérilisée par filtration (0,22 µm) avant d'être additionnée au milieu SOB

. Milieu LB

bactotryptone	1 %
extrait de levure	0,5 %
NaCl	100 mM

ANNEXES III - RESULTATS

ANNEXE 3.1

Homologies de séquences du gène *abl* chez différentes espèces
Alignement multiple de séquences
(système d'exploitation BISANCE : CLUSTAL)

		<i>Ile</i>	<i>Ala</i>	<i>Ser</i>	<i>Gly</i>	<i>Met</i>	<i>Ser</i>	<i>Tyr</i>	<i>Leu</i>	<i>Glu</i>	<i>Ala</i>	<i>Arg</i>	<i>His</i>	<i>Phe</i>	<i>Ile</i>	<i>His</i>
Cae-abl	1534	ATT	GCG	TCC	GGC	ATG	TCG	TAC	CTG	GAA	GCC	AGA	CAC	TTC	ATT	CAT
D-abl		ATA	GCG	TCG	GGA	ATG	ACG	TAC	CTG	GAG	TCG	CGC	AAC	ACA	ATT	CAT
Cal-abl		ATA	GCG	TCG	GGC	ATC	AGT	TAT	TTG	GAA	GCT	CGT	AAT	TAC	ATA	CAT
H-abl																
v-abl		ATC	TCA	TCA	GCC	ATG	GAG	TAC	TTG	GAG	AAG	AAG	AAC	TTC	ATC	CAC
		**	*	**	*	***		**	**	**			*		**	**


 amorce 5' (27)

		<i>Arg</i>	<i>Asp</i>	<i>Leu</i>	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	<i>Arg</i>	<i>Asn</i>	<i>Cys</i>	<i>Leu</i>	<i>Val</i>	<i>Ser</i>	<i>Glu</i>	<i>His</i>	<i>Asn</i>	<i>Ile</i>
Cae-abl		AGG	GAT	TTG	GCC	GCA	AGG	AAT	TGC	TTA	GTA	TCC	GAG	CAT	AAT	ATT
D-abl		CGC	GAT	CTC	GCT	GCC	CGC	AAT	TGC	CTG	CTG	GGT	GAT	AAC	AAG	CTG
Cal-abl		CGT	GAC	TTG	GCT	GCC	CGT	AAC	TGT	TTG	GTG	GGC	GAT	AAT	AAA	TTG
H-abl					GCT	GCC	CGA	AAC	TGC	CTG	GTA	GGG	GAG	AAC	CAC	TTG
v-abl		AGA	GAC	CTT	GCT	GCC	CGG	AAC	TGC	CTG	GTA	GGG	GAA	AAC	CAC	TTG
		*	**	*	**	**	*	**	**	*	*		**	*	*	*

		<i>Val</i>	<i>Lys</i>	<i>Ile</i>	<i>Ala</i>	<i>Asp</i>	<i>Phe</i>	<i>Gly</i>	<i>Leu</i>	<i>Ala</i>	<i>Arg</i>	<i>Phe</i>	<i>Met</i>	<i>Lys</i>	<i>Glu</i>	<i>Asp</i>
Cae-abl		GTA	AAA	ATT	GCC	GAC	TTT	GGG	TTG	GCA	AGA	TTC	ATG	AAG	GAA	GAC
D-abl		GTC	AAG	GTG	GCG	GAT	TTT	GGC	CTG	GCA	CGT	TTG	ATG	CGG	GAC	GAC
Cal-abl		GTT	AAA	TGT	GCC	GAT	TTT	GGT	TTG	GCT	CGT	CTG	ATG	CGT	GAT	GAC
H-abl		GTG	AAG	GTA	GCT	GAT	TTT	GGC	CTG	AGC	AGG	TTG	ATG	ACA	GGG	GAC
v-abl		GTG	AAG	GTG	GCG	GAT	TTT	GGC	CTG	AGC	AGG	TTG	ATG	ACA	GGG	GAC
		**	**		**	**	**	**	**		*	*	**		*	***

←

		<i>Thr</i>	<i>Tyr</i>	<i>Thr</i>	<i>Ala</i>	<i>His</i>	<i>Ala</i>	<i>Gly</i>	<i>Ala</i>	<i>Lys</i>	<i>Phe</i>	<i>Pro</i>	<i>Ile</i>	<i>Lys</i>	<i>Trp</i>	<i>Thr</i>
Cae-abl		ACC	TAT	ACA	GCA	CAT	GCT	GGA	GCC	AAG	TTT	CCT	ATC	AAA	TGG	ACT
D-abl		ACG	TAT	ACG	GCA	CAT	GCC	GGA	GCC	AAG	TTC	CCG	ATC	AAA	TGG	ACC
Cal-abl		ACC	TAT	ACG	GCA	CAT	GCG	GGC	GCC	AAG	TTT	CCC	ATC	AAA	TGG	AC
H-abl		ACC	TAC	ACA	GCC	CAT	GCT	GGA	GCC	AAG	TTC	CCC	ATC	AAA	TGG	AC
v-abl		ACC	TAC	ACG	GCC	CAT	GCT	GGA	GCC	AAA	TTC	CCC	ATC	AAA	TGG	ACC
		**	**	**	**	***	**	**	***	**	**	**	**	***	***	**

amorce 3' (28)

amorce 3' (29)

