

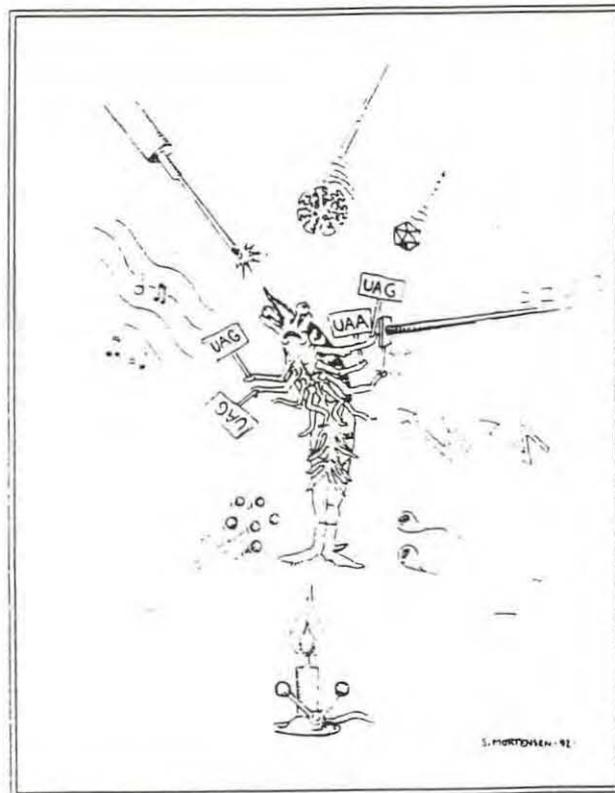
THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Spécialité
Océanographie Biologique

présentée par GENDREAU Sylvain

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITE de BRETAGNE OCCIDENTALE

RECHERCHES SUR LA TRANSFORMATION GENETIQUE DES CRUSTACES



Soutenu le 3 novembre 1992
devant le jury composé de :

Pr. LE PENNEC M.
Pr. LEPESANT J.A.
Pr. BERGOIN M.
Dr. MIALHE E.

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

(Université de Brest)
(Institut Jacques Monod)
(Université de Montpellier II)
(IFREMER)

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité de Recherches en Pathologie, Immunologie et Génétique Moléculaire de l'IFREMER, La Tremblade. Je remercie chaleureusement Monsieur Maurice Heral, responsable du Laboratoire de Biologie et Ecologie des Invertébrés Marins pour son soutien et l'intérêt qu'il a toujours manifesté pour cette étude, ainsi que Messieurs Joël Querellou, Jean-Louis Martin et Jacques Calvas, du Département des Ressources Aquacoles de l'IFREMER.

Cette thèse n'aurait pu être réalisée sans le soutien financier de SANOFI-ELF. J'exprime ma plus vive reconnaissance à Messieurs Xavier Moreno, Alain Michel, Michel More, Laurent Combaz et Hughes de Cherizey.

Des expérimentations ont pu avoir lieu aux Centres IFREMER de Brest et de Tahiti, à SANOFI-ELF BIO-RECHERCHE de Labège, à l'INRA de Jouy-en-Josas. A ce titre, je suis reconnaissant à Madame Chantal Cahu, Monsieur Patrick Quazugel et Monsieur Jacky Patrois pour leur entière contribution au maintien des géniteurs de pénéides. Je remercie Monsieur Paul Maldonado, Directeur Scientifique du centre de Labège, Monsieur David Shire, responsable du Département de Chimie Organique de SANOFI Labège et son équipe pour leur initiation sans réserve à diverses techniques et également Monsieur Jean-Pierre Ozil et Madame Micheline Massoud de l'INRA pour leurs conseils de passionnés. Enfin, le Professeur Louis Miller, Directeur du Laboratoire de Recherches sur la Malaria (NIH à Washington DC, USA), m'a accueilli dans son laboratoire. Je le remercie très sincèrement de m'avoir permis d'y effectuer les expériences de biolistique.

Je désire remercier Monsieur le Professeur Le Pennec, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Monsieur Jean-Antoine Lepesant, Directeur de Recherches à l'Institut Jacques Monod à Paris, et Monsieur le Professeur Max Bergoin, Professeur de Microbiologie à l'Université de Montpellier II, ont accepté de juger cette thèse et de participer à ce jury. Je leur suis sincèrement reconnaissant pour les critiques et les conseils attentionnés qu'ils ont pu me prodiguer.

Je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, avec un plaisir particulier pour Jean-Michel Delecheneau à Tahiti, Ren Shiang Lee, Vinca Lardans mais aussi Evelyne Bachère et Yvonne Favineau ainsi que Marc Orhesser, Rose-Marie Le Deuff, Kristell Cousin-Kellner, Béatrice Després, Philippe Audiot, sans oublier Sylvie Taillade pour la mise en page éclair du rapport final.

Enfin, je tiens à remercier plus particulièrement Eric Mialhe qui a permis mon accueil au laboratoire de La Tremblade et a assuré la responsabilité de directeur scientifique de ce sujet pionnier qu'il m'a confié. Tout au long de ces quelques années de travail à IFREMER, il a largement contribué à ma formation, m'a guidé et toujours soutenu avec optimisme et discernement.

Ce travail est dédié à mes parents, à Evelyne, Bertille et Jordi.

LISTE DES PUBLICATIONS DE L'AUTEUR

Certains résultats décrits dans ce travail ont fait l'objet de posters et de communications à divers congrès ainsi que la rédaction de deux publications sur les Crustacés (annexes 11 et 13).

PUBLICATIONS

Gendreau S., Delecheneau J.M. , Lee R.S., Cadoret J.P. and Mialhe E.. "Microinjection of crustacean embryos and transient expression of injected DNA". soumis à *Aquaculture*.

Gendreau S., Lardans V., Cadoret J.P., Mialhe E.. Transient expression of luciferase reporter gene after biolistic introduction into *Artemia sp.* (Crustacea) embryos. Soumis à *Aquaculture*.

Cadoret J.P., Delecheneau J.M., **Gendreau S.**, Mialhe E.. Protocols for microinjection of 1-cell embryos of bivalve molluscs and for detection of injected molecules. Soumis à *Biotechniques*.

Mialhe, E., Boulo V., Bachere E., Hervio D., Cousin K., Noel D., Noel T., Ohresser M., Le Deuff R.M., **Gendreau S.**, 1992. Development of new methodologies for diagnostic of infectious diseases in molluscs and shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 107.

Ohresser M., Le Deuff R.M., **Gendreau S.**, Mialhe E.. Quantitative survey of introduction of plasmid DNA, modified or unmodified oligodeoxynucleotides in insect cells. En préparation.

COMMUNICATIONS ET POSTERS

Gendreau, S., Cadoret, J.P. and Mialhe, E. Approche méthodologique du transfert de gènes chez les invertébrés marins. Comm. GABIM, Nantes, (F), Nov. 9-11 1989.

Gendreau, S., Cadoret, J.P., Ohresser, M. and Mialhe, E. Transfert de gènes chez les invertébrés marins. Comm. Premier Colloque Biotechnologies marines, Martigues, (F), 31 mai - 2 juin 1990.

Ohresser, M., Le Deuff, R.M. and **Gendreau, S.** Stratégie anti-sens contre les baculovirus. Comm. Premier Colloque Biotechnologies marines, Martigues, (F), 31 mai - 2 juin 1990.

Mialhe, E., Cadoret, J.P., **Gendreau, S.**, Delecheneau, J.M., Rousseau, C., Bachere, E., Boulo, V., Noel, D., Noel, T., Rodriguez, J., Ohresser, M., LeDeuff, R.M. et Lee, R.S. Stratégie de recherches sur la transgénèse chez les invertébrés marins en vue de l'obtention de souches résistantes aux maladies. Comm. Second Colloque Biotechnologies marines, La Tremblade, (F), 28-30 Mai 1991.

Gendreau, S., Delecheneau, J.M., Cadoret, J.P. and Mialhe, E. Methodology for microinjection of embryos of the shrimp *Penaeus indicus*. Poster. Aquaculture Europe 91, Dublin, (IRL), June 10-12 1991.

Cadoret, J.P., Mialhe, E., **Gendreau, S.**, Ohresser, M. and LeDeuff, R.M. Gene transfer: potential application to pathology of farmed marine invertebrates. Comm. CIEM, La Rochelle, (F), Sept. 1991.

Gendreau, S., Delecheneau, J.M., Cadoret, J.P., Lee, R.S. and Mialhe, E. Strategy of gene transfer in marine invertebrates for pathogen-resistant selection. Comm. Research for aquaculture: fundamental and applied aspects, Antibes, (F), Oct. 6-10 1991.

Gendreau, S., Delecheneau, J.M., Cadoret, J.P., Lee, R.S. and Mialhe, E. Gene transfer in crustaceans - Preliminary work. Poster. Research for aquaculture: fundamental and applied aspects, Antibes, (F), Oct. 6-10 1991.

ABREVIATIONS

A	adénosine
Å	angström
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNase	désoxyribonucléase
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
Amp^r	gène de résistance à l'ampicilline
APS	ammonium persulfate
ARN	acide ribonucléique
ARNase	ribonucléase
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ATP	adénosine 5'triphosphate
BEt	bromure d'éthidium
BSA	albumine sérique de boeuf
C	cytosine
CDTA	acide 1,2-cyclohexanediamino-N,N,N',N'-tétraacétique
CTAB	céthyltriméthylammonium bromide
ddNTP	didéoxynucléotide triphosphate
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DMT	diméthoxytrityl
dNTP	déoxynucléotide triphosphate
DO	densité optique
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N triméthylammoniumméthylsulfate
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylène diamine tétraacétique
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
g	accélération de la pesanteur
G	guanine
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kΩ	kiloohm
kΩ.cm⁻¹	kiloohm/centimètre
kb	kilo paire de bases
kV.cm⁻¹	kilovolt/centimètre
LB	milieu de Luria-Bertani
M	mole par litre
MOPS	acide sulfonique morpholinopropane
néo^r	gène de résistance à la néomycine
ODN*	ODN marqués à la rhodamine
ODNs	oligodéoxynucléotides
PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide
PBS	tampon phosphate salin
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PEG	polyéthylène glycol
SDS	sodium dodécyl sulfate
SVF	sérum de veau foetal
β-gal	β-galactosidase
βME	β-mercaptoéthanol
T	thymine

TAE	tampon tris, acétate, EDTA
TBE	tampon tris, borate, EDTA
TCA	acide trichloroacétique
TCM	trichlorométhane
TE	tris, EDTA
TEMED	tétraméthyl éthylène diamine
TM	température de fusion
TRIS	tampon tris-hydroxyméthyl-aminométhane
U	uridine
UV	ultra-violet
X-Gal	5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactoside

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS DE L'AUTEUR

INTRODUCTION	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LA TRANSFORMATION EN GENETIQUE ET SUR LES CONNAISSANCES EN GENETIQUE DES CREVETTES	5
MATERIEL ET METHODES	22
1. Matériel biologique	22
1.1. Les Artémies	22
1.2. Les Pénéides	23
2. Techniques de cultures cellulaires	24
2.1. Cellules d'insectes	24
2.2. Cellules de crustacés	24
2.3. Mesure de viabilité des cellules	25
2.4. Lipotransfection	25
3. Techniques de biologie moléculaire	25
3.1. Extractions d'ADN	25
3.1.1. ADN génomique de cellules d'Insectes	25
3.1.2. ADN génomique de Crustacés	25
3.2. Plasmides	26
3.2.1. Méthode de détection de l'activité galactosidase	27
3.2.2. Méthode de détection de l'activité luciférase	27
3.2.3. Méthodes d'extraction plasmidique	27
3.3. Electrophorèse d'acides nucléiques	28
3.3.1. Gel d'agarose	28
3.3.2. Gel de polyacrylamide	28
3.4. Oligodéoxynucléotides	29
3.4.1. Synthèse	29
3.4.2. Déprotection et purification	29
3.4.3. Marquage	30
3.5. Amplification enzymatique (PCR)	30
3.6. Clonage	31
3.6.1. Préparation des fragments à cloner	31

3.6.2. Préparation du vecteur de clonage	32
3.6.3. Ligature	32
3.6.4. Préparation et transformation des bactéries compétentes	32
3.7. Hybridations moléculaires	32
3.7.1. Dot-blot	32
3.7.2. Southern blot	33
3.7.3. Préparation de la sonde et hybridation	33
3.8. Séquençage	33
4. Microinjection	33
4.1. Appareillage et instruments	33
4.2. Technique d'immunofluorescence	34
5. Electroperméabilisation	35
6. Biolistique	35
6.1. Appareillage	35
6.2. Préparation des billes d'or recouvertes d'ADN	36
6.3. Bombardement	37
7. Analyse informatique des séquences nucléiques et protéiques	37
CHAPITRE 1: INTRODUCTION D'ADN. MISE AU POINT DE METHODES APPLICABLES A L'INTRODUCTION D'ADN DANS DES EMBRYONS ET DES CELLULES DE CRUSTACES	38
1. Introduction	38
2. Obtention d'embryons à des stades précoces	39
2.1. <i>Artemia</i>	39
2.1.1. Production d'embryons précoces	40
2.1.2. Essai de maintien <i>in vitro</i> d'ovocytes	40
2.1.3. Essai de fécondation <i>in vitro</i>	41
2.1.4. Essai de maintien <i>in vitro</i>	41
2.2. <i>Penaeus indicus</i>	42
2.2.1. Essais de ralentissement de développement embryonnaire	43
3. Mise au point d'un protocole de microinjection d'embryons de <i>Penaeus indicus</i> , <i>P. monodon</i> et <i>Artemia franciscana</i>	44
3.1. Elimination de la gelée corticale	44
3.2. Fabrication des microinstruments	44
3.3. Microinjection d'un fluorochrome	45
3.4. Estimation des taux de survie à la microinjection	45

4. Electroporation d'embryons	46
4.1. Sélection d'un milieu d'électrofusion	49
4.2. Détermination des paramètres d'électrofusion	49
5. Biolistique sur embryons d' <i>Artemia</i>	50
5.1. Essai de bombardement au stade cyste	51
5.2. Essai de bombardement au stade de pré-éclosion	51
6. Mise au point d'un protocole de lipofection des hémocytes de <i>P. japonicus</i>	52
6.1. Sélection d'un milieu de maintien des hémocytes <i>in vitro</i>	52
6.2. Sensibilité des hémocytes de <i>P. japonicus</i> aux liposomes	53
6.3. Seuil de toxicité du DOTAP	54
7. Discussions – conclusion	54
CHAPITRE 2: ETUDE DE L'EXPRESSION DE GENES "REPORTERS" DANS DES CELLULES ET DES EMBRYONS DE CRUSTACES	60
1. Introduction	60
2. Recherche d'une expression transitoire à l'échelle cellulaire	60
2.1. Lipotransfection d'hémocytes de <i>P. japonicus</i>	60
3. Expression transitoire de gènes marqueurs à l'échelle de l'animal	61
3.1. Application de la microinjection d'ovocytes de <i>P. indicus</i> au testage du promoteur viral CMV contrôlant le gène codant pour la β -galactosidase	61
3.2. Application du bombardement de larves d' <i>Artemia</i> au testage du promoteur hsp70 de <i>Drosophila</i> contrôlant la gène marqueur codant pour la luciférase	62
4. Discussions – conclusion	63
CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DE SEQUENCES NUCLEIQUES DANS LE GENOME DES CRUSTACES ARTEMIA ET PENAEUS	66
1. Introduction	66
2. Mise en évidence de séquences répétées dans le génome de <i>Penaeus</i> sp.	67
2.1. Séparation d'ADN répété satellite par centrifugation isopycnique	67
2.2. Séparation d'ADN répété par digestion enzymatique	67

3. Recherche des séquences du proto-oncogène <i>rho</i> et du promoteur de <i>hsp70</i> par PCR sur le génome de <i>Penaeus</i>	68
3.1. Recherche d'une portion de séquence régulatrice du gène inductible de <i>hsp70</i>	70
3.1.1. Choix d'amorces de PCR spécifiques du gène <i>hsp70</i>	72
3.1.2. Expériences d'amplification	71
3.2. Caractérisation d'une portion de séquence du proto-oncogène <i>rho</i> chez les crevettes pénéides	72
3.2.1. Localisation de régions consensus des proto-oncogènes <i>ras</i> et <i>rho</i> par analyse informatique	73
3.2.2. Choix et synthèse des ODNs pour la PCR	73
3.2.3. Amplifications avec les ODNs <i>ras</i>	74
3.2.4. Amplifications avec les ODNs <i>rho</i>	74
3.2.5. Caractérisation des fragments amplifiés (clonage, dot-blot et séquençage)	74
4. Discussions – conclusion	75
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	69
BIBLIOGRAPHIE	88
ANNEXES	

INTRODUCTION

AQUACULTURE DES PENEIDES

Depuis les années 1950, les Crustacés sont largement exploités par la pêche. Un renforcement de la demande sur les marchés internationaux, essentiellement de l'Amérique du Nord et de l'Asie, a engendré une très nette augmentation de leur prix, favorisant ainsi l'expansion des pêcheries. La production mondiale de crevettes a, en effet, doublé entre 1972 et 1988, passant ainsi de 1 à 2 millions de tonnes en poids frais. La part de production résultante de l'élevage, en pleine augmentation durant cette période, fut évaluée à 22 % en 1988 (FAO). Cette aquaculture a rapporté environ 2 milliards de US\$ aux éleveurs avec un chiffre d'affaires de 6 milliards de US\$. L'élevage des crevettes est en fait pratiqué depuis fort longtemps dans certains pays comme ceux du Sud-Est asiatique. Cet élevage extensif tire parti de façon simple des phénomènes migratoires des jeunes crevettes, nées en mer, vers des lagunes où la capture et le grossissement sont réalisés. Depuis 1960, date à laquelle le Japon produisait la première tonne de crevettes d'élevage (*Penaeus japonicus*), ce fut l'amélioration constante des techniques de production intensive de larves en écloséries et de grossissement des juvéniles en bassins jusqu'à une taille marchande, qui permit cette explosion rapide de l'aquaculture des crevettes tropicales dont les principales espèces commercialisées appartiennent au genre *Penaeus* (annexe 1). Alors qu'en 1980, les experts s'accordaient sur une production mondiale de Crustacés d'élevage de 300 000 tonnes, elle s'éleva à 650 000 tonnes en 1990 et 700 000 tonnes en 1991, ce qui correspond sur le marché international à une crevette tropicale sur trois en provenance d'une ferme aquacole. Il faut noter que cette dernière activité représente aujourd'hui une activité primordiale pour l'économie de plusieurs pays du Sud-Est asiatique et d'Amérique Latine.

PATHOLOGIE ET DIAGNOSTIC

Comme en agriculture, l'intensification des élevages a vu naître et se développer des pathologies. Toutes les principales espèces de crevettes d'élevage (*Penaeus monodon*, *P. chinensis*, *P. vannamei* et *P. japonicus*) sont affectées par des maladies bactériennes, fongiques et virales d'étiologies variées : picornavirus, parvovirus et baculovirus (annexe 2). Ces virus, qui appartiennent à une liste encore certainement sous-estimée chez les Crustacés en regard de celle établie chez les Insectes, sont responsables de cas de mortalités massives en éclosérie dans différentes régions du monde. A Taïwan, par exemple, la production de *P. monodon* a chuté de 114 500 à 43 700 tonnes durant l'année 1988 du fait d'une baculovirose (Liao, 1990).

Ainsi, en raison de l'emploi intensif d'un nombre restreint d'antibiotiques dans les élevages larvaires et de l'absence de traitement contre les infections virales, de nouvelles méthodes de diagnostic en aquaculture doivent être envisagées. Pour cela, chez les Mollusques

bivalves, des réactifs (Anticorps monoclonaux et sondes nucléiques) spécifiques du Protozoaire *Bonamia ostreae* ou de procaryotes (*Vibrio* P1 ou Rickettsiales), ont été préparés et utilisés pour le diagnostic de ces pathogènes (Mialhe *et al.*, 1992a). Chez les crevettes, au contraire, les études en sont encore au stade de la description des agents pathogènes en microscopie optique et photonique.

AMELIORATION GENETIQUE

L'amélioration génétique devient une approche privilégiée pour contrôler les maladies, c'est pourquoi des recherches sont initiées à l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) pour améliorer la résistance des Crustacés d'élevage aux maladies. Deux voies complémentaires d'investigations s'y développent dans ce sens.

La première voie, classique, repose sur la sélection d'individus ou de populations résistantes à une maladie sur des critères phénotypiques (individu réfractaire), vraisemblablement d'expression partielle et d'hérédité polygénique, qui peut conduire à ralentir le développement d'une épidémie.

La seconde approche, inspirée du domaine végétal mais totalement pionnière à l'échelle des Crustacés, s'appuie sur la création d'organismes transgéniques capables d'infléchir plus ou moins fortement leur sensibilité aux maladies. Ces nouveaux Crustacés deviendraient capables de perturber la propagation de maladies en renforçant leur propre système de défense et/ou en leur ajoutant de nouveaux systèmes de défense adaptés au contrôle et à la neutralisation voire à l'élimination de chaque pathogène.

L'application de la transformation génétique en tant que méthode de lutte contre des maladies infectieuses permet aujourd'hui, notamment chez les plantes, d'exercer un contrôle efficace sur l'extension de maladies. Les différentes catégories de gènes qui ont apporté ou sont susceptibles d'apporter une résistance à des maladies infectieuses chez des animaux et/ou des plantes transgéniques sont (1) les gènes de type immunitaire tels que ceux codant pour l'interféron (Chen *et al.*, 1988b), les "Colony Stimulating Factor" (Tran *et al.*, 1990) ou pour des immunoglobulines (Weidle *et al.*, 1991 ; Hiatt, 1989 ; Chen *et al.*, 1988a) ; (2) les gènes codant pour des protéines microbicides vis à vis de champignons (Logemann *et al.*, 1992) ou de bactéries (Jaynes *et al.*, 1987) ; (3) les gènes codant pour des protéines de capsid virale (Stark et Beachy, 1989 ; Nelson *et al.*, 1988) ; et (4) les séquences anti-sens et ribozyme (Takayama *et al.*, 1990).

Dans cette perspective d'amélioration génétique orientée vers la résistance aux maladies, il importe de déterminer une stratégie de recherche pour la transformation génétique des Crustacés. Dans tous les groupes zoologiques et végétaux où la transformation génétique est pratiquée, des stratégies spécifiques ont été développées qui ont tenu compte de la biologie des organismes et, éventuellement, de la disponibilité de systèmes de

transformation tels que des rétrovirus ou des transposons (voir rappel des connaissances). Dans le cas des Crustacés, de tels systèmes transformants n'ont pas encore été identifiés. De ce fait, la stratégie de recherche à privilégier devrait se rapprocher de celle développée chez les Insectes "non-drosophilidés" en raison, d'une part de leur parenté zoologique (Arthropodes) et de nombreuses similitudes biologiques, d'autre part de l'absence d'éléments transposables spécifiques ou hétérologues efficaces. Selon l'analyse détaillée faite par Handler et O'Brochta (1991) sur la transformation génétique des Insectes, il ressort que plusieurs axes de recherches doivent être prioritairement développés. Ils concernent chronologiquement : (1) la mise au point de méthodes d'introduction d'ADN dans des systèmes cellulaires spécifiques, en particulier les cellules de la lignée germinale, (2) l'étude de l'expression de gènes marqueurs placés sous le contrôle de promoteurs, initialement hétérologues afin de disposer de système de référence, puis homologues au fur et à mesure de l'identification de séquences spécifiques ceci dans le but de contrôler spatio-temporellement l'expression, (3) l'intégration dans le génome de gènes permettant la sélection d'individus transgéniques, ces gènes étant préférentiellement associés à des séquences favorisant l'intégration ultérieure ciblée et à haute fréquence de gènes d'intérêt.

Jusqu'à ce jour, aucun de ces problèmes n'a encore été appréhendé chez les Crustacés. Dans le cadre de ce travail, les deux premiers points de cette stratégie ont été considérés.

PLAN DU TRAVAIL

Les travaux décrits dans ce document ont été réalisés au sein de l'URPIGM (Unité de Recherche en Pathologie, Immunologie et Génétique Moléculaire) à IFREMER. Au cours de ce mémoire, des recherches ont été initiées dans ces trois axes précédemment décrits chez les Crustacés du genre *Artemia* et *Penaeus* qui présentent des intérêts fondamentaux et appliqués.

Au préalable, un point des connaissances sur la transformation génétique et une synthèse de son application chez tous les organismes déjà manipulés, a permis d'établir une stratégie de travail pour aborder la transformation génétique chez les Crustacés.

Le premier chapitre du travail a consisté à développer des méthodes d'introduction de molécules dans des ovocytes, des stades embryonnaires précoces ainsi que dans des cellules cultivées *in vitro*. Ceci a nécessité au préalable des choix d'espèces biologiques ainsi qu'une recherche de connaissances sur la périfécondation chez ces espèces. Quatre techniques d'introduction (microinjection, électroporabilisation, bombardement et lipofection) ont été retenues et adaptées aux Crustacés choisis en donnant lieu à la mise au point de protocoles spécifiques.