Ala Pro Glu Gly Leu Ala

Cae-abl	GCC CCA GAG GGG CTT GCA 1731
D-abl	GCA CCG GAG GGT CTG GCC
Cal-abl	
H-abl	
v-abl	GCA CCT GAG AGC CTG GCC
	** ** *** * ** **

Cae-abl: oncogène *abl* chez *Caenorhabditis elegans*
D-abl: proto-oncogène *abl* chez *Drosophila melanogaster*
Cal-abl: proto-oncogène *abl* chez *Calliphora erythrocephala*
H-abl: oncogène *abl* chez l'homme
v-abl: oncogène *abl* du virus de la leucémie murine d'Abelson

Les nucléotides indiqués par * sont conservés dans toutes les séquences alignées. Les zones correspondant à plusieurs nucléotides successifs conservés ont été utilisées en tant qu'amorces oligonucléotidiques dans des expériences d'amplification par P.C.R. (Polymerase Chain Reaction).

ANNEXE 3.2

Homologies de séquences du gène *rho* chez différentes espèces
Alignement multiple de séquences
(système d'exploitation BISANCE : CLUSTAL)

		<i>Pre</i>	<i>Pro</i>	<i>Glu</i>	<i>Val</i>	<i>Tyr</i>	<i>Val</i>	<i>Pro</i>	<i>Thr</i>	<i>Val</i>	<i>Phe</i>	<i>Glu</i>	<i>Asn</i>	<i>Tyr</i>	<i>Val</i>	<i>Ala</i>
A-rho	101	TTC	CCT	GAA	GTT	TAC	GTG	CCA	ACA	GTT	TTT	GAA	AAT	TAT	GTA	GCA
H-rho1		TTC	CCC	GAG	GTG	TAC	GTG	CCC	ACC	GTC	TTC	GAG	AAC	TAT	GTG	GCC
H-rho2		TTC	CCA	GAG	GTG	TAT	GTG	CCC	ACA	GTG	TTT	GAG	AAC	TAT	GTG	GCA
H-rhoC		TTT	CCG	GAG	GTC	TAC	GTC	CCT	ACT	GTC	TTT	GAG	AAC	TAT	ATT	GCG
H-rhoB		TTC	CCC	GAG	GTG	TAC	GTG	CCC	ACC	GTC	TTC	GAG	AAC	TAT	GTG	GCC
C-rho		TTC	CCA	GAG	GTG	TAT	GTA	CCC	ACA	GTG	TTT	GAG	AAC	TAT	GTG	GCA
B-rho		TTC	CCA	GAG	GTG	TAT	GTC	CCT	ACG	GTG	TTT	GAG	AAC	TAT	GTG	GCA
Y-rho		TTT	CCA	GAA	GTC	TAC	GTA	CCA	ACT	GTC	TTT	GAA	AAC	TAT	GTA	GCA
R-rho		TTC	CCC	GAA	GTG	TAC	GTG	CCC	ACC	GTG	TTC	GAG	AAC	TAT	GTG	GCG
		**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	***	*	**


 amorce 5' (30)

		<i>Asp</i>	<i>Ile</i>	<i>Glu</i>	<i>Val</i>	<i>Asp</i>	<i>Gly</i>	<i>Lys</i>	<i>Gln</i>	<i>Val</i>	<i>Glu</i>	<i>Leu</i>	<i>Ala</i>	<i>Leu</i>	<i>Trp</i>	<i>Asp</i>
A-rho	146	GAC	ATT	GAA	GTT	GAT	GGC	AAA	CAG	GTT	GAG	CTA	GCT	CTG	TGG	GAC
H-rho1		GAC	ATT	GAG	GTG	GAC	GGC	AAG	CAG	GTG	GAG	CTG	GCG	CTG	TGG	GAC
H-rho2		GAT	ATC	GAG	GTG	GAT	GGA	AAG	CAG	GTA	GAG	TTG	GCT	TTG	TGG	GAC
H-rhoC		GAC	ATT	GAG	GTG	GAC	GGC	AAG	CAG	GTG	GAG	CTG	GCT	CTG	TGG	GAC
H-rhoB		GAC	ATT	GAG	GTG	GAC	GGC	AAG	CAG	GTG	GAG	CTG	GCG	CTG	TGG	GAC
C-rho		GAT	ATT	GAA	GTT	GAT	GGA	AAG	CAG	GTA	GAG	TTG	GCT	TTG	TGG	GAT
B-rho		GAT	ATT	GAA	GTG	GAT	GGA	AAG	CAG	GTA	GAG	TTG	GCT	TTA	TGG	GAC
Y-rho		GAT	GTT	GAA	GTT	GAT	GGG	CGT	CGT	GTA	GAG	CTA	GCG	CTA	TGG	GAT
R-rho		GAC	ATC	GAG	GTG	GAC	GGC	AAG	CAG	GTG	GAG	CTG	GCG	CTG	TGG	GAC
		**	*	**	**	**	**		*	**	**	*	**	*	***	**