Dans un deuxième chapitre, les protocoles d'introduction et de détection d'ADN ont été appliqués à l'analyse de différents vecteurs d'expression codant pour un gène marqueur.

Le troisième chapitre regroupe des recherches menées à l'échelle chromosomique et moléculaire sur le génome des Crustacés. L'organisation du génome a tout d'abord été appréhendée par le biais d'analyses des ADN répétés en électrophorèse, par centrifugation isopycnique et PCR. Un autre aspect a été focalisé sur la recherche par PCR de séquences spécifiques de Crustacés, impliquées respectivement, dans la régulation de l'expression du gène codant pour la protéine de stress de 70kD (hsp70) et dans le cycle cellulaire (*ras* et "*ras-like*").

Enfin, les perspectives d'études et d'applications issues de ces résultats sont discutées dans un dernier chapitre.

**RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LA
TRANSFORMATION EN GENETIQUE ET
SUR LES CONNAISSANCES EN
GENETIQUE DES CREVETTES**

QU'EST-CE QUE LA TRANSFORMATION GENETIQUE ?

Le présent travail concernant la transformation génétique étant le premier du genre à être abordé chez les Crustacés, il a été absolument nécessaire de faire, en premier lieu, une analyse bibliographique exhaustive parmi tous les organismes vivants génétiquement transformés par l'homme. Après un rappel sur la transformation génétique chez les procaryotes, une analyse bibliographique plus fouillée chez les eucaryotes a été entreprise. Cette analyse, d'avantage tournée vers les eucaryotes supérieurs, repose sur les tableaux synthétiques (annexes 3 et 5) auxquels il est fait largement référence par la suite.

Le processus de transformation génétique au sens large en génie génétique décrit le transfert, naturel ou artificiel, d'ADN dans des cellules intactes et viables, qu'elles soient d'origine eucaryote ou procaryote.

La transformation génétique chez les procaryotes

A l'échelle des procaryotes, les bactéries peuvent acquérir naturellement de nouvelles informations génétiques et ce de plusieurs façons. Ces événements incluent tout d'abord la transformation *sensu stricto* au cours de laquelle les cellules bactériennes prélèvent les molécules d'ADN ajoutées dans le milieu environnant, ensuite la conjugaison lors de laquelle l'ADN est directement transféré d'une cellule à une autre et enfin la transduction médiée par un bactériophage. Ces introductions naturelles peuvent être exacerbées ou remplacées par des méthodes artificielles physiques et/ou chimiques d'introduction d'ADN procaryote ou eucaryote. L'insertion de gènes eucaryotes ou de copies d'ADNc dans des molécules d'ADN (viral, plasmidique ou cosmétique) capables de se répliquer dans une cellule procaryote appropriée a permis de déterminer la structure primaire de ces gènes. De plus, ceci a permis de mettre en évidence généralement à leurs extrémités, des régions régulatrices indispensables à leur transcription et à leur traduction.

Ces méthodologies de recombinaison d'ADN ne sont pas seulement puissantes pour la construction, la réplique et l'analyse des ADN recombinants qu'elles autorisent, mais surtout pour la possibilité de cloner une molécule individuelle d'ADN. En effet, ces techniques permettent de répliquer considérablement des segments uniques d'ADN à partir de mélanges très complexes de segments tels que les produits de digestions enzymatiques d'un génome cellulaire ou viral. Par contre, quel que soit le mode d'entrée de l'ADN dans les cellules bactériennes réceptrices, l'ADN acquis soit se recombine avec des régions homologues ou des sites spéciaux situés dans le génome hôte, soit est maintenu en minichromosome autonome, altérant de ce fait le génotype de l'organisme receveur (pour un détail des méthodes de biologie moléculaire, voir Genes IV, Lewin).

Si la compréhension des mécanismes génétiques impliqués chez les procaryotes est considérablement plus avancée que chez les organismes eucaryotes, ceci est probablement dû au fait que l'analyse génétique est plus simple sur un petit génome bactérien que sur un génome plus complexe. Parmi ces procaryotes, *Escherichia coli* est le microorganisme le mieux connu et l'hôte le plus répandu actuellement. Cependant, si sa croissance est rapide (1000 fois plus rapide que les cellules animales), il n'est pas toujours le mieux adapté pour exploiter correctement l'information génétique qu'il a acquis. L'absence, en effet, de certaines activités enzymatiques chez ces bactéries représente un handicap pour obtenir un produit biologiquement actif chez les eucaryotes (Cullen, 1987). Il est donc apparu nécessaire, pour étudier l'intégrité, la fonction et la régulation de gènes cellulaires clonés dans ces cellules procaryotes, de les transférer dans des cellules eucaryotes animales ou végétales. La machinerie plus complexe de celles-ci comporte, en effet, les enzymes nécessaires à un épissage de pré-ARN comportant des parties codantes (exons) et non codantes (introns) ainsi que les enzymes impliqués dans la série de modifications post-traductionnelles des protéines.

La transformation génétique chez les eucaryotes

De l'information génétique a ainsi été artificiellement transférée dans plusieurs types cellulaires eucaryotes plus ou moins différenciés (Colbère-Garapin et Garapin, 1985), allant de lignées extrêmement différenciées telles que des cellules neuronales (Evrard *et al.*, 1991) à des cellules totipotentes comme un oeuf quelques instants après la fécondation (Landel, 1991), une cellule détachée d'un embryon (Evans, 1989) ou encore un protoplaste élaboré à partir d'une algue ou d'une plante (Larkin *et al.*, 1990 ; Morikawa *et al.*, 1988).

A l'échelle d'une cellule en culture, cette information génétique peut soit rester extrachromosomique et l'expression éventuelle de l'information est dite transitoire (Skala *et al.*, 1986), soit s'intégrer dans le matériel chromosomique et donner lieu à une expression dite stable si les générations de cellules filles la conservent. De plus, l'expression de cette information peut ne s'exprimer que dans certaines lignées cellulaires ou tissulaires (Machy *et al.*, 1988 ; Maurer, 1991) et l'expression est alors dite cellule ou tissu-spécifique et/ou peut aussi s'y exprimer de façon constitutive (Colbère-Garapin et Garapin, 1985) c'est-à-dire en permanence. Cette expression peut encore être dépendante de facteurs déclenchants comme un stress (Heikkila *et al.*, 1986). Dans ce dernier cas par exemple, l'expression est dite stress-inductible et peut parfois offrir l'avantage d'être ponctuelle et réversible lorsque le stress cesse. Bien que les lignées cellulaires aient dû perdre quelques caractéristiques de leur état différencié d'origine, elles offrent l'énorme avantage d'être facilement reproductibles avec des contextes cytoplasmique et nucléaire stables. Cependant, l'introduction d'ADN

Physique

- ▶▶ choc électrique (electroporation, baekonisation)
- choc acoustique (ultrasons)
- rayonnement (laser, gamma)
- ▶▶ bombardement de microparticules (biolistique)
- injection intramusculaire
- choc thermique
- choc osmotique
- perforation par microfibrilles (Silicone)
- déchirement cellulaire ("scrapping, scratching")
- ▶▶ microinjection

Chimique

- Ca₂PO₄
- Agent fusionnant (DEAE dextran-PEG)
- DMSO, glycérol
- ▶▶ liposomes
- ATP, EGTA

Biologique

- spermatozoïdes
- bactérie tumorigène
- virus (encapsulation, virus recombinant)

Tableau 1 : Méthodes de transfection actuellement disponibles

dans des cellules en culture, ou transfection cellulaire, ne permet d'étudier l'effet de cet ADN étranger qu'à l'échelle d'un type cellulaire isolé.

Par contre, si la cellule transformée a la capacité de générer un organisme entier ou d'y participer, l'intérêt majeur devient alors de pouvoir analyser l'impact de la nouvelle information génétique non plus à l'échelle d'une cellule isolée et stable mais à l'échelle d'un organisme complexe et autonome (Jaenisch, 1988 ; Weising *et al.*, 1988). Il devient dès lors possible d'analyser l'effet d'une séquence d'ADN étranger au sein des tissus du nouvel organisme en interactions spatio-temporelles mutuelles et permanentes avec l'environnement. Une fraction seulement des cellules de cet organisme peut être modifiée et l'organisme est alors dit mosaïque (Hough-Evans *et al.*, 1988), et s'il est capable de surcroît, dans certains cas, de transmettre de façon mendélienne cette modification à sa descendance, il est dit transgénique et donne lieu à une lignée transgénique stable (Gordon, 1989). Enfin, et selon les profils spatio-temporels d'expression de l'ADN intégré, l'expression est qualifiée de tissu spécifique (Yamamura *et al.*, 1988) ou de stade-spécifique si la modification n'a d'effet que sur des stades bien particuliers du développement (Colin *et al.*, 1988). Il faut enfin savoir que les mécanismes d'intégration d'ADN dans les chromosomes sont encore mal connus (Bishop et Smith, 1989 ; Puchta et Hohn, 1991 ; Venkateswarlu et Nazar, 1991 ; Bollag *et al.*, 1989) hormis chez la levure chez qui un fragment étranger d'ADN peut ne pas être intégré au hasard en faisant appel à la recombinaison homologue. Par conséquent, ceci nécessite de repérer, par une étape systématique de criblage des cellules transformées ou des organismes qui en dérivent, le site d'intégration qui peut en effet interférer avec le décodage de ce nouveau gène ou celui de l'ADN receveur.

COMMENT TRANSFERER UN GENE DANS UNE CELLULE EN CULTURE OU DANS UN ORGANISME EUKARYOTE ?

La transformation génétique repose en premier lieu sur la possibilité d'altérer physiquement la barrière du compartiment dans lequel le matériel génétique est normalement stocké. Selon le niveau d'organisation de la cellule hôte à transformer et de ses propres caractéristiques biologiques et mécaniques, les techniques d'introduction d'ADN par altération des barrières sont différentes sans être pour autant exclusives. En fonction de la nature du vecteur d'altération, on peut distinguer trois familles de méthodes (tableau 1) : (a) physiques, (b) chimiques, (c) biologiques ainsi que des combinaisons entre elles. Une fréquence d'emploi de chacune de ces méthodes est illustrée dans l'annexe 5.

Vecteur physique

Le but commun des méthodes faisant appel à un vecteur physique, est de déclencher la formation transitoire d'un micropassage entre le milieu extérieur et les compartiments intérieurs d'une cellule (cytoplasme ou noyau). Les divers éléments physiques déjà utilisés sont : (1) un champ électrique pour l'électroporation (Potter, 1988 ; Douglas *et al.*, 1991), (2) des microparticules métalliques à haute énergie cinétique pour la biolistique (Sautter *et al.*, 1991), (3) des ondes à effet perturbateur comme un faisceau laser, des ultrasons ou un rayonnement gamma (Weber *et al.*, 1990), (4) un choc thermique, mécanique ou osmotique (Sasaki *et al.*, 1991), (5) des objets perforateurs tels qu'une microfibre ou une microaiguille pour la microinjection (Asano *et al.*, 1991).

L'électroporation (Tsong, 1991) repose sur le fait que les composants de la membrane plasmique d'une cellule vivante sont polarisables lorsque la cellule est soumise à un bref champ électrique intense. Si le potentiel transmembranaire ne dépasse pas un certain seuil, qui est différent selon la cellule et le milieu, la membrane se rompt dans certaines zones localisées. Les conséquences qui en résultent sont le transport de molécules par des mécanismes qui peuvent être la perméation, un transport électrocinétique ou un flux hydrodynamique dû à une différence de pressions osmotiques. Cette technique est applicable à divers types cellulaires (Potter, 1988) comme des bactéries (Shigekawa et Dower, 1988), des levures (Forster et Emeis, 1985), des protoplastes (Morikawa *et al.*, 1988) et des lignées cellulaires (Teissié et Rols, 1986) pour introduire une variété de molécules et notamment de l'ADN chez des cellules eucaryotes en culture (Andreason et Evans, 1988). Ces champs électriques peuvent aussi être utilisés pour fusionner des blastomères d'embryons ("embryonic stem cell") ou des noyaux avec des cellules énucléées (Baribault et Kemler, 1989). Cette manipulation offre l'intérêt de charger un cytoplasme avec une information génétique qui peut être volontairement et précisément altérée (Mansour *et al.*, 1988). Une optimisation des paramètres est systématiquement nécessaire (McNelly *et al.*, 1988 ; Knutson *et al.*, 1987 ; Andreason et Evans, 1988) notamment à l'aide de fluorochromes (Sczakiel *et al.*, 1989). Quantitativement, cette technique peut s'avérer très précise dans le dénombrement des molécules introduites (Bartoletti *et al.*, 1989) au sein d'une population cellulaire stable (Bliss *et al.*, 1988). L'électroporation appliquée sur des oeufs comme chez l'oursin (Richter *et al.*, 1981 ; Swezey et Epel, 1989) commence aussi à être appliquée avec succès pour transformer des oeufs de Poissons (Inoue, 1991 ; Bueno *et al.*, 1991). La baekonisation, basée aussi sur la délivrance de chocs électriques, est plus récente et semble donner d'excellents premiers résultats (Zhao et Wong, 1991). Les avantages de ces techniques sont la rapidité de mise en oeuvre et d'action, le prix de l'appareillage qui peut être modeste et la possibilité de traiter simultanément de très

nombreuses cellules ou embryons. A l'opposé, une limite est le taux de transformation qui varie selon les cellules de 0 % à 90 %.

Une autre variété de champ a été utilisée pour transformer des tissus: les champs acoustiques. Récemment, en effet, l'**ultrasonication** d'explants de tabac pendant 30 minutes aurait permis à une équipe chinoise d'obtenir des plants transformés de façon stable.(Jia, 1991).

L'application d'un microfaisceau UV-**laser** sur des cellules est une autre méthode qui permet, sans manipulation mécanique des cellules, d'introduire de l'ADN dans le cytoplasme de cellules animales (Kurata *et al.*, 1986), de plantes supérieures (Weber *et al.*, 1990) ou dans des compartiments subcellulaires de ces dernières comme les chloroplastes (Weber *et al.*, 1989). Cette technique permet de travailler de façon extrêmement fine sur une cellule à la fois. Afin de pallier à ce faible rendement, une automatisation de ce procédé pourrait être envisageable en procédant à un défilement des cellules dans la chambre de tir. Néanmoins, un inconvénient reste le coût élevé de l'appareillage.

D'autres types de rayonnement ont été testés à des fins de transformation comme par exemple les **rayons gamma** sur du pollen de tabac (Reed *et al.*, 1988). L'unicité de ce résultat ne permet pas d'évaluer le rapport avantages/inconvénients bien que cette technique permette d'envisager des traitements "en masse".

La **biolistique** (contraction des mots *biologie* et *ballistique*) consiste à bombarder un échantillon biologique avec des microbilles métalliques (or, tungstène) recouvertes d'ADN et accélérées par une décharge électrique, une explosion avec de la poudre à canon ou du gaz sous pression. C'est une technique qui a été mise au point initialement pour transférer des gènes dans les cellules régénératrices de plantes (cal embryogène et méristème) jusqu'alors difficiles à transformer par les autres méthodes (Hagio *et al.*, 1991 ; Hagio, 1989 Mendel *et al.*, 1989 ; Klein *et al.*, 1988a ; Wang *et al.*, 1988 ; Klein *et al.*, 1988b ; Kartha *et al.*, 1989 ; Kaepler *et al.*, 1990 ; McCown *et al.*, 1991). Malgré la plus grande fragilité des cellules animales comparativement aux cellules végétales, la viabilité reste élevée et des expressions transitoires ont déjà été obtenues avec ce procédé dans des embryons d'arthropodes comme la mouche *Drosophila* (Baldarelli et Lengyel, 1990) et le moustique *Anopheles* (Mialhe *et al.*, 1992b) ainsi que chez les Vertébrés avec le bombardement d'organes entiers de souris vivantes (Yang *et al.*, 1990 ; Williams *et al.*, 1991). Les avantages de cette technique sont le traitement "en masse" d'embryons unicellulaires ou même bien organisés et la délivrance d'une fraction de l'ADN dans le compartiment nucléaire après une éventuelle traversée d'une très fine pellicule de liquide. L'un des inconvénients est le prix des consommables tels que les projectiles d'or assortis des disques de rupture en kapton.

Chez les Vertébrés, un procédé simple, l'**injection intramusculaire** d'ADN plasmidique, a permis d'introduire de l'ADN dans les noyaux des cellules situées autour du site d'injection

(Wolff *et al.*, 1990). L'ADN ne s'intègre pas mais persiste sous forme circulaire de quelques semaines à quelques mois. Ce système est envisageable lorsque l'on souhaite qu'une expression transitoire soit localisée dans un nombre limité de cellules et pourrait donner lieu par exemple à la production de vaccins par injection intramusculaire de gènes codant pour les antigènes capables de stimuler une réponse immunitaire. Au delà de cet avantage en terme d'application, cette technique, très simple et peu coûteuse, peut permettre de tester aisément l'efficacité d'une construction ADN dans le tissu bien particulier d'un organisme adulte. L'inconvénient est qu'elle ne peut engendrer que des transformations somatiques et non germinales.

Les cristaux induits par une brève **congélation** de cellules mélangées avec de l'ADN permet aussi d'y introduire de l'ADN (Sasaki *et al.*, 1991). Ces cristaux formés dans l'azote liquide perforent la membrane et constituent ainsi un passage pour l'ADN. Cette technique, peu utilisée bien que très économique, nécessite de bien connaître les altérations notamment membranaires provoquées lors des variations brutales de température.

Tout comme chez les embryons de drosophile légèrement déshydratés avant d'être injectés, le processus de déshydratation suivi d'une **imbibition** a été utilisé sur des embryons somatiques de plantes (Senaratna *et al.*, 1991). La bicouche lipidique du plasmalemme de ces embryons, induits à tolérer une dessiccation de 85 à 90 %, devient désorganisée et perméable et laisse ainsi passer de l'ADN lors d'une étape ultérieure d'imbibition des germes. Cette technique, développée vraiment ponctuellement, ne nécessite aucun appareillage sophistiqué mais une connaissance exacte des réponses physiologiques des embryons soumis successivement à une déshydratation et une réhydratation.

La perforation des membranes, faisant appel à un autre matériau, est réalisée en vortexant simplement les cellules et le plasmide, en présence de **microfibres de sillicone** en milieu liquide. Cette technique, brevetée, d'un principe très simple qui s'apparente à l'action d'une seringue de microinjection a permis de transformer des cellules de plantes ainsi que des oeufs d'insectes (Kaepler *et al.*, 1990 ; Asano *et al.*, 1991 ; Kaepler *et al.*, 1990).

La **microinjection** fait appel à une microseringue dans laquelle la solution à injecter est propulsée par un fluide soit gazeux soit liquide. La cellule injectée est généralement maintenue par un capillaire. Cette technique, relativement coûteuse comparée aux autres et lourde à mettre en oeuvre (Landel, 1991), ne permet pas d'injecter individuellement un très grand nombre de cellules. Ceci ne présente pas d'inconvénient lorsque très peu d'ovocytes doivent être manipulés comme dans la fertilisation assistée d'ovocytes (Krzyminska *et al.*, 1992). Néanmoins, outre l'avantage d'induire des fréquences élevées de transformation génétique chez des cellules totipotentes ou différenciées après microinjection, cette technique est de plus en plus appliquée seule ou associée à d'autres techniques pour transformer directement des cellules *in vivo* (Wolff *et al.*, 1990). Cependant, hormis le cas exceptionnel récent d'une transformation de graines de riz suite à l'injection d'un plasmide

dans le style des fleurs de cette plante (Luo et Wu, 1989), l'injection *in vivo* ne permet pas d'obtenir une propagation stable de l'ADN injecté dans d'autres cellules de l'organisme.

Un autre avantage indéniable de la microinjection de cellules isolées est, outre la fiabilité et de la précision de l'introduction d'ADN, la très vaste étendue des produits qu'elle permet d'introduire (annexe 3). Parmi ceux-ci, il faut noter des protéines, des glucides, des liposomes, des ARN (ARNm, ARN synthétique antisens), des oligoADN de synthèse, des carcinogènes pour l'établissement de lignées cellulaires, des substances traceuses ou indicatrices utiles en recherche développementale, des organites ou organelles comme des pronuclei afin de reprogrammer une cellule ou des mitochondries, des chromosomes individualisés entiers ou fragmentés, du cytoplasme, des cellules entières comme des bactéries non pathogènes mais féminisantes, des agents pathogènes, des spermatozoïdes pour des travaux d'hybridation et de fertilisation assistée et plus récemment des cellules intactes issues d'embryons pluricellulaires susceptibles de participer au développement d'un autre embryon pluricellulaire.

Vecteur chimique

Le principe général de ces méthodes est de former un complexe chimique à la surface de la cellule, dont l'effet est d'en fragiliser la membrane et de la rendre "perméable" à des substances étrangères.

Parmi les techniques maintenant classiques de transformation chimique transitoires ou stables, on peut citer les méthodes au phosphate de calcium (Chen et Okayama, 1988), au DEAE-dextran (Puchalski et Fahl, 1992), aux cryoprotectants comme le DMSO (Kozak, 1986) ou le glycérol (Parker et Strak, 1979), et la lipofection (Mannino et Gould-Fogerite, 1988). A l'origine, les couches lipidiques multilamellaires ou unilamellaires de petite taille furent employées comme modèle d'étude des propriétés membranaires. La préparation de vésicules lipidiques unilamellaires de plus en plus grandes (0,2 à 0,4 μm), ou *liposomes*, a permis de créer par la suite des structures capables de véhiculer des macromolécules. L'activité de ces structures a été mise à profit comme vecteur de gènes aussi bien dans le monde végétal que animal. De nombreuses transformations par liposomes sont en effet rapportées tant chez des cellules eucaryotes en lignée (Mannino et Gould-Fogerite, 1988 ; Hug et Sleight, 1991 ; Malone, 1989 ; Belkowski *et al.*, 1989 ; Felgner et Holm, 1989 ; Felgner *et al.*, 1987 ; Sporlein et Koop, 1991) que chez des cellules animales en primoculture (Maurer, 1989) ou de protoplastes (Lucas *et al.*, 1990) mais aussi plus récemment pour des cellules issues d'embryons (Brazolot *et al.*, 1991) ou même des embryons entiers (Beaty, comm. pers.).

Vecteur biologique

Ces méthodes reposent sur la mise à contribution de vecteurs naturels d'introduction de matériel, notamment génétique, dans une cellule particulière voire dans son génome : (1) le spermatozoïde chez les espèces à reproduction sexuée (Lavitano *et al.*, 1989 ; Castro *et al.*, 1990), (2) un genre de bactérie tumorigène (*Agrobacterium*) chez certaines plantes (Tepfer et Casse-Delbart, 1987 ; Zambryski, 1988), (3) des particules virales capables de transférer des acides nucléiques à travers les membranes cellulaires et nucléaires (Lebkowski *et al.*, 1988), (4) des récepteurs membranaires (Wagner *et al.*, 1990). Des cas d'utilisation de ces types de vecteurs sont mentionnés en annexe 5.

Lors de la reproduction sexuée, les enzymes acrosomales des **spermatozoïdes** participent activement à l'entrée du génome mâle qui deviendra le pronucléus mâle dans l'ovocyte. Chez des espèces où la fécondation *in vitro* est maîtrisée, des spermatozoïdes ont été chargés en ADN exogène avant de fusionner avec des gamètes femelles homospécifiques. Des résultats ont ainsi été obtenus chez l'oursin (Arezzo, 1989), l'abeille (Milne, 1991), chez la souris (Lavitano *et al.*, 1989 ; 1992) et seulement tentés ou non reproductibles chez la souris (Gavora *et al.*, 1991) et chez d'autres espèces comme le poulet (Gavora *et al.*, 1991) et les Mollusques (McClean, comm. pers.). Des travaux à caractère préliminaire ont analysé le phénomène d'association d'ADN étranger avec des spermatozoïdes de mammifères (Atkinson *et al.*, 1991).

Chez les dicotylédones essentiellement, des bactéries du genre **Agrobacterium** sont capables naturellement, grâce à leurs plasmides, d'intégrer de l'ADN dans un chromosome (Zambryski, 1988). Ces bactéries induisent, en effet, une tumeur au cours de laquelle la bactérie transfère un segment de son plasmide inducteur de tumeur (Ti) au site d'infection. Ces plasmides ont été génétiquement remaniés pour développer toutes sortes de protocoles de transformation (annexe 4). Ces agrobactéries peuvent en effet être cocultivées avec des protoplastes et exceptionnellement avec des disques foliaires (Marton, 1984). L'utilisation d'*Agrobacterium*, bien que limitée aux plantes sensibles aux agrobactéries, reste cependant un bon système d'introduction de gènes car il ne nécessite pas obligatoirement le passage par le stade protoplaste et l'intégration du T-ADN est un processus relativement précis. De plus, la stabilité des gènes introduits semble excellente. Elle constitue un paramètre important pour une utilisation, voire une commercialisation des plantes génétiquement modifiées (Gasser et Fraley, 1989).