		<i>Thr</i>	<i>Ala</i>	<i>Gly</i>	<i>Gln</i>	<i>Glu</i>	<i>Asp</i>	<i>Tyr</i>	<i>Asp</i>	<i>Arg</i>	<i>Leu</i>		<i>Glu</i>	<i>Lys</i>
A-rho	191	ACA	GCG	GGA	CAA	GAG	GAC	TAT	GAC	AGA	CTG.....	302	GAG	AAG
H-rho1		ACG	GCG	GGC	CAG	GAG	GAC	TAC	GAC	CGC	CTG.....		GAG	AAG
H-rho2		ACA	GCT	GGG	CAG	GAA	GAT	TAT	GAT	CGC	CTG.....		GAA	AAG
H-rhoC		ACA	GCA	GGG	CAG	GAA	GAC	TAT	GAT	CGA	CTG.....		GAG	AAG
H-rhoB		ACG	GCG	GGC	CAG	GAG	GAC	TAC	GAC	CGC	CTG.....		GAG	AAG
C-rho		ACA	GCT	GGG	CAG	GAA	GAT	TAT	GAT	CGC	TTG.....		GAA	AAA
B-rho		ACA	GCT	GGG	CAG	GAA	GAT	TAT	GAT	CGC	TTG.....		GAA	AAA
Y-rho		ACC	GCT	GGT	CAA	GAA	GAT	TAT	GAT	AGA	CTA.....		GAA	AAA
R-rho		ACG	GCG	GGC	CAG	GAG	GAC	TAC	GAT	CGT	TTA.....		GAG	AAG
		**	**	**	**	**	**	**	**	*	*		**	**


 amorce 5' (31)

Trp Thr Pro Glu Val Arg His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile Ile

A-rho	308	TGG	ACG	CCT	GAG	GTT	CGT	CAC	TTT	TGT	CCA	AAT	GTT	CCT	ATA	ATA
H-rho1		TGG	GTC	CCC	GAG	GTG	AAG	CAC	TTC	TGT	CCC	AAT	GTG	CCC	ATC	ATC
H-rho2		TGG	ACC	CCA	GAA	GTC	AAG	CAT	TTC	TGT	CCC	AAC	GTG	CCC	ATC	ATC
H-rhoC		TGG	ACC	CCA	GAG	GTG	AAG	CAC	TTC	TGC	CCC	AAC	GTG	CCC	ATC	ATC
H-rhoB		TGG	GTC	CCC	GAG	GTG	AAG	CAC	TTC	TGT	CCC	AAT	GTG	CCC	ATC	ATC
C-rho		TGG	ACC	CCA	GAA	GTC	AAG	CAC	TTC	TGT	CCC	AAC	GTG	CCC	ATC	ATC
B-rho		TGG	ACT	CCG	GAA	GTC	AAG	CAT	TTC	TGT	CCC	AAC	GTG	CCC	ATC	ATC
Y-rho		TGG	ATT	GCC	GAA	GTA	TTA	CAT	TTC	TGT	CAA	GGT	GTG	CCA	ATT	ATT
R-rho		TGG	GTG	CCC	GAG	GTA	AAG	CAC	TTC	TGC	CCC	AAT	GTG	CCC	ATC	ATC
		***		**	**	**		**	**	**	*		**	**	**	**

← amorce 3' (33) ←

Leu Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Asn Asp Glu

A-rho	353	CTT	GTG	GGT	AAC	AAA	AAG	GAT	CTT	CGC	AAC	GAT	GAA	388
H-rho1		CTG	GTG	GCC	AAC	AAA	AAA	GAC	CTG	CGC	AGC	GAC	GAG	
H-rho2		CTG	GTT	GGG	AAT	AAG	AAG	GAT	CTT	CGG	AAT	GAT	GAG	
H-rhoC		CTG	GTG	GGG	AAT	AAG	AAG	GAC	CTG	AGG	CAA	GAC	GAG	
H-rhoB		CTG	GTG	GCC	AAC	AAA	AAA	GAC	CTG	CGC	AGC	GAC	GAG	
C-rho		CTG	GTT	GGG	AAC	AAG	AAG	GAT	CTT	CGG	AAT	GAT	GAG	
B-rho		CTG	GTT	GGG	AAC	AAG	AAG	GAT	CTT	CGA	AAC	GAC	GAG	
Y-rho		CTT	GTT	GGT	TGT	AAA	GTG	GAT	TTG	AGA	AAC	GA		
R-rho		TTG	GTG	GCC	AAC	AAA	AAA	GAC	CTG	CGC	AGC	GAT	GAG	
		*	**	*		**		**	*	*		**		

← amorce 3' (32) ←

A-rho: proto-oncogène *rho* chez *Aplysia californica*
H-rho1: ARNm du proto-oncogène *rho* humain (clone 6)
H-rho2: ARNm du proto-oncogène *rho* humain (clone 12)
H-rhoC: ARNm du proto-oncogène *rhoC* humain (clone 9)
H-rhoB: ARNm du proto-oncogène *rhoB* humain (clone 6)
C-rho: ARNm du proto-oncogène *rho1* canin
B-rho: ARNm du proto-oncogène *rho* chez *B. taurus*
Y-rho: gène *rho1* chez *S. cerevisiae*
R-rho: ARNm du gène *rhoB* chez le rat

Les nucléotides indiqués par * sont conservés dans toutes les séquences alignées. Les zones correspondant à plusieurs nucléotides successifs conservés ont été utilisées en tant qu'amorces oligonucléotidiques dans des expériences d'amplification par P.C.R. (Polymerase Chain Reaction).

ANNEXE 3.3

Alignement de la séquence peptidique déduite du clone 10-rho3 (SHRRHO)
de *M. edulis* avec la banque de données protéiques NBRF
(Système d'exploitation BISANCE : FASTA)

[IPREMER.BATCH]RHOAAC01.TXT

SHRRHOAA .dat, 34 aa vs DB:[bisance.gcg.gcgpir]protein.seq library
Using protein matrix
NBRF release number 32

```

initn  init1
< 2 1059 1059:-----
 4 0 0:-----
 6 113 113:-----
 8 755 755:-----
10 1198 1198:-----
12 8677 8677:-----
14 1232 1232:-----
16 4022 4022:-----
18 4306 4306:-----
20 4348 4348:-----
22 8813 8813:-----
24 2248 2248:-----
26 1544 1544:-----
28 716 717:-----
30 463 473:-----
32 331 338:-----
34 181 189:-----
36 100 95:-----
38 79 72:-----
40 45 35:-----
42 15 12:-----
44 22 21:-----
46 7 7:-----
48 2 2:-----
50 1 1:-----
52 0 0:-----
54 0 0:-----
56 0 0:-----
58 2 2:-----
60 0 0:-----
62 0 0:-----
64 0 0:-----
66 0 0:-----
68 0 0:-----
70 0 0:-----
72 0 0:-----
74 0 0:-----
76 0 0:-----
78 0 0:-----
80 0 0:-----
> 80 19 19:-----

```

11831134 residues in 40298 sequences
mean initn score: 17.5 (6.13)
mean init1 score: 17.5 (6.12)
1558 scores better than 27 saved, ktup: 2, fact: 8 scan time: 0:01:40
The best scores are:

	initn	init1	opt
;H36364 *GTP-binding protein Rho1 - Dog	182	182	182
;TVHURC Transforming protein (rhoC) - Human	182	182	182
;TVHU12 Transforming protein (rhoA) - Human	182	182	182
;G38625 *GTP-binding protein o-rho - Electric ray	182	182	182

```

;A33518 *Cb protein - Bovine 182 182 182
;TVGAAC Transforming protein (rho) - Sea hare (Aplysia 182 182 182
;TVHURH Transforming protein (rhoB) - Human 178 178 178
;A19727 *Immediate-early protein rhoB, ras-like - Rat 178 178 178
;TVBVH1 Transforming protein (rho-1) - Yeast (Saccharo 158 158 158
;A36382 *GTP-binding protein G25K - Human 146 146 146
;A39265 *GTP-binding protein G25K - Human 146 146 146
;A12119 Transforming protein homolog (rho) - Bovine (f 145 145 153
;A16030 *Cell division control protein 42 - Yeast (Sac 143 143 143
;G36364 *GTP-binding protein Rac2 - Dog 141 141 141
;A14386 *rac1 protein - Human 141 141 141
;TVHUC1 Transforming protein (ras, teratocarcinoma clo 141 141 141
;B14386 rac2 protein - Human 138 138 138
;TVBYH2 Transforming protein (rho-2) - Yeast (Saccharo 104 104 108
;TVHUC4 Transforming protein (ras, teratocarcinoma clo 92 92 133
;S13148 *elongation factor 1-beta - Brine shrimp 57 57 64