L'emploi de **virus** chez les eucaryotes supérieurs est analogue à celui utilisant des cosmides et l'encapsidation en phage lambda pour introduire des fragments d'ADN recombinant chez *E. coli* (Feiss et Becker, 1983). De plus, pour certains virus, le transfert de leurs acides nucléiques est stabilisé par une intégration stable dans le génome de la cellule hôte (Oppenheim *et al.*, 1986). Plusieurs groupes de virus comme les adénoviridae, les

papovavirus et les paramyxovirus contribuent à délivrer de l'ADN, séquestré dans leurs capsides reconstituées, dans des cellules (Oppenheim *et al.*, 1986 ; Kosturko et Vanech, 1987 ; Shapiro *et al.*, 1986). Une autre famille, est aussi très performante en raison de la propriété que les rétrovirus ont de s'intégrer dans le génome des cellules qu'ils infectent. Cette propriété est exploitée lors de la construction de vecteurs rétroviraux. Chez les gallinacés par exemple, leur rétrovirus recombiné a permis de réaliser les premières transformations de lignées germinales (Briskin *et al.*, 1991), que l'on peut obtenir à présent par introduction de cellules blastodermiques préalablement lipotransfectées dans des embryons (Brazolot *et al.*, 1991). Si l'utilisation de rétrovirus offre l'avantage de provoquer des événements d'intégration de copie unique, la taille du segment exogène pouvant être intégré est limité (Jaenish, 1988). Les virus Adéno-Associés (AAVs) possèdent également la propriété de s'intégrer dans le génome des cellules humaines (Carter *et al.*, 1990). Cette propriété a été mise à profit pour la construction de vecteurs d'intégration et son exploitation en thérapie génique humaine fait l'objet de recherches intenses (Dixit *et al.*, 1991).

La technique récente de transfert de gènes médiée par des **récepteurs membranaires** a été pionnière dans l'étude des processus d'internalisation des récepteurs à la transferrine (Wagner *et al.*, 1990). Cette technique, applicable pour introduire de façon ciblée de l'ADN dans des cellules différenciées, ne peut cependant s'employer qu'à titre thérapeutique dans la mesure où l'ADN introduit ne peut généralement pas se propager de façon stable.

Combinaisons de vecteurs

La recherche d'une augmentation des taux de transfection a parfois conduit à combiner l'application de techniques physiques, chimiques et biologiques. C'est le cas par exemple de spermatozoïdes associés à la lipofection (Bachiller *et al.*, 1991 ; Rottmann *et al.*, 1992), ou associés à de l'électroporation (Gagné *et al.*, 1991 ; Müller *et al.*, 1992). De même, l'emploi de liposomes a été couplé à l'électroporation (Machy *et al.*, 1988) ou l'injection comme dans les vacuoles de tabac, de maïs, de carotte et de riz (Lucas *et al.*, 1990). Des agents fusionnants ont aussi été utilisés simultanément sur des protoplastes avec des chocs thermiques ou de l'électroporation (Sporlein et Koop, 1991). Enfin, le couplage du vecteur *Agrobacterium* avec le bombardement de particules a permis d'obtenir de significatifs taux de transformation chez *Nicotiana* et *Helianthus* (Bidney *et al.*, 1992)

Malgré la disponibilité des multiples méthodes précédemment décrites, l'introduction d'ADN étranger représente encore un réel obstacle pour certains systèmes expérimentaux. La transformation des ligneux et des monocotylédones par exemple s'avère toujours difficile car d'une part la régénération de plantules y est extrêmement rare et d'autre part, ils ne sont pas permissifs à *Agrobacterium*. A l'opposé, pour les autres systèmes biologiques dans lesquels de l'ADN a pu être introduit, son intégration stable dans des cellules capables de

régénérer un organisme a amorcé depuis une dizaine d'années l'exploration des grands domaines de la biologie sous une nouvelle facette.

QUELS INTERETS PRESENTE LA TRANSGENESE AUJOURD'HUI ?

En se limitant à présent aux eucaryotes supérieurs, chez qui de nombreuses transformations d'organismes sont déjà publiées, on s'aperçoit que tous les grands domaines de la biologie y ont puisé un nouveau souffle de recherche tant au plan fondamental avec l'étude de la régulation de l'expression des gènes qu'au plan appliqué comme la recherche médicale et pharmaceutique, l'amélioration des espèces et les applications en biotechnologie.

Etude fondamentale de la régulation de l'expression génétique par la transgénèse

Bien avant la création du premier organisme eucaryote transgénique, il était évident que trois facteurs sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes : (1) des éléments, situés à l'intérieur et/ou de part et d'autre du gène et agissant en cis qui doivent être présents pour initier la transcription, (2) des facteurs agissant en trans qui doivent être présents pour stimuler l'activité du gène et (3) le site chromosomal d'intégration doit influencer la capacité du gène à fonctionner. Les animaux transgéniques, avec essentiellement la souris transgénique, ont permis de préciser les importances relatives de ces trois facteurs sur le déterminisme de la spécificité tissulaire, la chronologie du développement ainsi que le taux et la régulation de l'expression des gènes (Rusconi, 1991).

Les premières identifications de séquences, jouant un rôle dans l'expression génétique, ont correspondu à l'expression d'une construction génétique injectée chez la souris, comprenant le promoteur murin du gène de la métallothionéine (Palmiter *et al.*, 1982). L'expression de ce gène fut inductible par l'adjonction de métaux lourds dans le breuvage des souris ou par l'administration de corticostéroïdes et fut extrêmement active dans les tissus synthétisant normalement la métallothionéine : le foie et les reins. Ainsi, à partir de cette expérience, de très nombreuses autres régions promotrices de gènes furent caractérisées tant chez la souris et les mammifères d'élevage que chez les plantes, les Vertébrés inférieurs et des Invertébrés. Des promoteurs inductibles par des signaux endogènes (hormone) ou environnementaux (stress), particulièrement utiles dans le contrôle de l'expression de gènes, ont été en effet caractérisés et étudiés chez les bovins (Rexroad *et al.*, 1990), les caprins (Roschlau, 1991), les ovins (Nancarrow *et al.*, 1991), les Poissons (Zhang *et al.*, 1990 ; Dunham *et al.*, 1987 ; Chourrout *et al.*, 1986), les Insectes (Rancourt *et al.*, 1987 ; Mathi *et al.*, 1991) ou les plantes (Owens et Smigocki, 1989 ; Schoffl *et al.*, 1989). Outre la capacité de diriger la transcription et l'expression dans un tissu donné, ces types de

promoteurs apparaissent aussi diriger ces processus au cours du développement aussi bien embryonnaire que post-embryonnaire.

Une autre approche de dissection des événements moléculaires impliqués dans le développement fut de soustraire les cellules filles d'une cellule mère par introduction dans un oeuf fécondé d'un gène cytotoxique sous le contrôle de séquences promotrices spécifiques du type cellulaire à détruire (Bernstein et Breitman, 1989). C'est la technique dite de l'ablation génétique qui a permis de connaître le devenir exact et le rôle d'une cellule donnée et donc de répondre à des questions fondamentales sur la biologie moléculaire et cellulaire du développement. Ainsi, les gènes des sous unités A de la toxine diphtérique, de la lectine du ricin et de la thymidine kinase virale ont été utilisés pour étudier les facteurs impliqués dans le développement d'organe comme le pancréas, le foie, le thymus, la moelle épinière, le coeur, les reins ou le cortex cérébral chez la souris.

Recherche médicale et modélisation de maladies génétiques au travers d'animaux transgéniques

Les organismes transgéniques constituent des modèles physio-pathologiques d'étude de maladies humaines (Hooper, 1990). Chez les animaux présentant des gènes fortement homologues à des gènes humains, l'intérêt médical de lignées porteuses de lésions de l'ADN est en effet immense. Ces lignées permettent désormais d'aborder une expérimentation physio-pathologique et thérapeutique totalement affranchie des limites liées à l'expérimentation chez l'homme.

Oncogenèse et cancérologie

Depuis leur découverte en 1976, les proto-oncogènes cellulaires et leurs correspondants ont été impliqués dans la multiplication et la différenciation cellulaire ainsi que dans les phénomènes tumoraux (Stéhelin *et al.*, 1976). La voie la plus directe pour étudier le rôle de ces gènes dans le processus de tumorigénèse a consisté à les introduire dans des cellules normales et à analyser ensuite l'évolution de ces cellules en culture ou après implantation dans un organisme. Cette stratégie a permis d'établir que plusieurs modifications génétiques, le plus souvent dans des proto-oncogènes différents, sont nécessaires pour qu'une cellule devienne cancéreuse (Stéhelin, 1988). Une telle coopération de plusieurs oncogènes dans le processus de transformation cellulaire a surtout pu être étudiée à l'échelle de cellules en culture ou *in vivo* par l'utilisation de vecteurs biologiques, notamment les rétrovirus. La réalisation d'animaux transgéniques exprimant un oncogène a offert des moyens d'étude des conséquences de cette expression sur le phénotype cellulaire des tissus de l'animal (Berns *et al.*, 1989). Le modèle transgénique est donc précieux non seulement pour analyser les

processus de cancérogenèse ciblée vers un tissu particulier mais aussi les effets d'oncogènes au cours du développement. Le croisement d'animaux transgéniques, porteurs de séquences différentes, a permis d'analyser les interactions génétiques entre ces séquences oncogéniques exogènes (Sinn *et al.*, 1987).

Il résulte de ces travaux, à l'échelle de l'organisme, que (1) l'efficacité transformante d'un oncogène est variable selon les tissus, (2) les néoplasies n'apparaissent que chez les adultes et souvent à la suite de circonstances particulières. Ce dernier point suggérant ainsi que l'expression du transgène n'est qu'un événement primaire dans le développement de tumeurs. A ce titre, la transgénèse constitue donc à l'heure actuelle en oncologie un outil prometteur pour l'analyse des événements génétiques intervenant aux diverses étapes de la cancérisation ainsi qu'un outil de mise en évidence de marqueurs spécifiques des cellules tumorales pour cibler l'action de médicaments amenés à détruire spécifiquement les cellules cancéreuses. La possibilité, enfin, d'introduire des mutations ciblées par recombinaison homologue dans divers proto-oncogènes, constitue le moyen d'identifier la cascade d'événements génétiques nécessaires au développement d'une tumeur néoplasique.

Un autre intérêt de la transgénèse en oncologie est lié, indirectement, à la capacité des oncogènes à induire l'immortalisation et donc la prolifération cellulaire. Les lignées cellulaires établies sont très souvent isolées à partir de tissus tumoraux ou bien transformés *ex vivo* (Kelekar et Cole, 1987 ; Roberson et Walker, 1988). La transformation de cellules normales va du traitement par des mutagènes, à l'infection par des virus oncogènes et à l'immortalisation par des constructions génétiques contenant des oncogènes. Un obstacle majeur reste cependant la faible efficacité des procédures de transformation et une minorité seulement des cellules est véritablement soumise à la stimulation proliférative conduisant à des clones. L'établissement de lignées cellulaires à partir d'animaux transgéniques a permis de pallier à cette difficulté (Kahn et Briand, 1991 ; Rassoulzadegan *et al.*, 1991 ; Cartier *et al.*, 1991) et permet de tenter des mises en culture à différents stades de la tumorigénèse *in vivo*.

Autres maladies génétiques

Grâce à la création de souris transgéniques soit par surexpression d'une protéine mutante soit par recombinaison homologue, il est possible d'obtenir des modèles de maladies humaines (anémie falciforme, maladies neurologiques, maladies du système immunitaire...) suite à une modification pathologique stable dans un gène endogène (Connelly *et al.*, 1989 ; Cuthbertson et Klintworth, 1988 ; Jaenisch, 1988). Les résultats acquis dans ce domaine particulier d'application de la transgénèse, bien que d'une importance considérable pour la santé humaine, ne sont pas extrapolables au domaine des Invertébrés marins.

Amélioration d'organismes d'élevage ou de culture par transfert de gènes

Il faut bien avouer que les efforts d'amélioration des espèces le sont exclusivement pour l'homme, pour sa santé, son alimentation, son bien-être et son enrichissement mais au détriment d'une diversité d'espèces et de patrimoines génétiques qui s'amenuisent jour après jour. Le transfert de gènes est l'outil d'amélioration le plus récent qui soit utilisé en complément des techniques plus classiques de gestion des productions animales et végétales comme l'alimentation, l'hygiène, le contrôle de la reproduction, la sélection génétique ou la vaccination. Cette technique autorise désormais ce qu'aucune autre technique maîtrisée par l'homme n'avait permis jusqu'alors: le transfert de gènes d'une espèce à une autre, d'un genre à un autre, d'un phylum à un autre, d'un règne à un autre. Les améliorations par transgénèse touchent à l'augmentation quantitative et qualitative des productions que ce soit par une limitation des pertes dues à des maladies ou par une stimulation de fonctions physiologiques convoitées. Un autre type d'amélioration est l'utilisation des animaux et des plantes transgéniques non plus pour eux-mêmes mais pour leur capacité à produire certaines substances d'intérêt clinique ou vétérinaire.

La transgénèse comme outil de lutte contre des maladies non génétiques

Les méthodes déjà classiques de prévention des pertes en élevage et en agriculture, reposent d'une part sur l'utilisation d'organismes dépourvus de pathogène ou bien qui y résistent naturellement, et d'autre part sur l'application de schémas d'éradication ou sur la prévention de la prolifération par une optimisation des pratiques de culture ou d'élevage comme la destruction d'une partie des vecteurs. Parmi les stratégies de lutte développées contre les maladies chez les plantes et les animaux domestiqués, les plus récentes font appel au transfert de gènes par le développement de souches ou de variétés résistantes aux maladies (Jaynes *et al.*, 1987 ; Grumet, 1990) ainsi que par le développement de mauvais vecteurs de ces maladies lorsqu'ils existent et qu'ils sont connus (Baulcombe, 1989 ; Miller, 1989 ; Fallon, 1991 ; Crampton *et al.*, 1990).

Concernant ces résistances à la maladie, celles-ci peuvent s'obtenir de différentes manières chez l'hôte. Elles peuvent en effet se développer à la transmission (résistance aux vecteurs, résistance à la transmission verticale, résistance à la préférence des vecteurs), à l'établissement de la maladie (prévention de la réplication du pathogène, prévention de la prolifération cellule à cellule, localisation de l'infection), et au développement des symptômes de la maladie (tolérance à la maladie). Tous ces niveaux de contrôle sont accessibles à la transformation génétique en introduisant chez l'hôte soit des gènes étrangers au pathogène ou à son vecteur (Van Der Krol *et al.*, 1988b ; Van Der Krol *et al.*, 1988c ; Green *et al.*, 1986 ; Marcus-Sekura, 1988 ; Takayama et Inouye 1990 ; annexe 5), et qui les combattent, soit

des gènes ou des séquences issus du pathogène lui-même (Grumet *et al.*, 1987 ; Sandford et Johnston, 1985 ; Grumet *et al.*, 1987 ; Staeheli, 1991 ; Hughes *et al.*, 1990 ; Szybalski, 1991 ; annexe 5) soit encore des séquences qui modulent l'expression de gènes clefs chez le vecteur (Szybalski, 1991 ; Miller, 1989 ; annexe 5).

Modifications physiologiques

Contrairement aux gènes de résistance de maladies dont l'expression ne perturbe pas, *a priori*, pas de manière importante la physiologie des animaux tout en modifiant efficacement leurs caractéristiques phénotypiques, l'expression de gènes codant pour des molécules à rôle physiologique important comme les hormones, modifie le plus souvent la vie de l'animal ou de la plante. Néanmoins, de nombreux travaux, consignés en annexe 5, impliquant le transfert de gènes de facteurs de croissance ou de facteurs jouant sur la synthèse d'hormones sont en cours chez la chèvre (Roschlau, 1991), le porc (Pursel *et al.*, 1990), la volaille (Hughes *et al.*, 1990), la vache (Land, 1989 ; Pursel *et al.*, 1989 ; Houdebine, 1991), le mouton (Rexroad *et al.*, 1991), ainsi que chez les Poissons (McLean et Penman, 1990, Houdebine et Chourrout, 1991) ou les plantes (Owens et Smigocki, 1989). D'autres physiologies font par ailleurs l'objet d'investigations au travers de la transgénèse comme la résistance au froid (Fawzy *et al.*, 1990 ; Patterson, 1988), le mûrissement des fruits et des légumes (Grierson *et al.*, 1989 ; Osteryoung *et al.*, 1990 ; Smith *et al.*, 1990), la pigmentation des fleurs (Mol *et al.*, 1989), la tolérance à des herbicides (Fillati *et al.*, 1987 ; Eichholtz *et al.*, 1987) ou à d'autres agents toxiques (Misra et Gedamu, 1989 Aono *et al.*, 1991), le stockage de protéines (Lawton *et al.*, 1987 ; Voelker *et al.*, 1990), la photosynthèse (Stocknaus *et al.*, 1990) ou la pousse de la laine chez les moutons (Spencer et Higgins, comm. pers.). Dans ce dernier cas, c'est l'aliment génétiquement modifié, en l'occurrence de la luzerne surproductrice d'albumine riche en cystéine, qui intervient au niveau du métabolisme de la synthèse de la kératine chez l'animal.

Applications en biotechnologie

Des animaux transgéniques ont enfin déjà contribué à remplacer certains bioréacteurs en produisant dans leur lait ou leur sang des substances d'intérêt pharmaceutique ou thérapeutique comme la β -lactoglobuline et la β -caséine (Wilmot *et al.*, 1991), des protéines humaines plasmatiques: l'interleukine-2 (Buhler, 1990), le facteur IX antihémophilique (Clark *et al.*, 1989), l' α 1 antitrypsine (Massoud *et al.*, 1991). De même, les plantes sont de plus en plus amenées à contribuer à la synthèse de tels produits d'intérêt thérapeutique et diagnostique comme des anticorps monoclonaux fonctionnels (Hiatt, 1990 ; Hiatt *et al.*,

1989), de l'albumine sérique humaine ainsi que des substances variées intervenant dans la cosmétologie, les lubrifiants ou l'industrie alimentaire (Moffat, 1992).

Au terme de ces rappels sur la transformation en génétique, l'analyse du tableau récapitulatif (annexe 5) qui souhaite refléter la grande diversité des applications de la transgénèse aujourd'hui au travers du règne animal et végétal, soulève quelques remarques.

En premier lieu, cette compilation révèle un nombre relativement restreint d'espèces transformées dans chacun des groupes zoologiques considérés avec une espèce prédominante retenue comme modèle. Cette notion d'espèce modèle révèle que la majorité des études sur la transformation génétique sont d'abord fondamentales puis souvent transposées à des systèmes plus complexes dans une perspective thérapeutique et/ou économique. Par ailleurs, le développement des travaux sur des espèces modèles résulte aussi de difficultés d'expérimentation, d'ordre éthique ou technique, sur les espèces cibles.

Par exemple, chez les **Mammifères**, la souris constitue véritablement le modèle pour toute étude touchant à la connaissance et au traitement des maladies humaines. Le modèle murin a été ensuite élargi à d'autres mammifères ainsi qu'à d'autres Vertébrés supérieurs et inférieurs comme les Poissons. Aujourd'hui, l'obtention de souris transgéniques est devenue un procédé de routine. Ainsi, de nombreux laboratoires de recherche sous-traitent l'obtention de souris transgéniques en fournissant à une société de service le construit à intégrer. Ces entreprises, de plus en plus nombreuses aux Etats-Unis, s'engagent à fournir au moins une souris transgénique (sous réserve que son inviabilité ne résulte pas d'une mutagénèse insertionnelle délétère) ou des embryons transgéniques cryoprotégés dans l'azote liquide. Ce développement des services offerts en sous-traitance reflète bien l'ampleur des recherches effectuées grâce à ce modèle depuis la création des désormais célèbres premières souris transgéniques "supermice", exprimant le gène de l'hormone de croissance (Palmiter *et al.*, 1982).

Concernant les **Oiseaux** (annexe 5), les seuls qui fassent l'objet de manipulations génétiques à caractère essentiellement appliqué sont les poulets, les travaux ayant été facilités à l'origine par l'existence d'un vecteur rétroviral spécifique. Chez les Poissons, des espèces comme le *Xiphophorus xiphidium* et l'*Oryzias latipes* constituent les espèces modèles mais plusieurs équipes travaillent sur des espèces d'intérêt économique comme la carpe, le saumon ou la truite avec des objectifs divers (Zhang *et al.*, 1990 ; Fletcher *et al.*, 1988 ; Chourrout *et al.*, 1986).

Des recherches, menées sur l'**Amphibien** *Xenopus sp.* et, les **Echinodermes** et **Nématodes**, respectivement *Strongylocentrotus purpuratus* et *Coenorhabditis elegans*, présentent un caractère exclusivement fondamental sur les bases moléculaires du développement (annexe 5).

Au sein des *Arthropodes*, le genre *Drosophila* représente un modèle extraordinairement bien étudié. La génétique moléculaire animale repose, en effet, largement sur ce genre d'Insecte (Walker, 1988). Plus récemment, de nouveaux modèles ont été établis chez des moustiques, la transformation génétique étant alors considérée comme une voie de contrôle de la transmission de parasites et de virus, à l'instar des résultats acquis chez les plantes.

Chez les *Plantes*, le tabac *Nicotiana tabacum* constitue l'organisme modèle incontournable lorsqu'il s'agit de développer la majorité des études préliminaires de transfert de gènes chez des plantes. Chez les autres espèces végétales, les recherches sont souvent encore au stade de la maîtrise méthodologique de leur transformation par l'une des nombreuses techniques déjà applicables (Potrykus, 1991 ; annexe 4).

De façon similaire à ce qui se fait chez les Insectes vecteurs et chez les plantes, la transformation génétique chez les *Crustacés* est abordée prioritairement en tant que stratégie moléculaire de contrôle de leurs agents pathogènes. Ce nouvel axe de recherche, initié dans le cadre du présent travail, nécessite le développement d'études dans plusieurs domaines de la biologie et de la génétique des crevettes que ce soit au niveau des populations, à l'échelle cellulaire ou moléculaire.

ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES DISPONIBLES ET UTILES CHEZ LES CRUSTACES POUR LEUR TRANSFORMATION GENETIQUE

Mode de reproduction et manipulation des gamètes

La création d'individus transgéniques nécessite la maîtrise d'une technique d'introduction d'ADN dans les stades embryonnaires les plus précoces ou dans les cellules germinales. C'est pourquoi la connaissance du mode de reproduction et la possibilité de la contrôler artificiellement sont importantes.

Chez les pénéides, la fertilisation est externe avec la ponte d'ovocytes démersaux qui s'opère de façon synchrone avec l'émission de sperme hors du spermatophore porté par la femelle. Les appareils génitaux des différentes espèces de pénéides sont similaires à l'exception du réceptacle des spermatophores chez les femelles (thélycum). Cet organe sexuel externe, situé entre la 5ème paire de péréiopodes est de deux types différents selon les espèces. Si cette structure est rigide (plaque antérieure et deux latérales), le thélycum est dit fermé et les spermatophores peuvent y être injectés par le mâle ou bien il est dit ouvert (simple série de sculptures) et l'adhésion des spermatophores y est très faible. Cette différence morphologique entraîne l'altération des performances reproductives (taux de fécondation très bas) notamment chez *P. vannamei* et *P. stylirostris*. Peu après la fécondation, la réaction corticale se produit (Clark *et al.*, 1973) et l'embryon se divise rapidement pour conduire à l'éclosion d'une jeune larve nauplius en général 14 h après la

ponte (Liao et Huang, 1973). Dans de bonnes conditions d'élevage, la durée du développement jusqu'à un stade mature est de 6 mois environ, ponctué par les mûes. Concernant la manipulation des gamètes, quelques résultats ont été acquis que ce soit pour réaliser des hybridations (Dobkin, 1961), des cryopréservations (Anchordoguy *et al.*, 1988 ; Baust et Lawrence, 1980, Picaud et Goudet, 1986 ; Dumont, com. pers) ou des stimulations hormonales d'ovocytes *in vitro* (Tsukimura et Kamemoto, 1991). La fécondation *in vitro* n'est rapportée que chez *P. aztecus* (Clark *et al.*, 1973) et n'est pas encore maîtrisée pour les autres espèces. Il faut noter que cette non maîtrise de l'instant précis de la fécondation représente une contrainte pour l'obtention régulière de stades très précoces dans la perspective de les transformer génétiquement.