```

```

;H36364 *GTP-binding protein Rho1 - Dog 182 182 182
100.0% identity in 34 aa overlap

```

```

SHRRHO 10 20 30
DRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::
H36364 TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90

```

```

SHRRHO EKWT
::X
H36364 EKWTPEVKHFPCPNVPIILVGNKKDLRNDENTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGY
100 110 120 130 140 150

```

```

;TVHURC Transforming protein (rhoC) - Human 182 182 182
100.0% identity in 34 aa overlap

```

```

SHRRHO 10 20 30
DRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::
TVHURC TVFENYIADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90

```

```

SHRRHO EKWT
::X
TVHURC EKWTPEVKHFPCPNVPIILVGNKKDLRNDENTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGY
100 110 120 130 140 150

```

```

;TVHU12 Transforming protein (rhoA) - Human 182 182 182
100.0% identity in 34 aa overlap

```

```

SHRRHO 10 20 30
DRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::
TVHU12 TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90

```

```

SHRRHO EKWT
::X
TVHU12 EKWTPEVKHFPCPNVPIILVGNKKDLRNDENTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGY
100 110 120 130 140 150

```

```

;G38625 *GTP-binding protein o-rho - Electric ray 182 182 182
100.0% identity in 34 aa overlap

```

```

SHRRHO 10 20 30
DRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP

```

G38625 TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90
X::::::::::::::::::::::::::::::::

SHRRHO EKWT
::X
G38625 EKWTPEVKHFCPNVPIILVGNKKTAGDEHTRRELAKMKQEPVKPDDAKEMGSRKAFGYL
100 110 120 130 140 150

;A33518 *Gb protein - Bovine 182 182 182
100.0% identity in 34 aa overlap

SHRRHO EKWT
::X
A33518 TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90
DRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::::::

SHRRHO EKWT
::X
A33518 EKWTPEVKHFCPNVPIILVGNKDLRNDHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGY
100 110 120 130 140 150

;TVGAAC Transforming protein (rho) - Sea hare (Aplysia) 182 182 182
100.0% identity in 34 aa overlap

SHRRHO EKWT
::X
TVGAAC TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90
DRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::::::

SHRRHO EKWT
::X
TVGAAC EKWTPEVRNFCPNVPIILVGNKDLRNDHTRRELAKMKQEPVRPEDGRAMAEKINAYS
100 110 120 130 140 150

;TVHURH Transforming protein (rhoB) - Human 178 178 178
97.0% identity in 33 aa overlap

SHRRHO EKWT
::X
TVHURH TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90
DRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::::::

SHRRHO EKWT
::X
TVHURH EKWTPEVKHFCPNVPIILVANKKDLRSDHTRRELAKMKQEPVRTDGRAMAVRIQAYDY
100 110 120 130 140 150

;A39727 *Immediate-early protein rhoB, ras-like - Rat 178 178 178
97.0% identity in 33 aa overlap

SHRRHO EKWT
X ::
A39727 TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90
DRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::::::

SHRRHO EKWT
::X

A39727 EKWTPEVKHFCPNVPIILVANKKDLRSDHTRRELAKMKQEPVRTDGRAMAVRIQAYDY
100 110 120 130 140 150

;TVBYH1 Transforming protein (rho-1) - Yeast (Saccharo) 158 158 158
78.8% identity in 33 aa overlap

SHRRHO EKWT
::X
TVBYH1 TVFENYVADVEVDGRRVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
50 60 70 80 90 100
DRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::::::

SHRRHO EKWT
::X
TVBYH1 EKWTPEVKHFCPNVPIILVGNKDLRNDHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGY
110 120 130 140 150 160

;A36382 *GTP-binding protein G25K - Human 146 146 146
72.7% identity in 33 aa overlap

SHRRHO EKWT
::X
A36382 TVFDNYAVTVMIGGEPYTLGLFDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90
DRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::::::

SHRRHO EKWT
::X
A36382 EKWTPEITHHCPKPTPFLLVGTQIDLRDDPSTIEKLAKNKQKIPITPETAEKLARDLKAVKY
100 110 120 130 140 150

;A39265 *GTP-binding protein G25K - Human 146 146 146
72.7% identity in 33 aa overlap

SHRRHO EKWT
::X
A39265 TVFDNYAVTVMIGGEPYTLGLFDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90
DRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::::::

SHRRHO EKWT
::X
A39265 EKWTPEITHHCPKPTPFLLVGTQIDLRDDPSTIEKLAKNKQKIPITPETAEKLARDLKAVKY
100 110 120 130 140 150

;A32119 Transforming protein homolog (rho) - Bovine (f) 145 145 153
94.1% identity in 34 aa overlap