Caractérisation du génome

Des données sont disponibles sur l'organisation du génome des Crustacés. Le nombre de chromosomes est connu chez de nombreuses espèces au travers de caryotypes (Hayashi et Fujiwara, 1988 ; Chow *et al.*, 1990 ; Gallardo et Castro, 1987) ainsi que leur caractérisation par "banding" (Abatzopoulos *et al.*, 1986). Des mesures en cytométrie ont permis par ailleurs d'évaluer la taille des différents génomes de *Penaeus* (Chow *et al.*, 1990) ainsi que des endoploïdies chez l'*Artemia* (Freeman et Chronister, 1988) et *Daphnia* (Beaton et Hebert, 1989). Enfin, des répétitions dans l'ADN ont été mises en évidence chez l'écrevisse (Fuchs *et al.*, 1990), le crabe hermite et l'*Artemia* (Renart *et al.*, 1989 ; Cruces *et al.*, 1982 ; Cruces *et al.*, 1989 ; Gallego *et al.*, 1986 ; Benfante *et al.*, 1989 ; Nelles *et al.*, 1984).

Gènes Identifiés

La majorité des séquences d'acides nucléiques présentes dans la banque de données d'acides nucléiques EMBL qui correspondent au mot clef : Crustacea (annexe 6), est issue du genre *Artemia*. Hormis une unique séquence ribosomique de *Penaeus aztecus*, aucun gène de pénéide n'est actuellement séquencé, cloné ni même identifié. Il s'avère donc urgent de caractériser des gènes en recherchant notamment en priorité des promoteurs qui possèdent des caractéristiques nécessaires au contrôle de l'expression de gènes étrangers.

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL BIOLOGIQUE

Les animaux utilisés au cours des expérimentations appartiennent à deux classes différentes du phylum des Crustacés : le genre *Artemia* (espèce *franciscana*) de la classe des Entomostracés et le genre *Penaeus* (espèces *indicus*, *monodon* et *japonicus*) de la classe des Malacostracés (annexe 7).

1.1. Les Artémies

Déchoriation des cystes

Les cystes utilisés sont commercialisés par San Francisco Bay Brand (Stock n°36494). Le protocole de décapsulation est inspiré de celui établi par Sorgeloos *et al.* (1977). Les cystes (1 gramme soit 2 à $4 \cdot 10^5$ individus) sont réhydratés dans de l'eau distillée pendant une heure. Ils sont ensuite mis à incuber pendant 30 minutes dans une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium 48° chlore (66 ml/l) et de soude (1,33 g/l). Lorsque la couleur des cystes passe du marron à l'orange, les cystes sont recueillis sur un tamis (125 μm), abondamment rincés avec de l'eau de mer et conservés jusqu'à l'éclosion (20 h plus tard).

Eclosion et élevage

Les cystes décapsulés sont placés en éclairage permanent dans un litre d'eau de mer stérilisée par passage sur un tube UV germicide (puissance 40W pour un débit de 2 m³/h). A 28°C, l'éclosion survient 20 à 24 heures environ après la décapsulation.

Le 3^{ème} jour, les nauplii nageurs sont rassemblés par phototropisme positif et transférés dans un aquarium de 1 litre. Le 6^{ème} jour, la densité de l'élevage est réduite à 500 individus par litre. Jusqu'au 8^{ème} jour où la salinité est maintenue à 3 ‰, des microalgues sont journalièrement distribuées (*Tetraselmis suecica* et *Chaetoceros calcitrans*). Au 9^{ème} jour, la salinité est artificiellement élevée par addition de sel de mer du commerce. De la levure de boulangerie, préalablement conditionnée en granulés et conservée au congélateur (-80°C), est distribuée à raison de 500 mg/litre/48 heures.

Un sexage visuel et un tri manuel sont réalisés le 10^{ème} jour grâce au dimorphisme sexuel visible à l'oeil nu (Criel, 1980). Cent juvéniles de chaque sexe sont placés dans deux compartiments d'un aquarium (1 litre) séparés par une toile de nylon dont la maille est de 250 μm .

Le 14^{ème} jour, les juvéniles sont répartis à raison de 50 par litre et conservés dans les conditions suivantes :

- salinité 8 ‰
- éclairage en permanence
- température 18°C
- oxygène à saturation
- nourriture : microalgues *Isochrysis galbana* (clône Tahiti)

Le 10^{ème} jour, la salinité est montée à 10 ‰.

Entre le 28^{ème} et le 30^{ème} jour, des couples d'animaux matures sont isolés pendant 1 à 3 heures pour l'accouplement et les femelles fécondées sont alors prélevées. L'examen à la loupe binoculaire permet d'identifier des femelles dont les oeufs ont migré de l'oviducte vers l'ovisac et ne sont pas encore segmentés. De telles femelles sont disséquées afin de prélever ces embryons.

1.2. Les Pénéides

Origine et maintien des crevettes adultes

Des adultes de *P. japonicus* ont été obtenus à la ferme aquacole "Les Poissons du soleil" (Balaruc les Bains / île d'Oléron) et maintenues au laboratoire. Les *P. indicus* ont été maturées et induites à pondre dans des installations situées à IFREMER Brest et Tahiti. Quelques adultes ont été maintenus au laboratoire IFREMER de La Tremblade comme source d'ADN génomique et d'hémolymphe. Des individus adultes de *P. monodon* ont été maturés et fécondés à Tahiti. L'ADN génomique de *P. monodon* a été extrait d'adultes sains envoyés sous carboglace par une ferme aquacole du Sri Lanka.

Le maintien des crevettes au laboratoire s'est effectué dans des bacs rectangulaires (1 m x 2 m) équipés d'un filtre biologique. Ce dernier est constitué d'une couche (épaisseur 10 cm) de maerl déposé sur un tamis recouvrant une plaque de PVC à multiple trous (diamètre 1 cm) et placée à 10 cm du fond du bac. Six "airlift" par bac traversent le maerl et engendrent l'aération de l'eau et sa percolation au travers du filtre. La température de l'eau ainsi recyclée est maintenue par thermoplongeur respectivement à 22°C et à 18°C pour les espèces *indicus* et *japonicus*. Dix adultes par bac reçoivent journalièrement 20 grammes d'aliments du commerce (Aqualim) et chaque soir 5 moules ouvertes (vivantes ou décongelées).

Ponte et collecte des oeufs

Les *P. indicus* adultes ont été maturées conformément aux méthodes de reproduction des pénéides en milieu tropical (Aquacop, 1983) avec un conditionnement en photopériode inversée (obscurité de 6h à 18h) afin d'obtenir les pontes dans la matinée. Lorsque le stock

d'animaux a été bien adapté à la nouvelle photopériode, des pontes ont été obtenues de façon synchrone (± 10 min) et régulière d'un jour sur l'autre. Environ une heure avant l'heure prévue des pontes, les femelles *P. indicus* matures et prêtes à pondre ont été placées individuellement dans l'obscurité dans des bacs de 30 litres avec un faible renouvellement de l'eau (28°C). Au moment de la ponte, le renouvellement de l'eau est arrêté pendant 8 minutes. Les oeufs ont été ensuite récoltés lentement sur un tamis de maille 150 μm .

Les femelles de *P. monodon*, plus grosses que celles de *P. indicus*, ont été placées dans les mêmes conditions hormis la taille des bacs qui est de 100 litres.

Culture des oeufs et développement embryonnaire précoce

Après la récolte, les oeufs ont été débarrassés de leur gelée corticale pour être microinjectés, puis mis en culture dans des petits tamis (maille 100 μm) flottant en eau courante (28°C).

2. TECHNIQUES DE CULTURES CELLULAIRES

2.1. Cellules d'Insectes

Deux lignées d'Insectes (références ATCC) ont été utilisées. L'une de *Drosophila melanogaster* et l'autre de *Spodoptera frugiperda* (clone Sf9) fournies par le Pr Devauchelle (INRA/CNRS, St Christol-lez-Alès).

Les cellules de drosophile ont été cultivées en milieu Schneider (annexe 8) en fioles (NUNC) de 25 cm² et repiquées lorsque la confluence atteint environ 80 %. Les cellules du papillon *Spodoptera* ont été cultivées en suspension en milieu TC-100 (annexe 8) en fioles ou en ballon de culture et entretenues par dilutions périodiques.

2.2. Cellules de Crustacés

Les prélèvements d'hémolymphe chez *Penaeus japonicus* ont été effectués dorsalement entre le céphalothorax et le premier segment abdominal à l'aide d'une aiguille (26GX $\frac{1}{2}$ ") montée sur une seringue adaptable sur une pipette automatique à déplacements positifs de type Combitip Eppendorf. L'hémolymphe a été instantanément diluée (1/3) dans de la solution isotonique d'Alsever (annexe 8). Après dénombrement des hémocytes à la cellule de Malassez, des aliquotes ont été réparties en plaque Nunc (Cat. n° 176740) à raison de 2.10⁵/puits. Le milieu a alors été introduit (Alsever, RPMI 1640, 2X L-15, M199)(annexe 8) avec ou sans sérum de veau foetal (SVF). Les hémocytes ont été maintenus à 18°C et leur

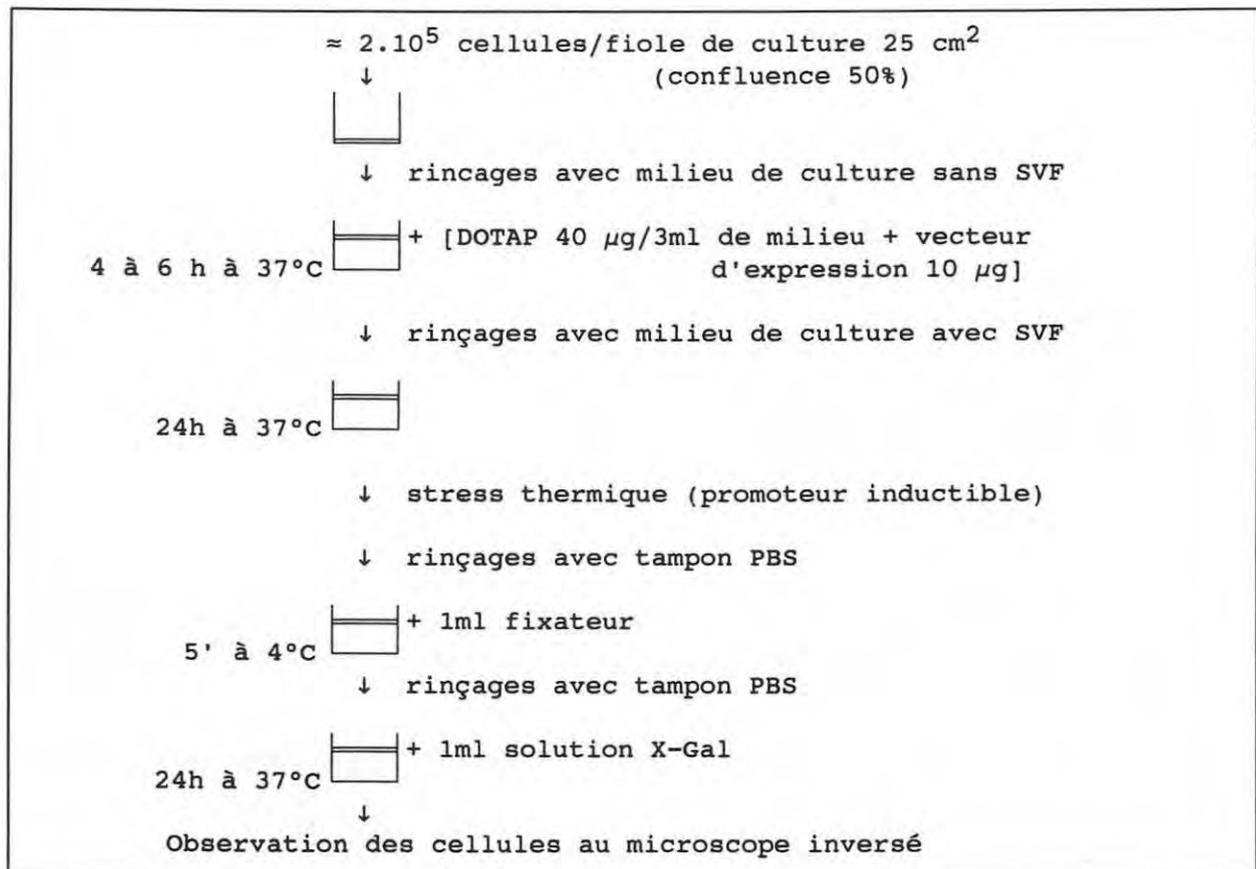


Figure 1 : Protocole général de lipotransfection de cellules cultivées de Mammifères (Felgner et Holm, 1989) et de révélation histochimique de l'activité β -galactosidase (McGrégor et al., 1991).

viabilité a été estimée par coloration au bleu de trypan (annexe 8) après différentes durées de maintien *in vitro*.

2.3. Mesure de viabilité des cellules

Du bleu trypan, préparé à 10X (annexe 8) et filtré (0,22 μm), a été ajouté dans le milieu contenant les cellules de façon à obtenir une dilution à 1X. Ce mélange est mis à incuber pendant 10 min. à la température habituelle de la culture, puis le surnageant est remplacé par du milieu sans bleu trypan et l'observation se fait au microscope inversé.

2.4. Lipotransfection

La méthode d'application des liposomes (DOTAP, Boehringer) a été celle prescrite par le fournisseur. Le protocole de base à partir duquel les valeurs des paramètres ont été adaptées aux Crustacés est présenté en figure 1.

3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

3.1. Extractions d'ADN

3.1.1. ADN génomique de cellules d'*Insectes*

Deux protocoles d'extraction d'ADN génomique ont été utilisés. Le premier protocole est celui décrit par Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989). Le deuxième type d'extraction a été réalisé avec le kit "DNA extraction" (Stratagene) selon les indications fournies.

3.1.2. ADN génomique de *Crustacés*

L'extraction d'ADN d'artémies a été faite selon le protocole de Cruces *et al.* (1981), à partir de nauplii un jour après l'éclosion.

L'ADN de crevettes a été extrait, à défaut de cellules à très fort rapport nucléocytoplasmique comme les spermatozoïdes, de différents tissus de crevettes adultes: l'hépatopancréas, les hémocytes et les branchies. Le protocole d'extraction dérivé de celui de Jeanpierre (1987) est basé sur deux digestions successives par la protéinase K (10 mg/ml de solution d'extraction III – annexe 8–, 3 h, 60°C en présence de sarkosyl 10 %) du tissu broyé (potter). Après une double extraction des protéines par un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique puis chloroforme/alcool isoamylique, les acides nucléiques ont été précipités, rincés à l'éthanol 70°C puis séchés. Pour les tissus

hépatopancréatiques uniquement, il a dû être effectué une extraction supplémentaire au CTAB (annexe 8) selon les étapes 9 à 19 du protocole de Rogers et Bendich (1988). Ce détergent est utilisé pour la purification d'ADN de plantes souvent rendue difficile par la présence de contaminants polyphénoliques et de polymères carbohydratés. Ce composé chimique autorise, en effet, une séparation des polysaccharides de l'ADN par solubilité différentielle. Pour les autres tissus, une digestion avec de l'ARNase sans ADNase a été effectuée (10 μ l d'ARNase 10 mg/ml, 3h, 37°C).

3.2. Plasmides

Le plasmide **p_{cras4}**, qui contient un fragment de 702 bp de l'oncogène *ras* issu d'une banque d'ADNc d'*Artemia sp.*, cloné dans le plasmide pUC18, a été fourni par Renart (Madrid).

Le plasmide **pAcrho**, qui contient un fragment de 1 Kpb de l'oncogène *rho* de *Aplysia californica* issu d'une banque d'ADNc, cloné dans le plasmide pSP62, a été fourni par Madaule (Institut Pasteur, Paris).

Les plasmides, **pTK- β** (promoteur de thymidine kinase du virus HSV), **pCMV- β** (promoteur très précoce du cytomégalovirus humain), **pSV40- β** (promoteur précoce du virus SV40), et **pAd- β** (promoteur tardif de l'adénovirus), qui contrôlent le gène rapporteur *lac-Z* d'*E. coli*, ont été fournis par MacGregor (McGregor et Caskey, 1989).

Le plasmide **pA3- β** , qui contient le promoteur de l'actine 3 cytoplasmique du ver à soie de *Bombyx mori* lié au *lac-Z*, a été fourni par Mounier (Mounier *et al.*, 1991).

Le plasmide contenant le promoteur d'actine de drosophile (**ActIn-droso β**) a été fourni par Couderc (Université de Clermont-Ferrand I).

Les plasmides **Dr-lac** et **Dr-luc** (Nguyen *et al.*, 1988) qui contiennent le promoteur de la protéine de choc thermique hsp70 de la drosophile contrôlant les gènes rapporteurs *lac-Z* et luciférase ont été fournis par Bensaude (Laboratoire de biologie moléculaire du stress, Institut Pasteur Paris).

Le plasmide **pE1- β** contenant un promoteur très précoce du baculovirus d'insecte AcNPV, a été fourni par Persillon (INRA, St Christol-lez-Alès).

Le plasmide **pMW103**, renfermant une fraction de l'ADN répété d'*Artemia* a été fourni par Renart (Madrid).

Les cartes physiques des vecteurs d'expression des gènes *lac-Z* et *luc* utilisés sont rassemblées en annexe 9.

3.2.1. Méthode de détection de l'activité galactosidase

Le produit d'expression du gène *lac-Z* a été recherché *in situ* par la méthode histochimique décrite par McGregor (1991).

3.2.2. Méthode de détection de l'activité luciférase

L'analyse de l'activité luciférase a été entreprise en luminométrie deux heures après la fin des stress thermiques. La détection a été effectuée à l'aide du kit Promega (E1500) selon le protocole fourni. Les larves nauplii ont été transférées du papier imbibé, sur lequel elles avaient été bombardées, dans un microtube avec 1 ml d'eau de mer reconstituée avec antibiotiques. Les tubes ont été rapidement refroidis dans de la carboglace et les larves immobilisées ont été centrifugées (12000 rpm, microfuge Beckman, 2 min, 4°C) puis le culot a été rincé et recentrifugé dans les mêmes conditions dans du tampon de lyse (annexe 8). Le culot de larves a ensuite été repris dans 50 µl de tampon de lyse puis transféré et broyé dans un potter. Le broyat, transféré dans un microtube, a été centrifugé (12000 rpm, 3 min) et une aliquote du surnageant (20 µl) a été mise en présence de 100 µl de luciférine dans une cuve de luminométrie. Les comptages de photons ont été faits sur un luminomètre LKB (type Wallac 1251) avec une durée de mesure de 5 sec par échantillon. Les valeurs d'échantillons témoins (eau distillée, eau de mer reconstituée, tampon de lyse, broyat de lots d'embryons non bombardés) ont été environ de 0,250 mV.

3.2.3. Méthodes d'extraction plasmidique

Trois méthodes d'extraction plasmidique en petite quantité ont été utilisées :

- a. La méthode par ébullition correspond à la "boiling method" décrite par Sambrook *et al.* (1989).
- b. Les colonnes du kit (Quiagen™, Diagen, tip20 à pack 500) contiennent des billes de silice échangeuses d'ions et permettent d'obtenir rapidement (30 min à 2 h), à partir de 3 à 500 ml d'un lysat de bactéries, une qualité de plasmide suffisante pour le séquençage.
- c. La méthode au n-butanol (Sambrook *et al.*, 1989), a été utilisée pour cribler rapidement des colonies bactériennes recombinantes après un clonage.

GELS DE POLYACRYLAMIDE HOMOGENES

	Analyse d'ODN	Séquençage
Acrylamide	39 g	285 g
Bisacrylamide	1 g	15 g
	qsp 100 ml H ₂ O	qsp 1,5 l TBE
filtration sur papier 3 MM		
Gel	12% à 20%	6%
Solution d'acrylamide	10 ml	45 ml
TAE 10X	5 ml	-
TBE 1X	-	105 ml
Chauffage à 37°C	-	10 mn
dégazage ultrasons	-	10 mn
APS 10% (p/v)	240 µl	1250 µl
TEMED	40 µl	97 µl
volume final	50 ml	150 ml

Tableau 2 : Composition des gels d'acrylamide utilisés en électrophorèse d'ADN.

Méthode d'extraction plasmidique en grande quantité

La méthode utilisée a été celle décrite par Sambrook *et al.* (1989) avec quelques modifications. Après centrifugation des bactéries, le culot est dissout dans 3 ml de solution I (annexe 8). Ensuite, sont ajoutés 500 μ l de lysozyme (solution à 10 mg/ml dans du TE, pH 8) et 1 ml EDTA 500 mM, pH 8. Après 15 min. sur la glace, 5 ml de solution II (annexe 8) sont ajoutés. La solution devenue visqueuse est centrifugée à 40000 rpm pendant 1 heure à 4°C (rotor SW 41, Beckman). Le surnageant est ensuite soumis pendant 16 heures à une ultracentrifugation à 20°C (55000 rpm, rotor VTI 65, Beckman). L'ADN, séparé du BEt par de l'isopropanol, est ensuite précipité en ajoutant un volume d'eau et 2 volumes d'isopropanol pur à l'échantillon.

3.3. Electrophorèses d'acides nucléiques

3.3.1. Gel d'agarose

Les fragments d'ADN ont été soumis à des électrophorèses de puissances différentes dans des gels adaptés à leur taille selon les protocoles décrits par Sambrook *et al.* (1989).

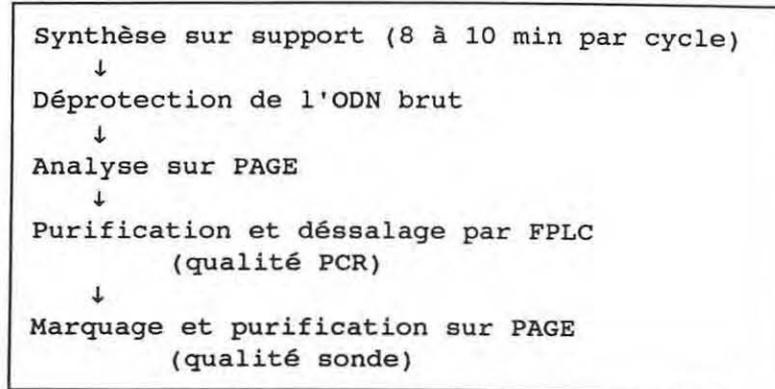
3.3.2. Gel de polyacrylamide

Les gels de séquençage des plasmides recombinants ou d'analyse des ODN synthétisés au laboratoire ont été réalisés à différents pourcentages d'acrylamide/bisacrylamide (tableau 2). Les migrations ont été effectuées dans une cuve BRL et les électrophorèses ont été conduites à 60 Watts (\approx 1600 Volts) dans du tampon TBE (annexe 8).

Au terme de l'électrophorèse des ODN, le gel est enroulé puis déroulé sur du film plastique, placé sur des plaques fines de chromatographie en couches minces (Schleicher et Schuell, réf.F1500/LS 254nm) et exposé aux rayons d'un transilluminateur UV254nm. Les ODN apparaissent en noir et leur trace est reportée au feutre sur le film. Concernant les gels de séquençage, deux traitements différents du gel ont été réalisés selon que la réaction de séquençage a été réalisée avec ou sans déoxynucléotide radioactif (cf Matériel & Méthodes 3.8. Séquençage). Les gels radioactifs ont été fixés dans un bain d'acide acétique 10 %, méthanol 10 %, pendant 30 min puis séchés sous vide à 80°C pendant 1 heure et autoradiographiés en présence d'un film sensible aux rayons X. Par contre, les gels non radioactifs ont été mis en contact avec une membrane Immobilon-S (Millipore) pour transférer les fragments nucléiques par capillarité.

3.4. Oligodéoxynucléotides

Le schéma opératoire d'obtention d'oligodéoxynucléotides (ODNs) pour la synthèse d'amorces de PCR ou d'ODN marqués est le suivant :



3.4.1. Synthèse

Les ODNs utilisés comme amorce en PCR ou dans les travaux préliminaires de transfection de cellules de Crustacés, ont été synthétisés sur un cyclone 2 colonnes (Milligène) selon les protocoles du fournisseur. Cette machine utilise la plus récente des chimies de synthèse d'ADN : les réactifs β -cyanoéthyl phosphoramidites sur support solide. Chaque nucléotide (A,C,G,T) ou un mélange de 2, 3 ou 4 nucléotides ou un nucléotide "joker", l'inosine, est ajouté de façon cyclique sur la colonne support.

Après la synthèse, le dernier groupement protecteur a été soit conservé jusqu'au couplage d'une chaîne aliphatique aminée sur laquelle la rhodamine a été couplée, soit enlevé et l'ODN a alors été utilisé sans couplage pour les amplifications enzymatiques (PCR).

3.4.2. Déprotection et purification

Les billes supportant les ODNs ont été récupérées dans un microtube à capuchon vissant en passant 1 ml d'ammoniac (NH_4OH 33 %) dans la colonne préalablement décapsulée. Les microtubes ont été introduits dans un tube en polystyrène de 10 ml avec bouchon à vis et les ODNs ont ainsi été décrochés des billes et déprotégés par une incubation à 25°C pendant 24 h.