SHRRHO EKWT
X ::
A32119 XLLIVFYVADIEVDGQVELALDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
10 20 30 40 50 60
DRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::::::

SHRRHO EKWT
X ::
A32119 E-WTPEVKMKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMEKSAKEVFEMATR
70 80 90 100

;A36030 *Cell division control protein 42 - Yeast (Sac) 143 143 143
72.7% identity in 33 aa overlap

10 20 30

SHRRHO DRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 X:::::::::::::..:..:..: : : : : :
 A36030 TVFDNYAVTVMIGDEPYTLGLFDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 40 50 60 70 80 90

SHRRHO EKWT
 :X
 A36030 EKWFPEVHHHCPGVPCLVVGCTQIDLRDDKVIIEKLRQRLRPITSEQGSRLARELKAVKY
 100 110 120 130 140 150
 ;G36364 *GTP-binding protein Rac2 - Dog 141 141 141
 69.7% identity in 33 aa overlap

SHRRHO DRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 X:::::::::::::..:..:..: : : : : :
 G36364 TVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 40 50 60 70 80 90

SHRRHO EKWT
 :X
 G36364 AKWYPEVRHHCPNTPILVGTGLDRLDDKDTIEKLEKELTPITYPQGLAMAKEIGAVKY
 100 110 120 130 140 150
 ;A34386 *rac1 protein - Human 141 141 141
 69.7% identity in 33 aa overlap

SHRRHO DRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 X:::::::::::::..:..:~:~:~: : : : : :
 A34386 TVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 40 50 60 70 80 90

SHRRHO EKWT
 :X
 A34386 AKWYPEVRHHCPNTPILVGTGLDRLDDKDTIEKLEKELTPITYPQGLAMAKEIGAVKY
 100 110 120 130 140 150
 ;TVHUC1 Transforming protein (ras, teratocarcinoma clo 141 141 141
 69.7% identity in 33 aa overlap

SHRRHO DRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 X:::::::::::::..:~:~:~: : : : : :
 TVHUC1 TVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 40 50 60 70 80 90

SHRRHO EKWT
 :X
 TVHUC1 AKWYPEVRHHCPNTPILVGTGLDRLDDKDTIEKLEKELTPITYPQGLAMAKEIGAVKY
 100 110 120 130 140 150
 ;B34386 rac2 protein - Human 138 138 138
 69.7% identity in 33 aa overlap

SHRRHO DRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 X:::::::::::::..:~:~:~: : : : : :
 B34386 TVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 40 50 60 70 80 90

SHRRHO EKWT

..X
 B34386 AKWYPEVRHHCPNTPILVGTGLDRLDDKDTIEKLEKELTPITYPQGLAMAKEIGAVKY
 100 110 120 130 140 150
 ;TVBYH2 Transforming protein (rho-2) - Yeast (Saccharo 104 104
 47.1% identity in 34 aa overlap

SHRRHO DRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 X:::::::::::::..:~:~:~: : : : : :
 TVBYH2 TVFENYVTSRVDGIKVSLLWDTAGQEEYERLRPFYSKADIILIGFAVDFESLINA
 40 50 60 70 80 90

SHRRHO EKWT
 :X
 TVBYH2 TKWADEALRYCPDAPIVLVGLKDLRQEAHFKENATDEMVPIDAKQVARAIGAKKYM
 100 110 120 130 140 150
 ;TVHUC4 Transforming protein (ras, teratocarcinoma clo 92 92
 63.6% identity in 33 aa overlap

SHRRHO DRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 X:::::::::::::..:~:~:~: : : : : :
 TVHUC4 TVFDHYAVSVTVGGKQYLLGLYDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 50 60 70 80 90 100

SHRRHO EKWT
 :X
 TVHUC4 EEWVPELKEYAPNVPFLIGTQIDLRDDPKTLARLNDHKEKPICVQGGKLAKEIGACC
 110 120 130 140 150 160
 ;S13148 *elongation factor 1-beta - Brine shrimp 57 57
 32.3% identity in 31 aa overlap

SHRRHO DRLRPLSYPTDVIILMCFIDSPOLENIP
 X:::::::::::::..:~:~:~: : : : : :
 S13148 IKPWDETDMAEMEKLVRSVQMDGLVWGAAKLIPLAYGIKLSIMCVVEDDKVSI
 130 140 150 160 170 180

SHRRHO KWT
 X
 S13148 KISEFEDFVQSVQVDAAFNKV
 190 200

Le programme "Alignement d'une séquence avec une banque de données" a permis de rechercher dans la banque NBRF, les régions homologue.. à la séquence peptidique déduite du clone 10-rho3. Il a classé ensuite par ordre décroissant, les séquences peptidiques ayant obtenues les meilleurs pourcentages d'homologies avec la séquence peptidique 10-rho3 de *M. edulis*.