Les ODN ont été purifiés par chromatographie en phase inverse sur des colonnes Oligopack (Millipore).

La quantification a été faite par spectrophotométrie d'absorption (1 unité $A_{260\text{nm}}$ = 33 $\mu\text{g/ml}$).

3.4.3. Marquage

Les étapes du marquage ont été faites manuellement selon les indications fournies par le Dr. Shire (Sanofi Elf Bio Recherches, Toulouse). Après le découplage automatique du dernier groupement DMT, une chaîne aliphatique aminée a été ajoutée en lavant tout d'abord 2 fois le réacteur avec 5 ml de dioxane deshydraté (Riedel-de-Haen) avec une seringue placée à une extrémité. Puis du carboximidazole (Aldrich) a été ajouté au dioxane à 50 mg/ml et ce mélange a été passé 3 à 4 fois en 30 min au travers de la colonne en disposant une seconde seringue de 1 ml à l'autre extrémité de la colonne. La colonne a été lavée avec 20 ml de dioxane. De la même manière, un couplage de l'ODN avec du 1,6 diaminohexane (Aldrich) (40 mg/ml dioxane) a été réalisé pendant 20 min. La colonne a été lavée 2 fois avec 5 ml de dioxane puis 2 fois avec 5 ml de méthanol puis mise à sécher. Les ODN portant les squelettes aminés ont été sortis de la colonne et déprotégés par addition de NH_4OH à 28 % (1 ml) puis mis à incuber pendant 2 h à 70°C dans un microtube à vis. Le réactif Rox (Applied Biosystems) aussi appelé "rouge Texas" est un dérivé de la rhodamine et a été couplé aux bras aminés selon les recommandations du fournisseur. Le fluorochrome non fixé a été éliminé par passage sur une colonne à gel d'adsorption de type NAP 25 (Pharmacia) et les ODN non marqués ont été élués sur des colonnes de chromatographie en phase inverse de type oligopack (Milligen/Biosearch) conformément aux indications de ce fournisseur.

3.5. Amplification enzymatique (PCR)

L'amplification enzymatique par P.C.R. a été réalisée selon le protocole de Webb *et al.* (1990) dans des microtubes de 0,75 ml. Les volumes réactionnels, de 50 μl ont contenu :

* ADN matrice	0,1 à 1 μg
* deux amorces ODN synthétiques	40 pmole de chaque
* MgCl_2	1,5 à 5,5 mM final
* Tampon de réaction PCR 10X	(annexe 8)
* dATP, dCTP, dGTP, dTTP	100 mM de chaque
* Polymérase (Cetus)	2,5 unités
* eau distillée stérile	qsp 50 μl

Ce mélange, rapidement centrifugé, a été recouvert de 2 gouttes d'huile de paraffine et a été soumis à plusieurs cycles d'amplification dans un bain à sec thermostaté à refroidissement hydraulique (modèle PHC-2, Techne).

5 μ l	A.D.N. matrice(*)	
1 μ l	amorce 3'	40 à 100 pmole
1 μ l	amorce 5'	40 à 100 pmole
x μ l	MgCl ₂ 10 mM	1,5 à 5,5 mM (final)
5 μ l	tampon de réaction PCR 10X	Annexe
	H ₂ O distillée stérile	qsp 50 μ l
Cycle 1, étapes 1 et 2 (dénaturation: 92°C, 2 min; hybridation 45°C à 60°C, 2 min)		
1 μ l	dGTP, dATP, dTTP, dCTP	100 mM de chaque
0,5 μ l	Polymérase thermorésistante	2,5 unités
40 μ l	huile de paraffine	2 gouttes
Cycle 1, étape 3 (polymérisation: 70°C, 3 min)		
Cycle 2 à 30 (dénaturation: 92°C, 2 min; hybridation: x °C, 2 min, polymérisation: 70°C, 2 min)		
Cycle 30, dernière étape (élongation des brins inachevés: 70°C, 3 min)		

(*) La matrice a parfois été issue d'une amplification précédente après avoir été récupérée selon le protocole décrit par Carmelann et Beebe (1991)

Figure 2 : Récapitulatif des étapes d'amplification enzymatique.

Chacun des 30 cycles s'est décomposé en 3 étapes :

* dénaturation de l'ADN matrice	2 min à 92°C
* hybridation des amorces	2 min (Température dépendante de la T _m des amorces)
* polymérisation	2 mn à 70°C

Un dernier cycle d'élongation totale des brins néosynthétisés a été réalisé par 3 min (70°C) consécutives à la dernière étape du 30^{ième} cycle. Ces opérations sont résumées dans la figure 2.

A la fin de la réaction, l'huile a été éliminée soit par dissolution dans 100 µl d'étheroxyde ou de chloroforme soit séparée de la partie aqueuse par rétention différentielle de l'huile et de l'eau sur un morceau de parafilm. Une aliquote de la phase aqueuse a ensuite été déposée sur un gel d'agarose standard (1 à 2 %) ou à bas point de fusion (1 %) lorsqu'une séparation ultérieure est réalisée par centrifugation sur membrane Ultra-free (Millipore). Le gel est ensuite soumis à une électrophorèse (4 V/cm ; 1 h) puis coloré au BEt pour analyse des produits d'amplification.

3.6. Clonage

Les protocoles de clonage ont été ceux décrits par Sambrook *et al.* (1989) avec les quelques modifications suivantes.

3.6.1. Préparation des fragments à cloner

L'ADN à cloner a été extrait de l'agarose, soit par élution sur bille de silice (kit GeneClean, Ozyme), soit par élution sur la membrane d'une unité Ultrafree-MC (Millipore) de 0,45µm selon les indications des fournisseurs.

Deux extractions au phénol/ chloroforme-alcool isoamylique ont été ensuite pratiquées sur les volumes d'élution. La phase aqueuse a subi à nouveau une extraction au chloroforme-alcool isoamylique et a été précipitée en présence de glycogène (10 µl, annexe 8), acétate de sodium 3M (1/10^e vol) et d'éthanol absolu (2 vol) pendant une nuit à -20°C. Ensuite, les fragments ont été traités à l'enzyme Klenow (20°C, 1 h).

Après la réaction, le mélange a été soit dialysé contre de l'eau distillée sur membrane V 0,05 µm (Millipore) soit précipité à -80°C pendant 30 min dans de l'alcool absolu (2 vol) ajouté de glycogène (10 µl) et d'acétate de sodium 3M (1/10^e vol).

3.6.2. Préparation du vecteur de clonage

Le vecteur de clonage utilisé a été le phagemide pBluescript II (Stratagene), capable de s'autorépliquer dans *E. coli* et qui possède le gène de résistance à l'ampicilline. Il possède le gène *lac-Z* dans lequel se trouve un "polylinker" à 21 sites de restriction uniques, flanqué des promoteurs des ARN polymérases T3 et T7, nécessaires à l'étape de séquençage de l'insert. Ce vecteur a été coupé par l'enzyme de restriction *Hind* II qui y engendre des coupures à extrémités franches.

3.6.3. Ligature

Le vecteur et l'insert ont été ligaturés dans les conditions suivantes :

la moitié des fragments repris dans l'eau	16 μ l
plasmide digéré par <i>Hind</i> II	100 ng
T4 ADN ligase (2 U/ μ l)	1 μ l
tampon ADN ligase 5X	5 μ l
ATP 10 mM	2,5 μ l
H ₂ O distillée	qsp 25 μ l

3.6.4. Préparation et transformation des bactéries compétentes

Les souches DH5 α F' et XL1-Blue (Stratagene) d'*E. coli* ont été rendues compétentes selon le protocole de Hanahan (1983).

Une aliquote de bactéries compétentes (250 μ l) a été mise en présence des vecteurs contenant les inserts (12,5 μ l), maintenue 30 min sur la glace et mise 1 min 30 à 42°C avant d'être replacée dans la glace. Des aliquotes (50 μ l) ont ensuite été étalées sur des boîtes de Petri contenant un milieu sélectif (12,5 μ g/ml d'ampicilline, 0,20 mM d'IPTG et 80 μ g/ml de X-Gal). Après une nuit à 37°C, les colonies blanches transformées par un plasmide recombinant sont apparues.

3.7. Hybridations moléculaires

3.7.1. Dot-blot

Les plasmides recombinants après clonage ou les extraits d'ADN des lysats d'hémocytes lipofectés ont été déposés en dot-blot (appareillage Biorad) sur une membrane nylon Hybond-N⁺ (Amersham) prémouillée (1h, température ambiante) dans du 20X SSC puis séchée au four (2h, 80°C, sous vide).

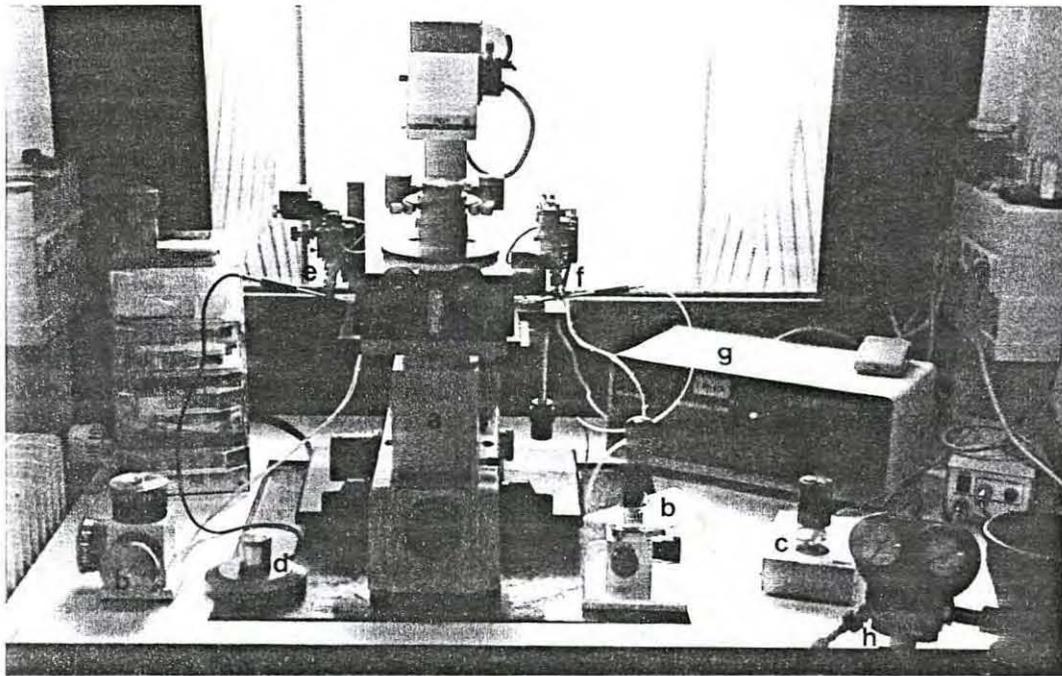


Figure 3 : Dispositif de microinjection.

- a : microscope inversé.
- b : manipulateurs hydrauliques.
- c : manipulateur motorisé.
- d : seringue à vis.
- e : support des micropipettes de maintien.
- f : support des microaiguilles.
- g : injecteur automatique.
- h : arrivée d'azote.

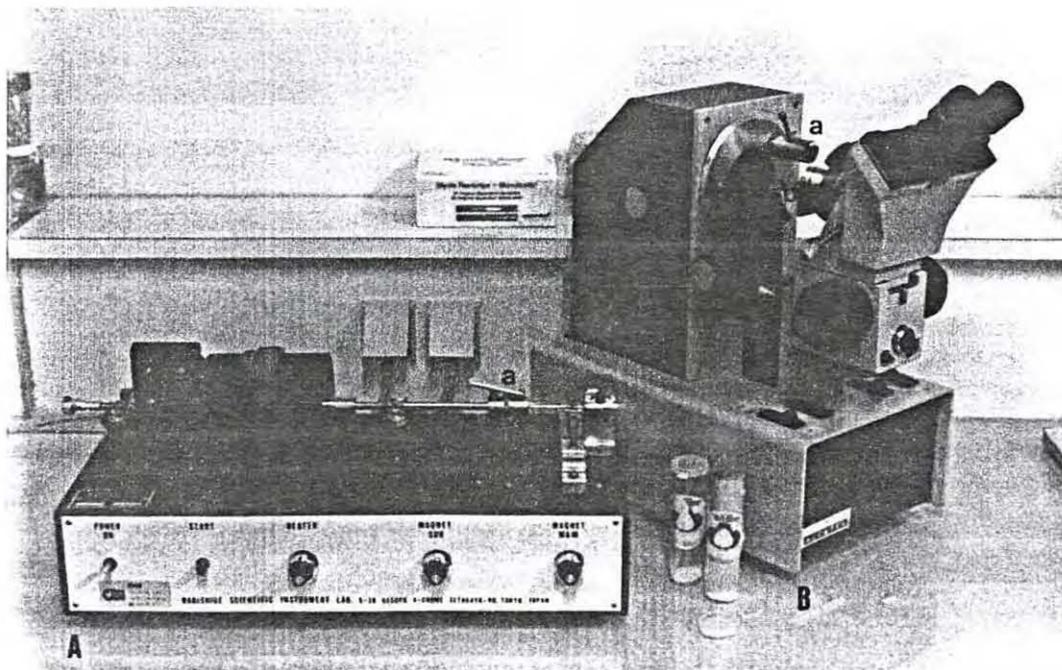


Figure 4 : Etireuse (A) et microforge (B).

- a : supports des capillaires.
- b : filaments.

3.7.2. Southern blot

Les conditions de fixation, rinçage, neutralisation et transfert ont été celles indiquées par le fournisseur de la membrane nylon.

3.7.3. Préparation de la sonde et hybridation

La sonde hsp70 de 660 bp issue du plasmide Dr-*lac-Z* a été séparée sur gel d'agarose préparatif et quantifiée par la méthode dite du "Saran Wrap" décrite par Sambrook *et al.* (1989). La préhybridation, le marquage de la sonde à la peroxidase (kit ECL Amersham), l'hybridation et la détection sur film autoradiographique ont été effectués selon les indications du fournisseur du kit de marquage.

3.8. Séquençage

La méthode dite de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) a été réalisée selon deux techniques : l'une classique faisant appel à des déoxynucléotides radioactifs (^{35}S) et l'autre à des amorces non radioactives mais biotinyllées (annexe 10).

Le laboratoire n'étant pas équipé pour la manipulation d'éléments radioactifs ^{35}S -dATP (Amersham), le séquençage à l'aide de ces radioisotopes a été effectué dans le laboratoire d'Immunologie et de Parasitologie moléculaire du Professeur Baltz à l'Université de Bordeaux II ainsi que dans celui du Professeur Boulanger à l'Université de Montpellier.

La seconde méthode dite froide a été appliquée au laboratoire suivant les indications du fournisseur du kit de séquençage (UNIPLEX Millipore-Biolabs). Parmi les protocoles de transfert fournis, celui par contact sur la membrane Immobilon-S a été retenu.

4. MICROINJECTION

4.1. Appareillage et Instruments

Les microinjections ont été effectuées sous microscope inversé à contraste de phase interférentiel (Olympus modèle IMT 2) équipé de deux supports pour les micromanipulateurs (figure 3). D'un côté, se trouve celui de la microaiguille que l'on peut commander dans les trois dimensions de façon motorisée (Narishige MM 88) pour des grands déplacements ou hydraulique (Narishige MO 202) pour de faibles courses lors de l'injection. Du côté opposé, le support de la pipette de maintien a été commandé par un micromanipulateur manuel (Narishige MO 203) qui a permis des déplacements tridimensionnels. Concernant les pipettes, le flux a été contrôlé par une seringue à vis (Alcatel) pour celle de maintien alors

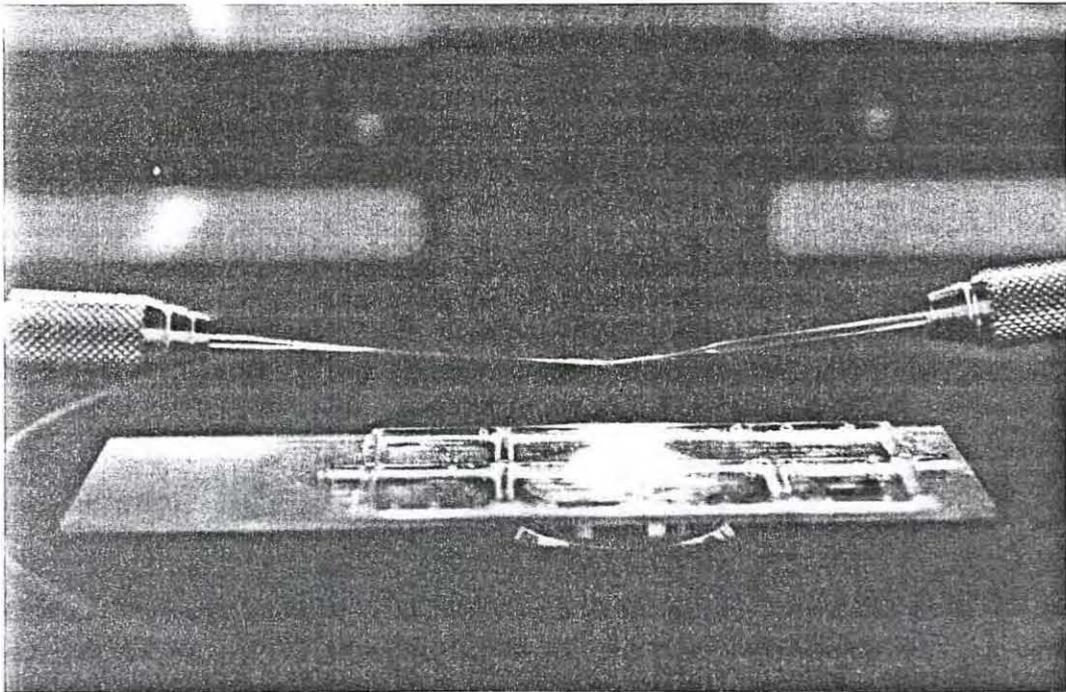


Figure 5 : Lame de verre compartimentée pour la microinjection avec les pipettes (non coudées) de maintien et d'injection.

que celle d'injection a été reliée au microinjecteur automatique (Eppendorf EC 5242). Cet appareil, relié à une bouteille d'azote, a permis un contrôle du volume injecté par réglage des paramètres de pression, contre-pression et durée d'injection.

Les pipettes de microinjection et de maintien ont été préparées à partir de capillaires de borosilicates à l'aide d'une étireuse horizontale (Narishige PN 3) et d'une microforge de type De Fonbrune (Alcatel) (figure 4). Les microaiguilles ont été réalisées à partir de capillaires doublés de 1 mm de diamètre (GC 100TF-10, Clark Electromedical Instruments) qui ont été chauffés à leur point de fusion sur une petite portion puis étirés en deux temps. Le premier étirement lent a permis d'affiner le diamètre initial alors que la seconde traction plus rapide a permis de former une pointe prête à l'emploi. Les deux étirements successifs, générés par la mise sous tension d'une bobine magnétique, sont réglables et conduisent à la création de différents profils d'aiguilles. Les pipettes de maintien ont été réalisées à partir de capillaires de 1,5 mm de diamètre (GC 150T-10, Clark Electromedical Instruments). Ces capillaires, préalablement étirés manuellement sur la flamme d'un bec bunsen, ont été ensuite travaillés à la microforge qui dispose d'une tourelle porte objectifs pour travailler avec précision, un dispositif d'éclairage, une soufflerie, un filament d'alliage tungstène/chrome et un étau de maintien des capillaires. Le capillaire préétiré a été maintenu dans l'étau puis une portion a été partiellement fusionnée au filament préalablement chargé d'une microbille de verre. Le courant traversant le filament a été brusquement coupé et la soufflerie a été déclenchée afin d'accélérer le refroidissement de la région entrée en fusion. Cette rétraction différentielle de part et d'autre du capillaire a induit sa cassure nette. La microbille de verre, remise en fusion, a été ensuite approchée du bord de cassure pour l'émousser puis provoquer un rétrécissement du diamètre dont la taille a été contrôlée sous un objectif muni d'un micromètre. Enfin, les pipettes de maintien et d'injection ont été coudées en deux endroits à l'aide de la microforge afin que les extrémités de ces instruments puissent être disposées sur un même axe lors des injections.

Pour la microinjection, les embryons ont été placés sur une lame de verre compartimentée (figure 5). Chaque compartiment a été rempli avec 100 μ l d'huile de paraffine. Dans un premier, l'ouverture des microaiguilles a été testée. Dans deux autres compartiments, reliés par un petit passage, une goutte de 20 μ l d'eau de mer filtrée (0,22 μ m) additionnée de BSA (1 %) a été déposée. Les embryons à injecter ont été déposés dans l'une de ces gouttes et chaque embryon injecté a été successivement déplacé dans l'autre goutte.

4.2. Technique d'immunofluorescence

Après l'injection du plasmide CMV- β , l'éventuel produit d'expression du gène *lac-Z* a été recherché par immunofluorescence sur les embryons développés. Les embryons ont été

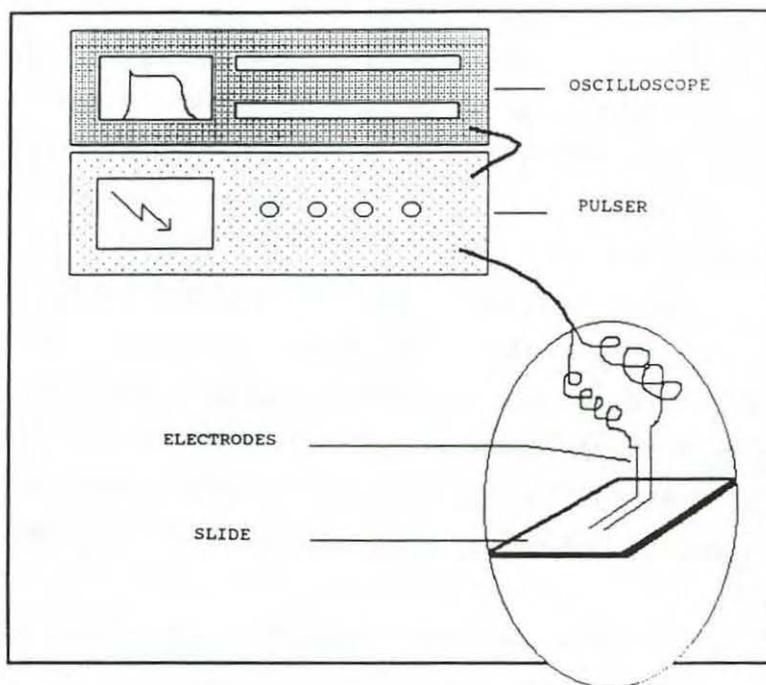


Figure 6 : Dispositif d'électrofusion sur lame.

rapidement rincés dans de l'eau distillée à 28°C, brièvement séchés sur du papier absorbant et apposés plusieurs fois un par un sur une lame histologique de type microprint. Ces préparations de cellules ont été mises à sécher à l'air pendant 10 min et ont été rincées 2 fois à l'eau distillée. Les cellules ont été ensuite perméabilisées par un bain d'acétone (5 min) puis recouvertes par une solution d'anticorps monoclonal de souris anti- β -gal (1 μ g/ml ; Boehringer : réf. 1083104) dans du tampon PBS (Diagnostic Pasteur : réf. 74901) pendant 15 min dans une chambre humide à température ambiante. Les lames ont ensuite été rincées 2 fois avec le même tampon puis mises à incuber 15 min en chambre humide à l'obscurité avec un anticorps de chèvre anti-IG de souris (Diagnostic Pasteur). Cet anticorps secondaire, couplé au FITC (annexe 8), a été utilisé dilué au 1/100^{ème} dans du tampon PBS contenant 1 % de bleu Evans. Les lames ont été rincées au PBS avant d'être montées avec du tampon glycérolé pour fluorescence (Diagnostic Pasteur). Les lames ont été examinées au microscope à épifluorescence équipé de filtres pour l'observation du rayonnement d'émission dans le vert du FITC (max 530 nm) préalablement excité à 490 nm.

5. ELECTROPERMEABILISATION

L'appareillage utilisé (EC200 BTX, Biotechnologies & Experimental Research Inc.) a été réglé pour délivrer des décharges rectangulaires. Le signal électrique délivré est contrôlable graphiquement sur un oscilloscope annexé (Optimizer BTX) qui fournit de plus certains paramètres du milieu (résistivité, conductivité, résistance). La chambre d'électrofusion qui a été utilisée est composée de deux électrodes en filaments allongés (réf. P/N 450), distantes de 0,4 mm et d'un diamètre de 1 mm (figure 6). Ce dispositif permet l'observation des embryons au microscope inversé pendant les décharges.

6. BIOLISTIQUE

6.1. Appareillage

Les expériences ont été menées avec un appareillage distribué par Biorad (PDS/1000 He) (figure 7). Le principe de la biolistique repose sur le bombardement d'échantillons biologiques avec des microprojectiles (billes d'or ou de tungstène appelées microsoutports de 1 à 1,6 μ m de diamètre) recouvertes d'ADN par coprécipitation au CaCl₂ avec de la spermidine. Les microparticules sont déposées sur un disque de Kapton (macrosoutport) et l'ensemble est soumis à une onde de choc résultant du brusque transfert de pression d'un gaz inerte (l'hélium) par éclatement d'une autre membrane de Kapton d'épaisseur calibrée (disque de rupture) (figure 8). Le macrosoutport portant les microparticules est retenu après

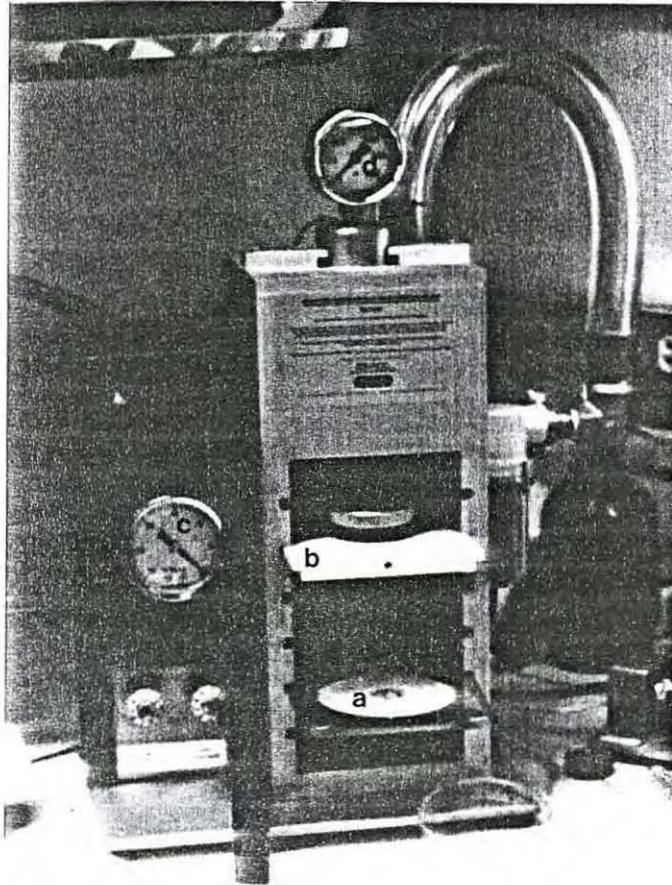


Figure 7 : Appareillage de biolistique (PDS-1000 He).

a : échantillon.

b : plaque support des projectiles et de la grille d'arrêt.

c : manomètre de contrôle de pression du vide dans la chambre.

d : manomètre de contrôle de pression d'Hélium.

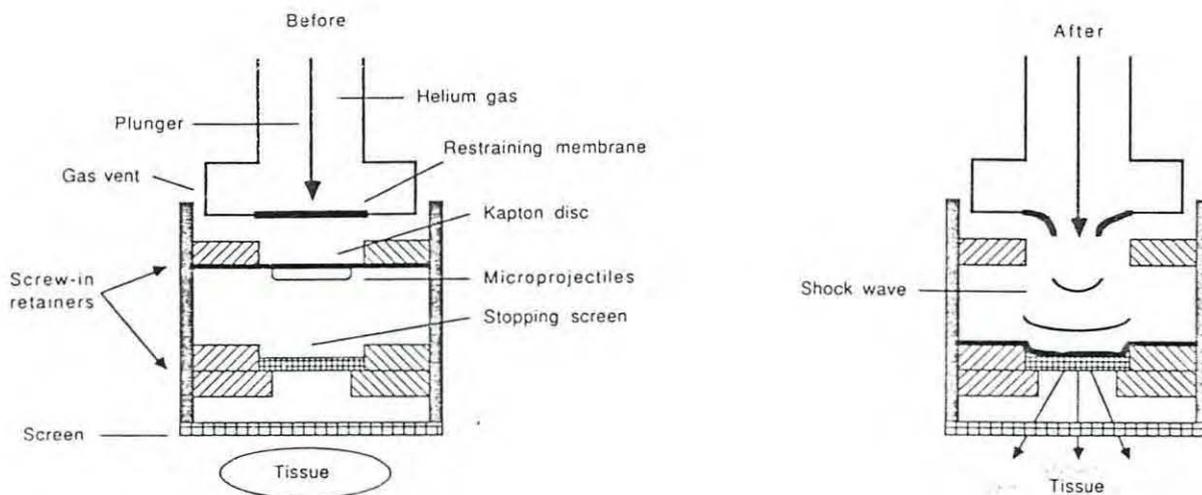


Figure 8 : Principe de fonctionnement du PDS-1000 He (extrait de Williams *et al.*, 1991).

quelques millimètres de course par une grille d'arrêt alors que les billes continuent leur trajectoire à haute vitesse jusque dans le matériel biologique.

Les paramètres à établir, dont l'analyse a été récemment faite par Sanford *et al.* (comm. pers.) relèvent de 3 types : ceux qui ont un impact sur la vitesse des particules, les particules elles-même et les paramètres biologiques.

(1) La première catégorie rassemble l'intensité du vide environnant les tissus juste avant la déflagration, la résistance du disque de rupture, les distances séparant d'une part le disque de rupture et la grille d'arrêt et d'autre part la grille d'arrêt et le tissu cible.

(2) Concernant les particules elles-même, le choix du métal est déterminant ainsi que la quantité d'ADN et de microbilles à déposer sur les macrosupports.

(3) Les paramètres biologiques sont la taille, la densité et l'âge des cellules cibles ainsi que le choix du plasmide.

Plusieurs de ces paramètres ont été arbitrairement fixés sur la base d'études antérieures notamment sur la transfection d'embryons de drosophile (Baldarelli et Lengyel, 1990) et de moustiques (Mialhe *et al.*, 1992b). La course du macrosupport jusqu'à l'écran d'arrêt a été de 9 mm et l'intensité du vide de 18 psi.

Les travaux d'optimisation ont porté sur la sélection du disque de rupture à utiliser (450, 650, 900, 1100, 1300, 1550, 1800 psi) et les distances entre l'écran d'arrêt et l'échantillon (35, 65, 95 et 125 mm) pour obtenir d'une part des bons taux de survie et d'autre part des expressions transitoires.

6.2. Préparation des billes d'or recouvertes d'ADN

L'ADN plasmidique a été utilisé à une concentration finale de 1 à 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ TE. Le recouvrement des particules d'or a été réalisé selon le protocole modifié de Sandford *et al.* (comm. pers.) décrit ci-dessous.

Il a été pesé 60 mg de particules d'or qui ont été repris dans 1 ml d'éthanol dans un microtube (TREFF : faible adsorption sur les parois). Ce mélange a été vortexé intensivement pendant 3 à 5 min et les amas d'or qui subsistent ont été retirés (environ 50 %). La suspension a été ensuite centrifugée (3000 rpm, Beckman microfuge, 4 sec), le surnageant éliminé et un ml d'eau distillée stérile a été ajouté. Après agitation au vortex pendant 1 min. à vitesse maximum, le mélange a été à nouveau centrifugé comme précédemment et le surnageant enlevé. Un millilitre d'eau distillée stérile a été ajoutée de façon à obtenir une concentration finale d'environ 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Les micros supports ainsi préparés ont été ensuite recouverts d'ADN comme décrit ci-dessous. Pour la réalisation de 3 macrosupports (3 tirs), il a été introduit dans un microtube Eppendorf stérile en agitation sur

un vortex (1/3 de la puissance maximale) et dans l'ordre: 50 μ l de billes, 15 μ g de plasmide (taille 4 kb), 50 μ l de CaCl₂ (2,5 M) et 20 μ l de spermidine (0,1 M). Il a été agité fermé au vortex pendant 1 min à la vitesse maximum. Les particules d'or recouvertes du plasmide ont ensuite sédimenté pendant 10 min.. Deux cent cinquante μ l d'éthanol pur, ajoutés, ont été fortement agités au vortex pendant 1 min. Après une sédimentation de 3 min, le tube a été très brièvement centrifugé à 3000 rpm (microfuge Beckman) avant d'ôter le surnageant. Après avoir ajouté 30 μ l d'éthanol pur, le liquide a été resuspendu à la pipette et déposé rapidement de façon la plus homogène possible sur les disques macrosupport (environ 10 μ l) préalablement stérilisés à l'alcool. Ainsi, 10 μ g d'ADN précipité sur 1 mg de particules d'or, ont été utilisés par tir.

6.3. Bombardement

Chaque tir a été effectué sur 3000 à 10000 cystes ou larves d'*Artemia*. Avant le bombardement, les animaux ont été étalés en monocouche sur un disque de papier Whatman imbibé d'eau de mer reconstituée additionnée d'antibiotiques (penicilline 10000 U/ml, ampicilline, streptomycine et kanamycine 10 mg/ml). Après le bombardement, les échantillons ont été gardés ainsi en atmosphère humide à 27°C. Après 24 h de développement, le taux de survie a été estimé par observation à la loupe binoculaire et les individus ont subi un choc thermique de durées variables.

7. ANALYSE INFORMATIQUE DES SEQUENCES NUCLEIQUES ET PROTEIQUES

Les banques de séquences d'acides nucléiques (GENBANK, EMBL) et de séquences protéiques (NBRF) ont été consultées, *via* un modem, sur le centre serveur du Centre Interuniversitaire de Traitement de l'Information (CITI 2) à Paris. Les séquences ont été travaillées avec les programmes suivants (CLUSTAL, TREEALIGN, KANEHISA, FASTA) disponibles sur VAX 8530 dans le système de Base Informatique sur les Séquences d'Acides Nucléiques pour les Chercheurs Européens (BISANCE ; Dessen *et al.*, 1978) et les programmes du "Genetics computer group" (GCG ; Duveraux *et al.*, 1984).

CHAPITRE 1 :

**INTRODUCTION D'ADN.
MISE AU POINT DE METHODES
APPLICABLES A L'INTRODUCTION D'ADN
DANS DES EMBRYONS ET DES
CELLULES DE CRUSTACES**

1. INTRODUCTION

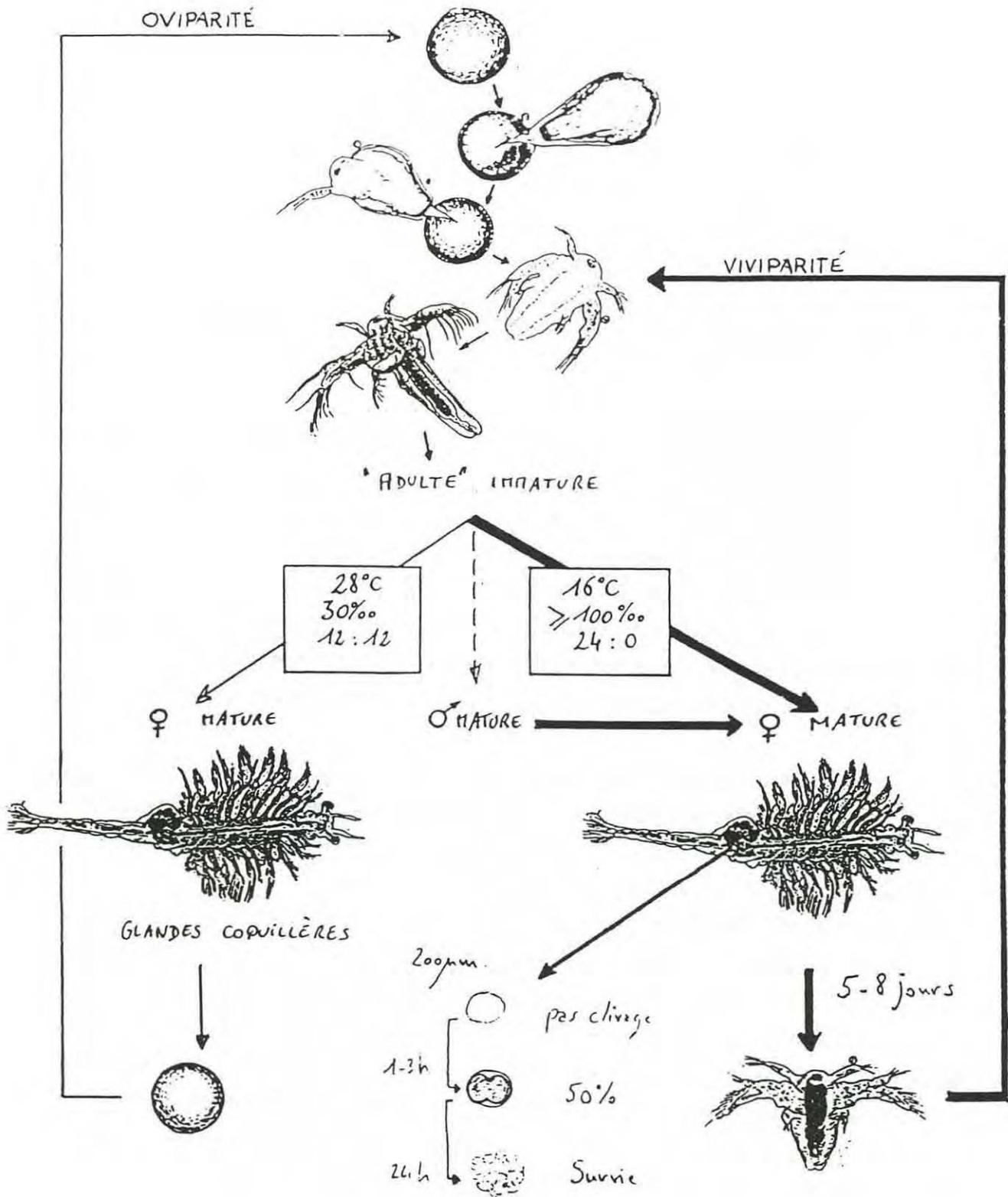
L'introduction d'ADN dans des cellules ou des embryons intacts représente la première étape dans la transformation de Crustacés. En effet, l'étude de promoteurs en expression transitoire nécessite un système cellulaire d'analyse qui peut être soit des cellules plus ou moins différenciées et cultivées *in vitro* soit des cellules embryonnaires. Le processus d'intégration d'ADN qui stabilise la transformation implique que le système cellulaire transformé puisse participer à l'établissement de la lignée germinale afin de transmettre ce nouveau caractère génétique à la descendance. Les systèmes cellulaires adaptés à cette dernière exigence sont uniquement des cellules embryonnaires.

Chez les Crustacés, aucune lignée cellulaire n'est établie aujourd'hui ce qui a impliqué de prendre en compte des mises en culture de cellules directement issues des animaux. Parmi les espèces de Crustacés maintenues au laboratoire ou en élevage, l'*Artemia* présente l'intérêt de pouvoir fournir un grand nombre d'embryons pluricellulaires en réhydratant simplement des stades enkystés en dormance. Ces kystes, disponibles dans le commerce, fournissent donc des systèmes cellulaires potentiels pour étudier des expressions transitoires. Par ailleurs, ces Crustacés ont un cycle de développement très court puisqu'ils peuvent se reproduire à l'âge de trois semaines. Ils se prêtent de ce fait particulièrement bien à des études sur l'intégration dans le génome et la transmission au travers des descendance.

Le genre *Penaeus*, qui est largement élevé en aquaculture pour l'alimentation humaine, se reproduit dès l'âge de six mois environ, il présente des avantages complémentaires à ceux de l'*Artemia* concernant l'obtention aisée de différentes cellules différenciées, et dans les zones d'élevage, d'embryons unicellulaires en très grand nombre.

Parmi les nombreuses méthodes disponibles pour introduire de l'ADN dans des cellules, quatre ont été testées sur ces Crustacés : (1) la microinjection d'embryons pour son extrême fiabilité due au contrôle visuel permanent de l'opération et donc très utile pour des étapes méthodologiques pionnières, (2) l'électroporation d'embryons pour sa capacité à traiter économiquement et simultanément un très grand nombre d'oeufs, (3) la biolistique qui permet aussi non seulement le traitement "en masse" mais aussi l'introduction de l'ADN directement dans les noyaux, et (4) la lipofection appliquée ici uniquement à des cellules en primocultures, en raison de son efficacité associée à une faible toxicité et une grande simplicité d'emploi.

Une discussion détaillée comparant les avantages et limites de ces différentes méthodologies est développée en chapitre IV de ce document.



Figures 9 : Modes de reproduction d'*Artemia* selon les conditions du milieu.

2. OBTENTION D'EMBRYONS A DES STADES PRECOCES

L'intégration d'un gène étranger dans des cellules germinales d'un organisme repose sur la transfection de la ou les cellules qui vont générer ces cellules de cette lignée. L'embryon au stade unicellulaire ou très précoce est naturellement la cible privilégiée pour des tentatives d'obtention d'organismes transgéniques. Avant de pouvoir entreprendre des expériences sur l'introduction de différentes molécules, notamment d'ADN, dans des embryons à des stades précoces de développement, il a fallu mettre au point des protocoles pour leur obtention. Chez les Crustacés en général, et *Artemia* et *Penaeus* en particulier, la cinétique de développement embryonnaire est peu documentée car la fécondation *in vitro* n'est pas maîtrisée en dépit d'une publication relative à ce sujet (Clark *et al.*, 1973).

2.1. *Artemia*

Le petit Crustacé du genre *Artemia*, robuste et très facile à élever au laboratoire dans des aquariums de petits volumes (1 litre) représente l'une des espèces les plus étudiées chez les Crustacés, ce qui fait de lui le modèle préféré pour de nombreux types de travaux fondamentaux (morphologie, génétique des populations, toxicologie, métabolisme, développement, écologie, structure et expression du génome) ou appliqués en raison de son intérêt en aquaculture (pour une revue, voir *Artemia Research and its applications*, vol. 1, 2 et 3, Eds. Declair). L'intérêt primordial de cet animal repose sur sa disponibilité sous forme d'embryons déshydratés au stade gastrula qui peuvent être stockés à température ambiante pendant plusieurs mois. C'est pourquoi la majorité des études relatives à l'embryologie de l'*Artemia* a porté sur les stades post-gastruléens capables de poursuivre leur développement après réhydratation alors que très peu d'études ont été menées sur des stades plus précoces du développement embryonnaire (De Chaffoy *et al.*, 1978).

La levée de dormance des cystes commercialisés permet d'obtenir des animaux adultes qui viennent à maturité et se reproduisent. Les cystes stockés au stade gastrula du développement correspondent cependant à un mode particulier de reproduction. On distingue en effet des souches parthénogénétiques et des souches où la fécondation des femelles par les mâles est obligatoire. De plus, au cours de l'année et selon les conditions du milieu, les voies reproductrices de l'*Artemia* suivent celles de l'oviparité ou de l'ovoviviparité (figure 9). Dans ce dernier cas qui survient lorsque les conditions sont favorables, les oeufs, fécondés ou activés parthénogénétiquement, suivent un développement direct vers les premiers stades larvaires nageurs. Ces larves, appelées nauplius, issues des oeufs ayant migré de l'oviducte vers l'ovisac, sont ensuite libérées en pleine eau. En conditions défavorables par contre, les oeufs s'entourent d'une coquille épaisse à partir du stade 2

Etape	Jour	Milieu	Salinité (%)	Temp. (°C)	Stade	Aliment	Lumière Oxygène
Décapsulation	J 0	eau distillée	0	ambiante	gastrula	-	+
Eclosion	J 1	eau de mer	3	28	cyste	-	+
Grossissement	J 2	"	"	"	nauplius	algues	+
Sexage	J 9	"	5	25	juvénile	levure	+
	J 11	"	8	20	"	"	+
Maturation	J 13	"	10	16	adulte	levure	+
Accouplement	J26-J30	"	"	"	géniteur	levure	+

Tableau 3 : Séquence d'élevage d'*Artemia* pour un développement ovovivipare.

cellules. Le développement se poursuit néanmoins jusqu'au stade gastrula qui se retrouve enkysté, se déshydrate fortement et entre en état de dormance métabolique (diapause).

2.1.1. Production d'embryons précoces

Dans le but de pouvoir réaliser des expériences sur des stades embryonnaires précoces, antérieur au stade gastrula, des artémies ont donc été élevés dans des conditions susceptibles d'induire l'ovoviviparité (Berthélémy-Okazaki et Hedgecock, 1987). Ainsi, des animaux ont été élevés dans des bacs de 300 litres. Des femelles matures ont été fréquemment trouvées mais le stade de développement de leurs embryons était généralement très avancé et il s'est avéré difficile de pouvoir prélever une femelle portant des ovocytes juste fécondés. Il a donc fallu essayer de synchroniser les maturations et de contrôler les fécondations en maintenant les sexes séparés jusqu'à l'accouplement. Les animaux ont été tout d'abord sexés visuellement au stade juvénile puis triés manuellement et placés dans des aquariums distincts. Dans ces conditions, il a été observé que les ovaires des femelles restaient systématiquement sous forme de 2 à 3 lobes verdâtres qui n'abritaient pas d'ovocytes. Ce phénomène de blocage de la maturation trouve peut-être son origine dans l'absence des hormones produites par les mâles (Fautrez et Fautrez-Firlefyn, 1971). Les animaux sexés ont donc été élevés par la suite dans un même aquarium mais compartimenté par une maille de 200 μm . Une séquence précise d'élevage a ainsi été mise au point afin de produire en série des femelles gravides qui pouvaient donner naissance à des larves nageuses si elles avaient été préalablement accouplées et fécondées (tableau 3).

2.1.2. Essai de maintien d'ovocytes *in vitro*

Afin de tenter des fécondations d'ovocytes *in vitro*, des ovocytes ont été prélevés par dissection avec des microinstruments d'ophtalmologie chez des femelles non fécondées. L'*Artemia* est un organisme capable de s'accomoder de fortes variations de salinité et la pression osmotique de son hémolymphe varie bien qu'il soit un excellent animal osmorégulateur (Croghan, 1958). Les conditions d'élevage pour l'ovoviviparité étant très salées (jusqu'à 10 % de salinité), la pression osmotique de l'hémolymphe des femelles d'*Artemia* élevées dans de telles conditions était susceptible d'être modifiée. Ainsi, 4 milieux de dissection de tonicité variable ont été testés.

Milieu 1 (485mOsm)	sea-salts (13,23 g/l eau bidistillée) HEPES 20 mM pH 7,5 BSA 0,5 % bacitracine 0,1 mg/ml penicilline G 200 U/ml
-----------------------	---

Milieu 2 (485 mOsm)	eau de mer filtrée (0,22 μ m) ; eau bidistillée (3/1) HEPES 20 mM pH 7,5 BSA 0,5% bacitracine 0,1 mg/ml penicilline G 200 U/ml
Milieu 3 (825 mOsm)	eau de mer filtrée (0,22 μ m) HEPES 20 mM pH 7,5 BSA 0,5 % bacitracine 0,1 mg/ml penicilline G 200 U/ml
Milieu 4 (350 mOsm)	sea-salts (9,55 g/l eau bidistillée) HEPES 20 mM pH 7,5 BSA 0,5% bacitracine 0,1 mg/ml penicilline G 200 U/ml

Le milieu 3 correspond à de l'eau de mer à 3 % alors que les milieux 1, 2 et 4 correspondent à des valeurs d'osmolarité déduites de valeurs de pression osmotique de l'hémolymphe d'*Artemia* en fonction d'une salinité plus ou moins forte du milieu (Croghan, 1958).

Quel que soit le milieu de dissection utilisé, les ovocytes non fécondés sont restés extrêmement fragiles. Environ 60 % des ovocytes ont éclatés pendant la dissection, puis 50 % des ovocytes, restés intacts, se sont abimés au moment des lavages ou de leur transfert au moyen d'une pipette Pasteur reliée à la bouche.

2.1.3. Essai de fécondation *in vitro*

Les ovocytes restants ont pu être mis en présence de broyats de spermatophores prélevés sur plusieurs mâles pour tenter des fécondations *in vitro*. Aucun des ovocytes n'a évolué vers le clivage de son cytoplasme.

2.1.4. Essai de maintien *in vitro*

Dans le milieu à 485 mOsm (milieu 1 ou 2), les oeufs d'une femelle naturellement fécondée ont bien résisté à la manipulation. Dans le milieu 3 d'osmolarité supérieure, paradoxalement, les oeufs ont gonflé et éclaté dès que la paroi de l'oviducte a été incisée. Dans le milieu 4 plus hypotonique, au contraire, l'oeuf s'est rétracté sous sa membrane et ne s'est pas segmenté. Le milieu 1 synthétique a donc été retenu, préférentiellement au milieu 2 moins bien défini, pour collecter les ovocytes fécondés et les maintenir en culture ou les manipuler.