APLRHO ACAGATGTCATCCCTCATGCTTTCTCTATAGACAGTCCAGACAGCTCGGAGAACAATACCG
250 260 270 280 290 300

RHO3-1 CAAAAATGGACT
APLRHO GACAAGTCCAGCCCTGAGCTTCGTCACTTTTGTCCAAATGTTCTATAATACTTGGGGT
310 320 330 340 350 360

YSCRHO1X 6/87 Yeast (S.cerevisiae) ras-related RHO1 169 169 209
71.6% identity in 102 nt overlap

RHO3-1 GACAGACTCCGCCCACTTTCCTACCCAGAT
YSCRHO CTATGGGATACCCCTGGTCAAGAAATATGATAGACTAAGACCAITTCATACCCAGAC
290 300 310 320 330 340

RHO3-1 ACAGATGTCATCTTATGTGCTTCTCTATAGATAGTCCGACAGCTTACAAAATATACCA
YSCRHO TCCAATGTTGTATTAATTTGCTTCTATGATGATCTTCCAGATCTTTCAGAAATGACAA
350 360 370 380 390 400

RHO3-1 GAAAAATGGACT
YSCRHO GAAAAATGGATTCCGGAAATATTAACATTTCTCTCAAGGCTGCGCAATATTCCTTGGT
410 420 430 440 450 460

DYGGTBP 1/91 Discopyge ovata GTP-binding protein m 166 166 243
77.2% identity in 101 nt overlap

RHO3-1 GACAGACTCCGCCCACTTTCCTACCCAGAT
DYGGTBP CTGTCGGACACAGCCGCGGAGACAGTATGACCCCTGCGAGCCCTCTCCCTACCCGAC
270 280 290 300 310 320

RHO3-1 ACAGATGTCATCTTATGTGCTTCTCTATAGATAGTCCGACAGCTTACAAAATATACCA
DYGGTBP ACCGATGTCATCTTATGTGCTTCTCTATAGATAGTCCGACAGCTTACAAAATATACCA
330 340 350 360 370 380

RHO3-1 CAAAAATGGACT
DYGGTBP CACAAGTCCAGCCCTGAGCTTCGTCACTTTTGTCCAAATGTTCTATAATACTTGGGGT
390 400 410 420 430 440

HUMRHOC 6/89 Human rho1 mRNA (clone 91) 6/89 165 165 250
78.2% identity in 101 nt overlap

RHO3-1 GACAGACTCCGCCCACTTTCCTACCCAGAT
HUMRHO CTGTCGGACACAGCCGCGGAGACAGTATGACCCCTGCGAGCCCTCTCCCTACCCGAC
170 180 190 200 210 220

RHO3-1 ACAGATGTCATCTTATGTGCTTCTCTATAGATAGTCCGACAGCTTACAAAATATACCA
HUMRHO ACATATGTCATCCCTCATGCTTTCTCTATAGACAGTCCAGACAGCTCGGAGAACAATACCG
230 240 250 260 270 280

RHO3-1 CAAAAATGGACT
HUMRHO GACAAGTCCAGCCCTGAGCTTCGTCACTTTTGTCCAAATGTTCTATAATACTTGGGGT
290 300 310 320 330 340

DOGRIHO1 5/91 Canine rho1 mRNA for ras-related GTP-bi 150 150
87.4% identity in 91 nt overlap

RHO3-1 GACAGACTCCGCCCACTTTCCTACCCAGAT
DOGRHO CAGCTGGGCAGGAAGATTATGATCGCTTGGAGCCCTCTCTCTATCCAGACAGTATGAT
180 190 200 210 220 230

RHO3-1 TICTTATGTGCTTCTCTATAGATAGTCCGACAGCTTACAAAATATACCA
DOGRHO TACTGATGTTTCTCTATAGATAGTCCGACAGCTTACAAAATATACCA
240 250 260 270 280 290

RHO3-1 CT
DOGRHO CCCCAGAACTCAAGCACTTCTGTCCCAAGTCCGCAATATTCCTTGGGAAATACCA
300 310 320 330 340 350

HUMRACA 3/90 Human ras-related C3 botulinum toxin su 154 154
67.7% identity in 99 nt overlap

RHO3-1 GACAGACTCCGCCCACTTTCCTACCCAGAT
HUMRAC TTATGGGATACAGCTGGACAAGAAGATTATGACAGATACGCCCTCTCTCTATCCGGA
170 180 190 200 210 220

RHO3-1 ACAGATGTCATCTTATGTGCTTCTCTATAGATAGTCCGACAGCTTACAAAATATACCA
HUMRAC ACAGATGTCATCTTATGTGCTTCTCTATAGATAGTCCGACAGCTTACAAAATATACCA
230 240 250 260 270 280

RHO3-1 CAAAAATGGACT
HUMRAC CACAAGTCCAGCCCTGAGCTTCGTCACTTTTGTCCAAATGTTCTATAATACTTGGGGT
390 400 410 420 430 440

HUMRASA 3/90 Human ras-related C3 botulinum toxin su 154 154
67.7% identity in 99 nt overlap

RHO3-1 GACAGACTCCGCCCACTTTCCTACCCAGAT
HUMRAS TTATGGGATACAGCTGGACAAGAAGATTATGACAGATACGCCCTCTCTCTATCCGGA
170 180 190 200 210 220

RHO3-1 ACAGATGTCATCTTATGTGCTTCTCTATAGATAGTCCGACAGCTTACAAAATATACCA
HUMRAS ACAGATGTCATCTTATGTGCTTCTCTATAGATAGTCCGACAGCTTACAAAATATACCA
230 240 250 260 270 280

RHO3-1 CAAAAATGGACT
HUMRAS CACAAGTCCAGCCCTGAGCTTCGTCACTTTTGTCCAAATGTTCTATAATACTTGGGGT
390 400 410 420 430 440


```

RH03-1 10 20 30
GACAGACTCGGCCACITTCCTACCCAGATACAGATGTCAT
X:XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
HUNG25 CTTTTTGATACTCCAGGCCAAGAGGATATGACAGATTACCAGCGCTCAGTTATCCCAA
170 180 190 200 210 220

RH03-1 40 50 60 70 80 90
ACAGATGTCATTCTTATGCTTCTCTATAGATAGTCCTGACAGCTTACAAAAATATACCA
X:XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
HUNG25 ACAGATGTCATTCTTATGCTTCTCTATAGATAGTCCTGACAGCTTACAAAAATATACCA
230 240 250 260 270 280

RH03-1 100
CAAAAATGGACT
X:XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
HUNG25 CAAAAGTGGTCCCTGAGATAACTCACCACCTGTCCAAAGACTCCTTTCTTCTTCTTGGG
290 300 310 320 330 340

>CELB030 10/91 C.elegans cosmid B3303, 10/91 114 50 60
81.8% identity in 22 nt overlap

RH03-1 10 20 30 40
GACAGACTCGGCCACITTCCTACCCAGATACAGATGTCAT
X:XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
CELB05 AATAAAACCCCTTCAAGACCCCTTGGATTCAGCTTTCACCCAGATAGATAGTGTG
13370 13380 13390 13400 13410 13420

RH03-1 50 60 70 80 90 100
TTATGCTTCTCTATAGATAGTCCTGACAGCTTACAAAAATATACCAGAAAAATGGACT
X:XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
CELB03 CAACATTGAGAATAATGGTAAGGCTACCACCTCCAAAGCCACCCAGGAAAGCCATATAT
13430 13440 13450 13460 13470 13480

>MHSBCCXD 9/98 House beta-globin complex DNA for y, b 110 53 60
71.4% identity in 42 nt overlap

RH03-1 10 20 30 40
GACAGACTCGGCCACITTCCTACCCAGATACAGATGTCAT
X:XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
MHSBCC ACAGTCTCTATAGATAGTCCTGACAGCTTACAAAAATATACCAGAAAAATGGACT
12170 12180 12190 12200 12210 12220

RH03-1 50 60 70 80 90 100
ATGTCCTTCTCTATAGATAGTCCTGACAGCTTACAAAAATATACCAGAAAAATGGACT
X:XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
MHSBCC ATCTGCTTCTCTATAGATAGTCCTGACAGCTTACAAAAATATACCAGAAAAATGGACT
12230 12240 12250 12260 12270 12280

>PT7D07 5/91 Genome of bacteriophage T7, 5/91 97 65 65
94.4% identity in 18 nt overlap

RH03-1 50 60 70 80 90 100
GCTTCTCTATAGATAGTCCTGACAGCTTACAAAAATATACCAGAAAAATGGACT
X:XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
PT7D01 AGGGGCTATGGAGTTCCTATAGGCTCTTAAATATACCAATAAAAAATCTGAGTACTAT
30720 30730 30740 30750 30760 30770

PT7D01 CTCACAGCTACGGAGCTAAAGTTCCTCCGATAGGGGTACCTAAAGCCGAGCCAAATCACC

```

Le programme "Alignement d'une séquence avec une banque de données" a permis de rechercher dans la banque GENBANK, les régions homologues à la séquence nucléotidique du clone 10-rho3. Il a classé ensuite par ordre décroissant, les séquences nucléotidiques ayant obtenues les meilleurs pourcentages d'homologies avec la séquence nucléotidique 10-rho3 de *M. edulis*.