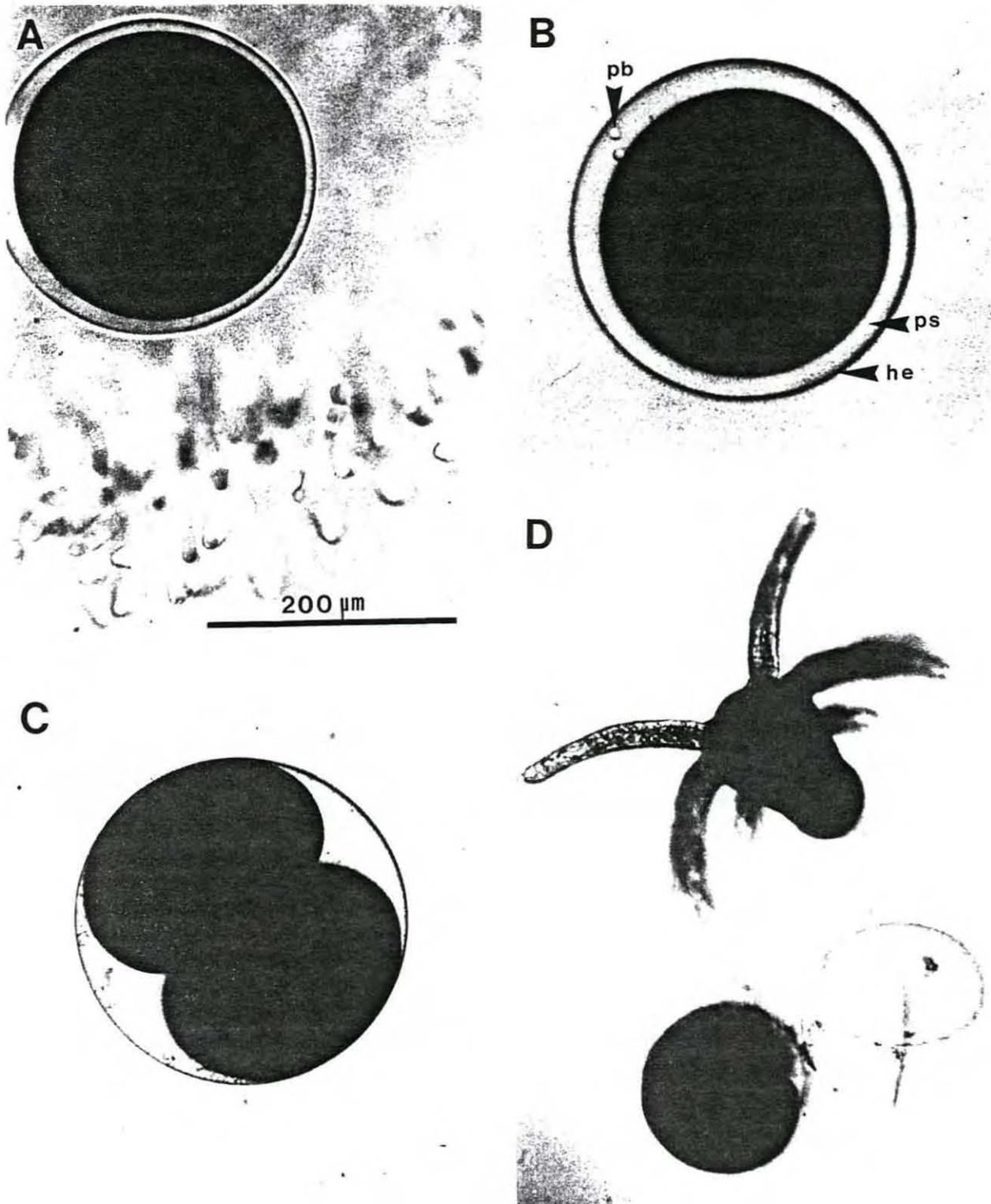


Figure 10 : Développement embryonnaire de *Penaeus indicus*.

a : formation de la gelée corticale.

b : expulsion des globules polaires (pb) dans l'espace périvitellin (ps) et formation de la membrane d'éclosion (he).

c : stade deux-cellules.

d : éclosion de la larve nauplius.

Le brassage des oeufs pendant leur culture a semblé important par référence à leur comportement dans la cavité utérine de la femelle. Les mises en culture ont été initialement réalisées dans des tubes à hémolyse dont le bouchon a été percé de deux trous, de l'air stérile y étant introduit par l'intermédiaire d'une aiguille pourvue d'une membrane filtrante. Ainsi, les oeufs ont été maintenus en suspension. Par la suite, aucune différence de développement n'étant observée jusqu'au stade nauplius avec des oeufs simplement cultivés en boîte de Petri, ce type de culture a été pratiqué.

Dans ces conditions, les embryons unicellulaires de couleur jaune-vert se sont segmentés très rapidement (le stade 2-cellules dure environ 15 minutes à 18°C) pour atteindre le stade morula en 24 heures à 25°C. Au delà, une pigmentation orangée correspondant à l'oeil nauplien apparaît en forme d'accent circonflexe sur l'embryon. De façon générale, les embryons n'ont pas évolués au delà de ce stade probablement car des facteurs nutritifs ou autres doivent être fournis par les glandes coquillères associées à l'utérus de la femelle (Fautrez et Fautrez-Firlefin, 1971). C'est pourquoi des ovocytes fécondés ont été disséqués et mis en contact *in vitro* avec des glandes coquillères. Dans ces conditions, les embryons se sont développés à des stades plus tardifs correspondant au début de la morphogenèse des appendices. Exceptionnellement, des éclosions se sont produites donnant naissance à des larves naupliennes nageuses néanmoins malformées. En bilan, des expérimentations ont pu être régulièrement réalisées sur des stades embryonnaires précoces mais les analyses n'ont pas pu être pratiquées au delà du stade gastrula.

2.2. *Penaeus Indicus*

Parmi les différentes espèces de crevettes du genre *Penaeus*, l'espèce *indicus* à thélycum fermé (Primavera, 1984), a été choisie pour sa rusticité et sa facilité d'élevage. Alors que la maturation et l'élevage larvaire sont pratiqués en routine, la cinétique du développement embryonnaire précoce restait inconnue. Dans la perspective de travaux sur la transformation génétique, l'ADN étranger convient d'être injecté préférentiellement à des stades où les remaniements chromosomiques sont importants c'est à dire lors de la méiose dans les cellules germinales. En pratique, l'intégration peut aussi s'effectuer au cours des divisions cellulaires d'où l'intérêt de travailler avec des stades très précoces. C'est pourquoi la cinétique d'apparition des stades précoces a été analysée. La fécondation *in vitro* n'étant pas maîtrisée, la cinétique de développement embryonnaire a été décrite sur différentes pontes, ceci afin de prendre en compte un éventuel effet maternel. Chaque ponte, issue d'une femelle a été incubée à 28°C et des échantillons ont été prélevés toutes les 5 minutes et fixés par du formol.

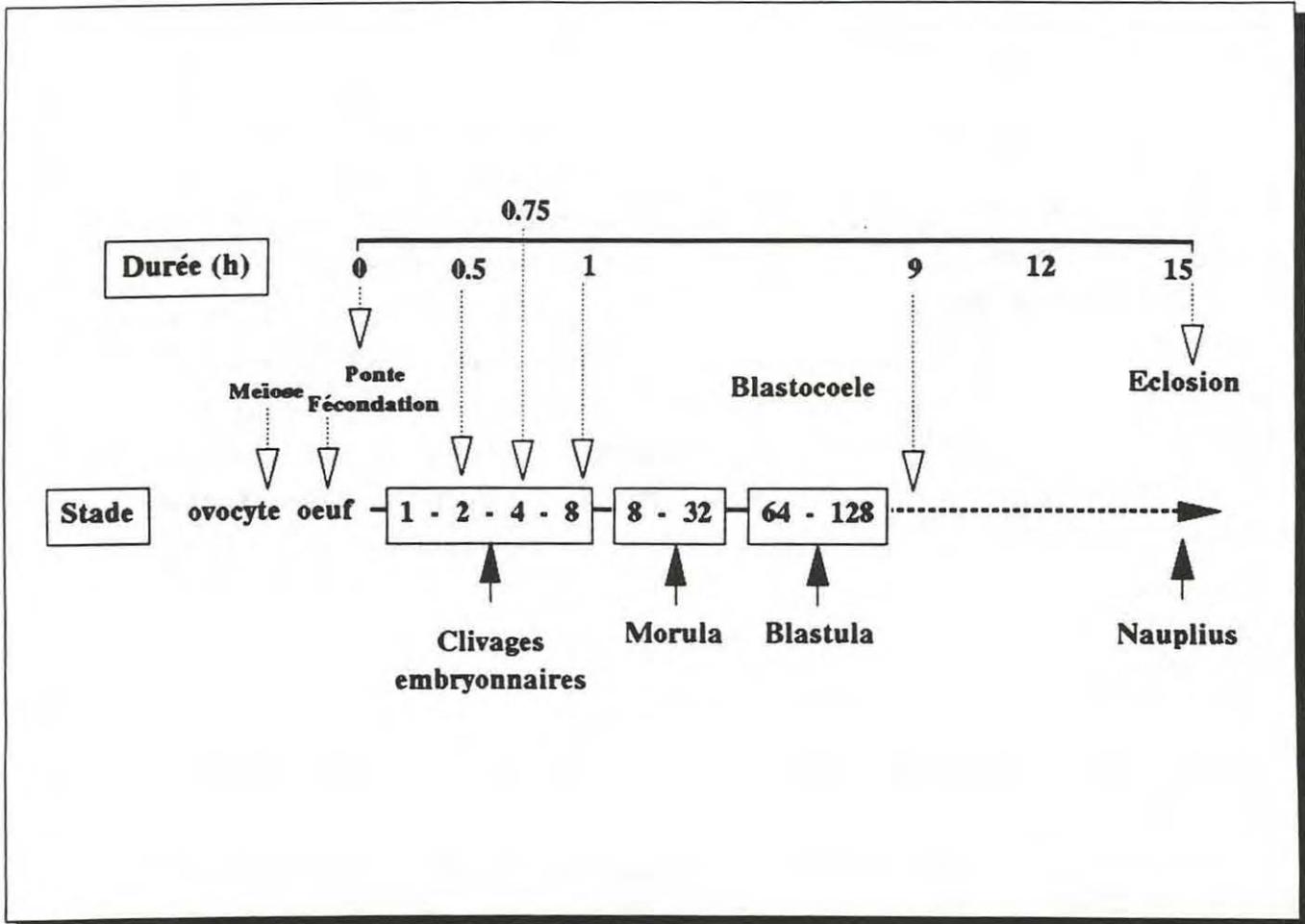


Figure 11 : Evénements précoces de l'embryogenèse de *Penaeus indicus* (28°C)

Quelles que soient les pontes, les taux de fécondation ayant été par ailleurs différents (92 %, 88 %, 79 % et 95 %), l'instant d'apparition et la durée des différents stades (1 cellule à 8 cellules) ont été identiques. L'expulsion des granules corticaux s'effectue 2 minutes après l'expulsion des ovocytes par les gonopores de la femelle (figure 10A), suivie de l'expulsion des deux globules polaires entre 10 et 14 minutes après la ponte (figure 10B). Le premier clivage est observé 30 minutes après la ponte (figure 10C). L'éclosion au stade nauplien se produit une quinzaine d'heures après la ponte (figure 10D). Ces événements sont résumés dans la figure 11.

2.2.1. Essais de ralentissement du développement embryonnaire

Dans les conditions standard de température (28°C), la première division mitotique étant atteinte très rapidement (30 minutes), des essais de ralentissement du développement par refroidissement ont été tentés afin d'augmenter le nombre d'embryons unicellulaires manipulables par des méthodes individuelles telles que la microinjection. Dans cette optique, des femelles prêtes à pondre ont été placées dans de l'eau à des températures plus basses (26±0,2°C ; 24±0,2°C ; 22±0,2°C ; 20±0,2°C et 18±0,2°C). Il s'est avéré qu'à toutes ces températures, le processus de ponte a été bloqué.

Il a donc été entrepris de refroidir non pas la femelle mais les oeufs émis immédiatement après qu'ils soient manipulables, c'est à dire à partir de la formation de la gelée corticale.

Des ovocytes ont été aliquotés sur tamis et placés dans des béchers remplis d'eau de mer (250 ml, 28°C) eux-même placés dans des bacs de 30 litres d'eau maintenue à différentes températures (28°C à 18°C). Le volume d'eau (250 ml) à 28°C a joué le rôle de volant thermique de façon reproductible au cours des différentes courbes de descente et de remontée en température. Lorsque le stade 4-cellules a été atteint dans le lot placé à la plus faible température (18°C), tous les béchers ont été à nouveau mis dans des bacs à 28°C pendant 24 heures. Les taux de survie ont été alors estimés en comptant 100 individus.

L'effet de ces baisses de température sur la cinétique de développement embryonnaire (figure 12) s'est traduit par un ralentissement d'apparition des stades précoces et une chute des taux d'éclosion estimés 24 heures plus tard. La durée des stades précoces a été significativement augmentée dans les lots placés à 18°C et 20°C mais les taux d'éclosion ont été aussi réduits (49 % à 20°C) comparativement à celui du lot témoin à 28°C. L'avantage relatif à la prolongation des stades 1 et 2-cellules est donc en pratique limité si l'on considère l'effet délétère du refroidissement sur le déroulement ultérieur des embryons. De ce fait, il a été décidé de réaliser les manipulations ultérieures d'embryons de *Penaeus* sans essayer de prolonger la durée des stades précoces. En pratique, le stade unicellulaire peut être manipulé pendant 23 minutes et le stade bicellulaire pendant 15 minutes environ. Compte tenu du très grand nombre d'ovocytes émis simultanément par une femelle (environ

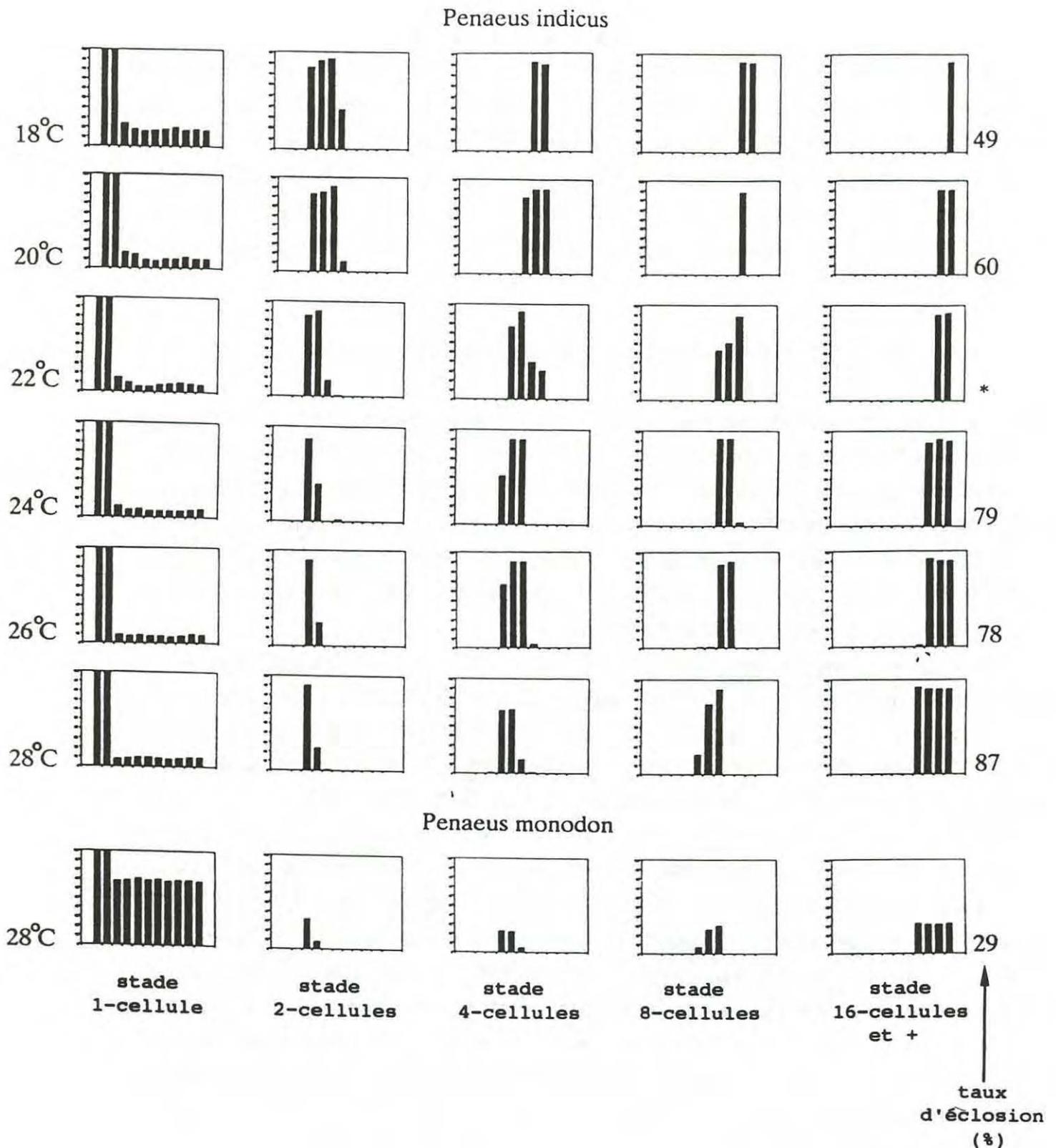


Figure 12 : Cinétique du développement embryonnaire et taux d'éclosion chez *Penaeus indicus* en fonction de la température (18°C à 28°C) et *P. monodon* (28°C).

pour chaque histogramme :

en abscisse: intervalles de temps après la ponte (10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 70, 80, 90 et 100 minutes).

en ordonnée : pourcentage d'embryons.

* : valeur manquante.

150 000), il apparaît que le nombre d'embryons manipulés précocément sera directement fonction de la méthode utilisée.

3. MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE MICROINJECTION D'EMBRYONS DE *PENAEUS INDICUS*, *P. MONODON* ET *ARTEMIA FRANCISCANA*

Les résultats concernant la mise au point de ce protocole font l'objet d'une publication (annexe 11) soumise à *Aquaculture* et intitulée: "Microinjection of crustacean embryos and transient expression of injected DNA".

Le travail a porté initialement sur la fabrication des microinstruments de microinjection. Leurs formes ont été optimisées pour s'adapter aux caractéristiques des différents ovocytes en terme de dimension et de résistance à la microinjection.

3.1. Elimination de la gelée corticale

Il est rapidement apparu que la gelée corticale (figure 10A) est un obstacle à la manipulation des embryons car elle les colle irréversiblement à la micropipette de maintien et bouche l'orifice de l'aiguille d'injection. Afin d'éliminer cette gelée corticale, deux protocoles inspirés de Richter *et al.* (1981) pour l'oeuf d'oursin ont été testés. Les ovocytes ont été soit baignés successivement dans une solution d'acide dilué (30 sec. pH 4,5 puis 30 sec. pH 6) soit agités circulairement dans le tamis de récolte pendant 2 minutes. L'efficacité de ces deux traitements chimique et mécanique s'est révélée totale et sans effet délétère sur le développement (taux d'éclosion identique à celui du témoin).

3.2. Fabrication des microinstruments

Concernant la pipette de maintien (figure 13), le diamètre final interne s'est révélé devoir être égal au tiers ou au quart de celui de l'oeuf à maintenir soit 55 à 70 μm . Avant la première aspiration avec une pipette de maintien, son remplissage partiel avec de l'huile de paraffine a permis de rendre les variations de pression plus douces pendant les manipulations de prise et de lâcher des oeufs.

Pour les microaiguilles d'injection (figure 13), de nombreux essais de microinjection ont dû être réalisés pour établir les trois paramètres de réglage de l'étireuse: (1) traction primaire = 1000, (2) traction secondaire = 1000, et (3) intensité électrique = 2. Ces valeurs ont permis d'obtenir une régularité de fabrication des microaiguilles dont l'efficacité de pénétration a été totale. La pression d'injection contrôlée par le microinjecteur Eppendorf (figure 3g) a été comprise entre 1600 et 2000 hPa. La pointe éfilée de l'aiguille a permis d'entrer relativement loin dans le cytoplasme opaque de l'oeuf (figure 13) tout en étant assez

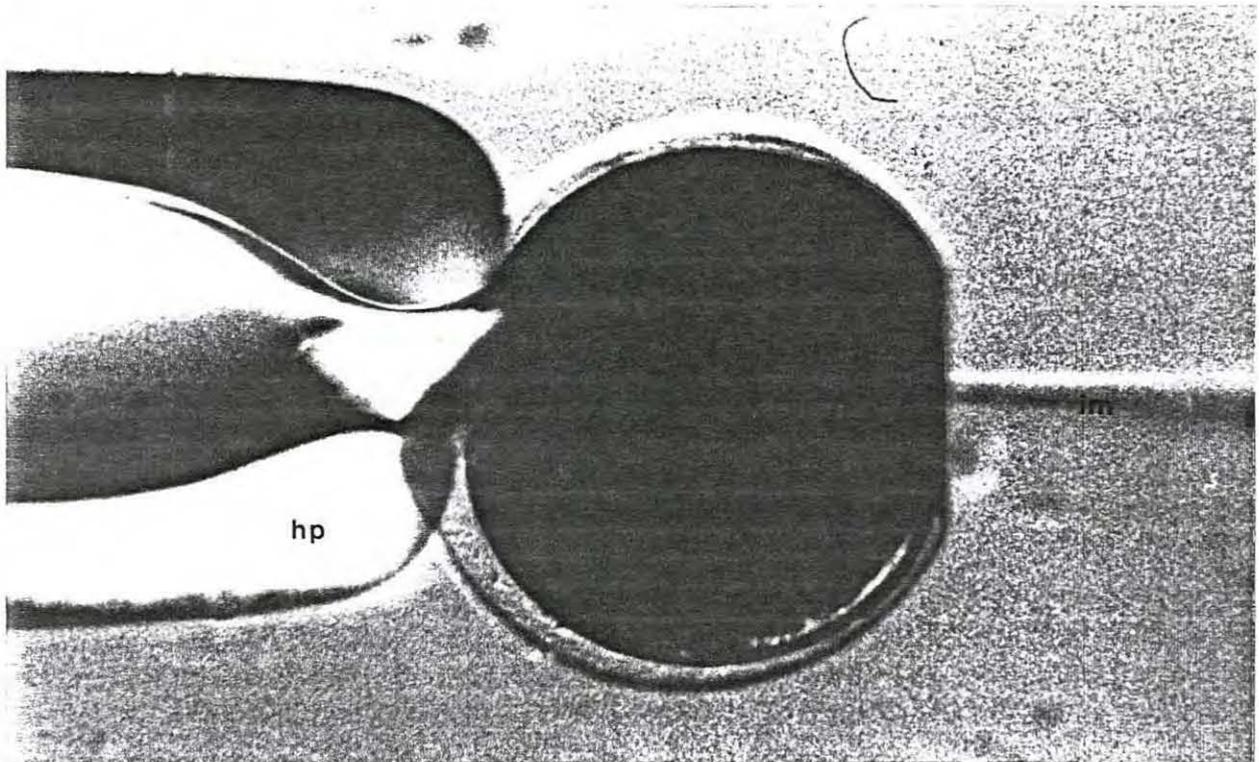


Figure 13 : Procédure de microinjection d'un embryon de *Penaeus indicus* à l'aide d'une pipette de maintien (hp) et d'une microaiguille (im).

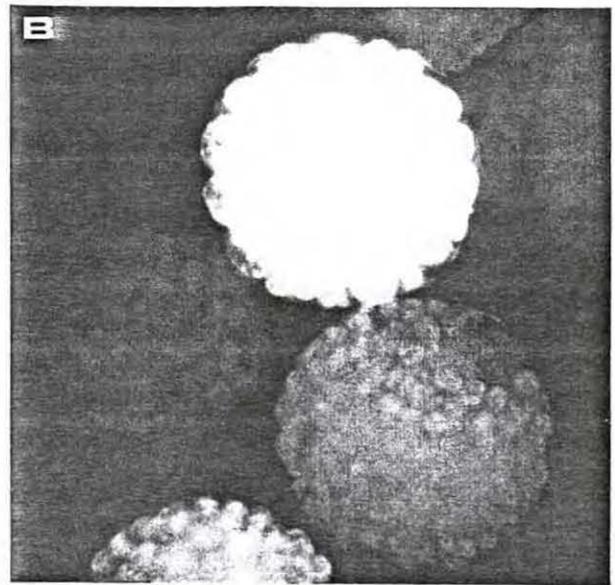
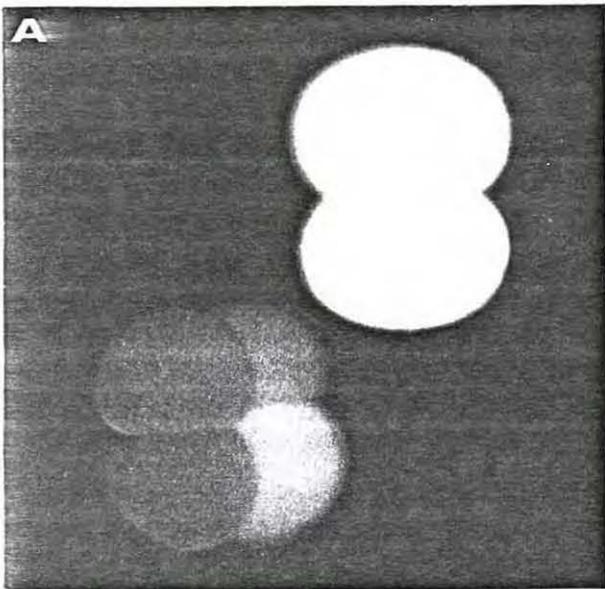


Figure 14 : Embryons de *Penaeus indicus* injectés au stade 1-cellule avec du Lucifer Yellow et observés aux stades 2 et 4-cellules (A) et au stade gastrula (B).

rigide pour servir à plusieurs microinjections. L'ouverture de chaque aiguille a été vérifiée avant chaque injection en contrôlant l'expulsion de liquide dans une goutte d'huile minérale. Dans ce milieu, de viscosité différente de celle de l'eau de mer, le plus petit diamètre de la goutte expulsée a été de 10 μm soit un volume de 0,5 pl. Lorsqu'au cours des opérations de microinjection l'aiguille a été obstruée, il s'est avéré fréquemment possible de solutionner ce problème, soit en créant une surpression à l'aide du microinjecteur, soit de façon plus efficace en frottant son extrémité contre la pipette de maintien.

3.3. Microinjection d'un fluorochrome

La microinjection d'un fluorochrome (solution de Lucifer Yellow CH (Sigma L0259) à 10 % volume à volume d' H_2O distillée) a permis d'optimiser les paramètres de pression de l'injecteur dans le sens d'une meilleure survie embryonnaire et d'une fiabilité dans la délivrance de l'inoculum. Cette solution de Lucifer Yellow s'est révélée parfaitement détectable en microscopie à épifluorescence (excitation 540 nm) (figures 14A et 14B), en permettant notamment d'observer une distribution inégale du fluorochrome entre la cellule injectée et les cellules filles.

3.4. Estimation des taux de survie à la microinjection

La survie des embryons des différentes espèces injectés au stade 1 ou 2-cellules a été très variable (tableau 4), cette variation étant indépendante de l'expérience de l'opérateur.

Les résultats présentés dans ce tableau indiquent en taux de survie corrigés par rapport au témoin, qu'aucun des deux stades injectés n'est plus résistant que l'autre. Il est possible de dire que tous les embryons survivants ont été réellement injectés car ils ont été fluorescents ce qui indique qu'une très faible quantité de Lucifer Yellow peut être détectée même dans les embryons de *Penaeus indicus* qui possèdent une légère fluorescence native. Concernant l'*Artemia*, bien qu'une seule expérience ait été réalisée, les taux de survie peuvent être considérés comme très bons comparés à ceux obtenus pour les *Penaeus*, notamment en tenant compte de leur plus grande fragilité.

Il faut noter que le lucifer yellow lui-même ou un trop grand volume d'inoculum doivent présenter une certaine toxicité intracellulaire. En effet, des oeufs dont la fluorescence a été décelée comme étant très importante, immédiatement après l'injection, ne se sont pas développés. Le volume de l'inoculum dans les expériences ultérieures a donc été un paramètre considéré avec attention en dépit de difficultés pratiques à le contrôler.

En pratique, il s'est avéré possible d'injecter de façon effective une cinquantaine d'oeufs de pénéides au stade 1 et 2-cellules à partir de chaque ponte. Ce rendement a été cependant toujours fortement tributaire du taux de fécondation qui est resté très variable

Espèce	Nb d'embryons injectés		inoculum	Survie			
	1-cell.	2-cell.		Stade observé post fécondation	Nb 1-cell.	Nb 2-cell.	témoin (%)**
					(%)*	(%)	
<i>P.i.</i>	12	50	luc****	nauplius (15 h)	2 (42.6)	32 (64.0)	39
	39	0	luc		6 (81.0)	0 (0.0)	19
	4	16	luc		0 (0.0)	0 (0.0)	22
	16	19	luc		2 (21.2)	8 (42.1)	59
	32	43	luc		2 (20.2)	0 (0.0)	31
	6	6	luc	nauplius (10 h)	4 (215.1)	0 (0.0)	31
	17	29	luc		8 (102.3)	12 (41.4)	46
	0	13	luc		0 (0.0)	6 (46.2)	90
	14	24	ADN		8 (61.4)	10 (41.7)	93
	9	9	ADN		7 (108.0)	8 (88.9)	72
	3	12	ADN		0 (0.0)	6 (50.0)	52
	1	12	ADN		0 (0.0)	12 (100.0)	72
	20	13	ADN		2 (18.9)	1 (7.7)	53
	<i>P.m.</i>	13	11		luc	(10 h)	8 (192.3)
<i>A.f.</i>	22	12	luc	morula	18 (81.8)	5 (41.7)	***

* Pourcentage de survie corrigé par rapport au témoin.

** Taux de fécondation parmi des embryons non injectés.

*** impossible à évaluer du fait des pertes à la dissection des femelles

**** lucifer Yellow

Penaeus indicus (*P.i.*), *Penaeus monodon* (*P.m.*), *Artemia franciscana* (*A.f.*).

Tableau 4 : Survie absolue et relative au témoin d'embryons de Crustacés aux stades 1-cellule et 2-cellules.

d'une femelle à l'autre, et ce en dépit du fait que les pontes aient été de rang 1 et donc supposées d'excellente qualité (Aquacop, 1983). Par ailleurs, les volumes délivrés ont été impossibles à contrôler (figures 14A et 14B) car l'ouverture de la microaiguille a été souvent progressivement diminuée du fait de l'accumulation de matériel cytoplasmique après chaque microinjection. Un traitement des aiguilles au silicone (sigmacote) selon un protocole dérivé de (De Pamphilis *et al.*, 1988) n'a pas pu diminuer cette adhérence.

Malgré cet inconvénient technique lié au manque de reproductibilité des volumes microinjectés, les taux de survie obtenus ont montré que la microinjection d'embryons était suffisamment maîtrisée pour être appliquée à des travaux de recherche sur la transgénèse.

4. ELECTROPORATION D'EMBRYONS

Une seconde méthode basée sur des traitements électriques, l'électroporation, a été considérée car elle serait susceptible d'être appliquée à l'introduction d'ADN dans des embryons de Crustacés. L'application d'un champ électrique sur une cellule vivante provoque une hyperpolarisation de la membrane qui, en fonction des caractéristiques du champ électrique, peut conduire à la formation de pores, d'où le terme d'électroporation donné à ce phénomène (annexe 12, figure A) (Zimmeman et Vienken, 1982).

Selon ces auteurs, il se produit des modifications de résistance d'un facteur de 1 à 8 de bicouches lipidiques dont la composition est modifiée. Le modèle électromécanique proposé suggère que la membrane soit une "capacité" contenant un diélectrique de faible constante et que l'accumulation de charges positives et négatives de part et d'autre de la membrane, modifie le potentiel trans-membranaire et comprime la membrane. Lorsque la valeur du champ atteint un seuil, des ruptures localisées apparaissent (pores) et la membrane se décompresse. La réversibilité serait maintenue pour un nombre et une taille réduits de pores par rapport à la surface membranaire totale. Le champ électrique modifierait la conformation des lipoprotéines membranaires en augmentant la perméabilité membranaire.

L'électroporation a été appliquée à divers types de matériel biologique, des lignées cellulaires animales (Teissié et Rols, 1986), des levures (Forster et Erneis, 1985), des bactéries (Shigekawa et Dower, 1988) et dans une moindre mesure à des protoplastes de végétaux variés (Hoffmann et Evans, 1986). Quelques exemples ont été rapportés concernant des oeufs d'Echinodermes (Richter *et al.*, 1981 ; Swezey et Epel, 1989) ainsi que des oeufs de Poissons (Inoue *et al.*, 1991). La finalité de l'électroporation a été généralement d'introduire des molécules à l'intérieur de cellules à la faveur des pores ainsi formés.

L'électrofusion résulte de l'application de champs électriques dont les valeurs des paramètres sont généralement supérieures à celles qui provoquent l'électroporation (Maurel *et al.*, 1989). Dans ces conditions, l'ouverture plus importante des pores peut aboutir à la fusion de membranes en contact et au mélange de cytoplasmes contigus (Zimmermann *et*

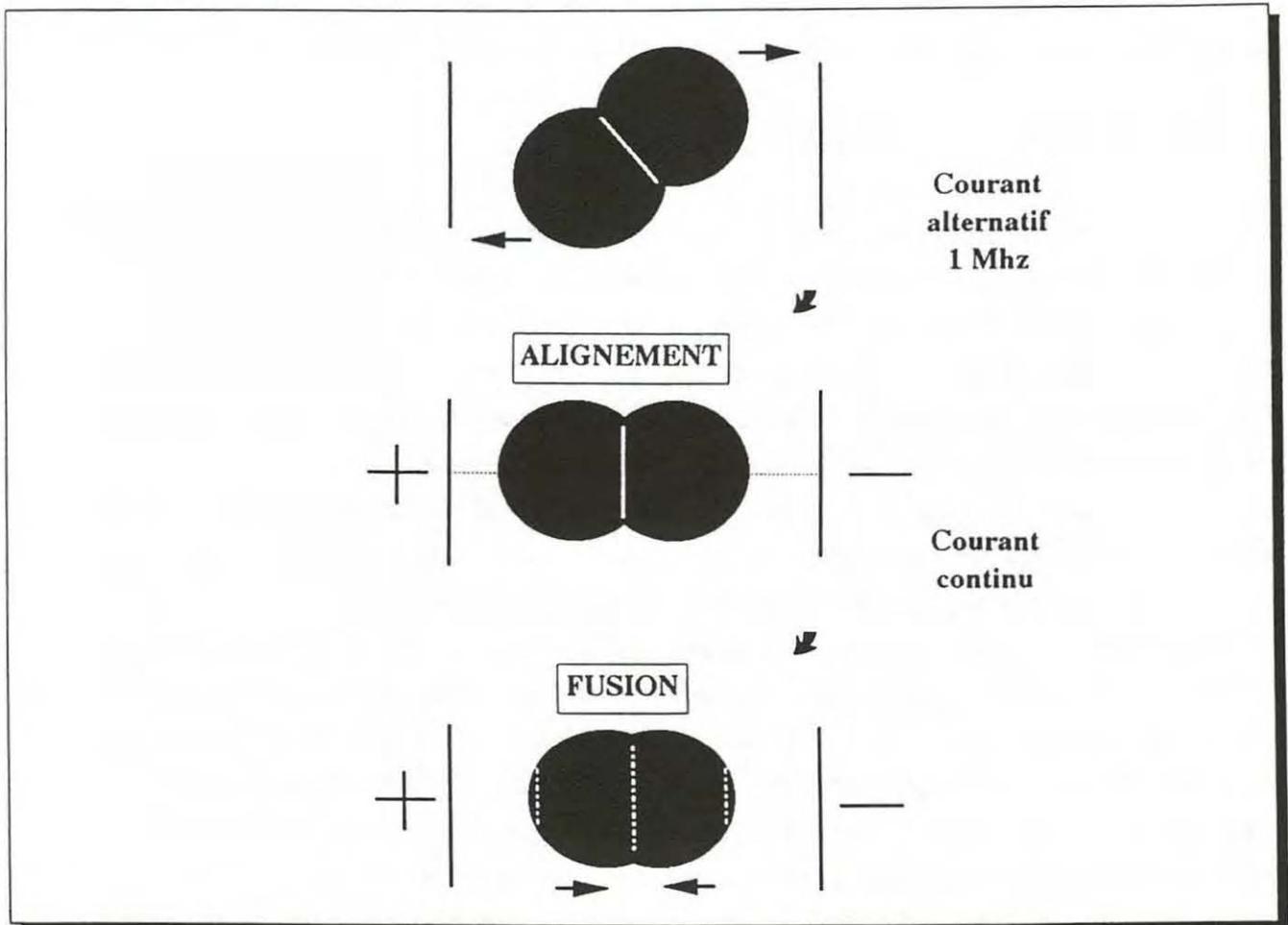


Figure 15 : Evénements consécutifs à l'application de deux types de pulses électriques (alternatif et continu) sur des embryons au stade 2 cellules.

Durée Pulse (μ s)	Pulse 0,1 kV/cm	Pulse 0,3 kV/cm	Pulse 0,5 kV/cm
10			
20		*	*
30		*	*
40	fusion	*	*
50			
60		*	*
70		*	*
80		*	*
90		*	*
99			

- * paramètres non testés
- pas de fusion suivie de divisions
- fusion suivie de divisions
- fusion non suivie de divisions
- fusion suivie d'une rupture membranaire

Figure 16 : Comportement d'embryons d'*Artemia* au stade 2-cellules soumis à différents paramètres électriques.

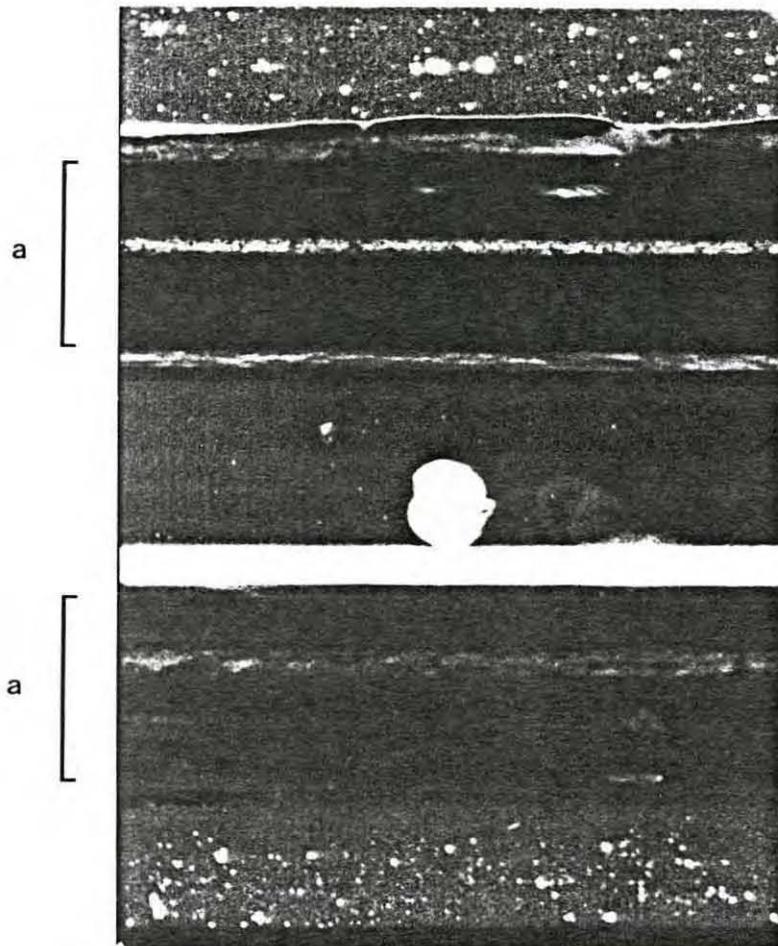


Figure 17 : Fusion des deux premières cellules filles d'un embryon d'*Artemia* quelques minutes après un choc électrique (paramètres d'alignement : 10 sec., 9,5 V à 1 Mhz ; paramètres de choc : 40 μ sec., 100 V/cm^{-1}).

a : électrodes cylindriques (diamètre 1mm).

al., 1985 ; Zimmermann et Vienken, 1982 ; Teissié et Rols, 1986) (annexe 12, figure B). Ce phénomène a par exemple été mis à profit pour la création d'hybridomes qui résultent de la fusion de myélomes et de lymphocytes préalablement mis en contact (Vienken et Zimmermann, 1985 ; Van Duijn *et al.*, 1989 ; Tomita et Tsong, 1990), ou encore dans la création d'hybrides tétraploïdes de deux espèces de pommes de terre (Fish *et al.*, 1988).

Dans le cas de cellules naturellement en contact tels que les deux premiers blastomères d'un embryon, l'application d'un champ électrique peut conduire à la fusion des cellules (figure 15). Chez le lapin par exemple, sur des embryons au stade 2-cellules, Ozil et Modlinski (1986) rapportent des cas d'électrofusion. Les individus ainsi obtenus ont été tétraploïdes. Chez les Mollusques, des phénomènes similaires ont été récemment observés (Cadoret, 1992).

L'électroporation et l'électrofusion résultent de la conjonction d'un ensemble de paramètres, qui incluent l'amplitude du champ électrique, le nombre de pulses et leur durée (annexe 12, figure A). Ces paramètres sont par ailleurs liés aux caractéristiques physico-chimiques des matériels biologiques.

Un champ électrique E est créé par l'application d'une tension U aux bornes de deux électrodes. La puissance de ce champ, qui est fonction de la distance inter-électrodes, est déterminée suivant la formule $E=U/d$ où d est exprimé en cm (Shigekawa et Dower, 1988).

Il résulte de cette formule qu'un rapprochement des électrodes pour un même potentiel U , conduit à l'augmentation du champ électrique créé. Ce champ est un élément clé du processus de formation de pores au travers de la membrane. Son application induit un potentiel membranaire noté V_m et dont la valeur est estimée selon l'équation :

$$V_m = 1,5.r.E \cos(\alpha).$$

où

V_m : Potentiel membranaire

r : rayon de la cellule

E : Champ électrique créé

α : angle du vecteur reliant le centre de la cellule et un point quelconque de la membrane avec le champ E

Il faut cependant noter que cette valeur est pondérée par le temps nécessaire pour atteindre ce champ critique (temps de relaxation) qui est lui-même dépendant des résistances et capacitances spécifiques internes et externes de la membrane.

L'augmentation du champ E porte le potentiel membranaire au delà d'un seuil de rupture conduisant à la formation de pores (annexe 12, figures A et B). Ce phénomène est donc dépendant de la taille de la cellule considérée ainsi que de l'angle α . Il en résulte que le champ E crée un potentiel maximal à l'équateur [$\cos(0)=1$], allant décroissant vers les pôles [$\cos(90)=0$]. Ainsi E détermine-t-il l'angle, et donc la surface concernée par le pulse, alors

que c'est le temps d'application et le nombre des impulsions qui favorisent l'extension des pores.

Chez les cellules animales en culture, les valeurs expérimentales des champs électriques efficaces sont comprises entre 500 à 8000 V/cm appliquées pendant des durées de quelques microsecondes à plusieurs millisecondes, alors que pour les protoplastes, les champs électriques peuvent atteindre 10000 V/cm (Shigekawa et Dower, 1988).

Deux types d'appareillages sont actuellement utilisés pour l'électroporation ou l'électrofusion. Le premier fait appel à la décharge exponentielle d'un condensateur. Le second génère une onde carrée, uniforme pendant la durée du pulse. Les générateurs délivrant ce type de pulses sont considérés comme étant les plus précis (Andreason et Evans, 1988 ; Sauders *et al.*, 1989) (annexe 12, figure C).

Les types d'électrodes varient principalement selon que les expérimentations doivent ou non être observées sous microscope mais aussi selon le nombre des cellules à traiter.

Les dispositifs les plus courants sont de trois formes :

- * (1) des électrodes circulaires concentriques destinées aux expérimentations en plaques de culture cellulaire,

- * (2) des fines électrodes toriques linéaires collées sur une lame de verre destinées à des expérimentations visuellement contrôlée sous microscope sur un petit échantillon,

- * (3) des électrodes en lames parallèles destinées à traiter de grands volumes dans des cuves de type spectrophotomètre.

Le milieu joue enfin un rôle non négligeable dans les processus d'électroporation et d'électrofusion car, selon sa composition, il véhicule le courant avec une plus ou moins grande résistance. Ces milieux sont habituellement choisis parmi des solutions tampons peu ou pas électrolytiques. La nature électrolytique du milieu influe sur son échauffement lors du passage du courant. Ceci se répercute sur la viabilité des cellules électroporées (Ozil et Modlinski, 1986). Les tests pratiqués sur des cellules maintenues dans des solutions de sucres non électrolytiques ont révélé que ces dernières sont adaptées lorsqu'elles sont hypotoniques (Rols, 1989). Parmi les rares exemples connus sur des Invertébrés marins, des résultats d'électrofusion d'ovocytes ont été obtenus en milieu non électrolytique non hypertonique (Richter *et al.*, 1981).

Les expérimentations décrites dans ce chapitre ont eu pour objectif d'analyser l'effet de traitements électriques sur des embryons d'*Artemia*. La fusion de deux cellules embryonnaires étant plus facile à observer et à analyser que l'électroporation d'un embryon unicellulaire, ce sont les paramètres électriques provoquant la fusion des deux premiers blastomères qui ont été établis.

Au préalable, il a été nécessaire de sélectionner un milieu d'électrofusion adapté en l'occurrence à l'embryon d'*Artemia*.

4.1. Sélection d'un milieu d'électrofusion

Différentes solutions ont été testées comme milieu d'électrofusion pour être substitués à l'eau de mer trop ionique. 1981). Plusieurs solutions non conductrices à base de sucre ont été utilisées :

	mannitol 0.3 M	mannitol saturation	glucose 1,2M
conductance	33	34	32
résistance (k Ω)	2,17	2,27	2,17
résistivité (k Ω /cm)	26	27	26

Les oeufs d'*Artemia* sont restés extrêmement fragiles pendant les manipulations dans les milieux non électrolytiques de glucose 1,2 M et celui de mannitol à saturation. Par contre, dans le mannitol 0,3 M, les embryons n'ont pas été altérés pendant les 45 minutes durant lesquelles ils y ont été incubés. Les expériences ont été menées ultérieurement dans ce milieu avec adjonction de BSA (10 %) pour atténuer l'adhérence des oeufs au support.

4.2. Détermination des paramètres d'électrofusion

Des oeufs d'*Artemia* au stade 2-cellules obtenus après dissection de femelles, ont été lavés 3 fois dans le milieu d'électrofusion et placés individuellement entre des électrodes en filaments posés sur la platine d'un microscope inversé (figure 3a). Toutes les manipulations d'embryons ont été réalisées à l'aide d'un microcapillaire étiré au diamètre de l'embryon et relié à un caoutchouc pour une aspiration à la bouche. Afin de suivre l'évolution des embryons après les chocs électriques, ils ont été observés pendant quelques minutes immédiatement après les pulses puis maintenus 4 heures dans le milieu 1. Les électrodes ont été stérilisées à l'alcool entre chaque traitement d'embryons.

La position optimale de 2 cellules pour leur fusion étant la perpendicularité de leur plan de clivage avec le champ électrique produit entre les électrodes, deux traitements électriques distincts ont dû être optimisés induisant respectivement et successivement le pivotement de l'embryon bicellulaire par phénomène de diélectrophorèse (figure 15) et la fusion non-délétère des deux blastomères (figure 15).

La diélectrophorèse décrit le phénomène d'alignement d'un dipôle électrique parallèlement à des lignes de champs créés par un courant alternatif. A la première division mitotique, les deux cellules d'un embryon sont assimilables à un dipôle électrique orientable selon ces lignes de champ entre deux électrodes. Plusieurs séries d'essais de

diélectrophorèse en modifiant le voltage et/ou la durée ont conduit à retenir une valeur de 9,5 Volts à 1 Mhz pendant 10 secondes pour faire pivoter l'embryon vers sa position idéale de fusion. Au cours de ces 10 secondes, les oeufs ont pivoté sur eux-même puis se sont collés à l'une des deux électrodes et sont restés immobiles. Pour des voltages supérieurs, les oeufs se sont orientés instantanément mais d'une façon trop violente pour s'aligner strictement dans le plan recherché. Pour des voltages inférieurs à 7,5 Volts et pour des durées d'application longues de l'ordre d'une minute, les forces qui s'exercent sur l'embryon sont restées insuffisantes pour le faire pivoter.

Après la détermination des paramètres permettant de positionner correctement les embryons, la fusion des blastomères a été recherchée en appliquant différents chocs. Chaque choc électrique a été testé sur 3 embryons. Les paramètres électriques testés ont été compris dans la gamme complète des performances de l'appareil : durée du pulse de 10 à 99 μ sec ; voltage du pulse de 10 à 50 V soit un champ électrique de 100 à 500 V/cm. Le comportement des embryons bicellulaires après les différents paramètres de choc électrique est décrit dans la figure 16. On a ainsi distingué 4 types de réaction à la décharge électrique de fusion :

* (1) l'embryon n'est pas perturbé dans son développement et se divise de façon synchrone avec des oeufs témoins issus de la même femelle qui ont subi les mêmes traitements (changement de milieu et alignement) excepté la décharge électrique de fusion.

* (2) les cytoplasmes des deux cellules fusionnent (figure 17) dans les 20 secondes qui succèdent le pulse pour donner une seule cellule qui se redivise environ 20 minutes après alors que les embryons témoins sont déjà au stade 4 ou 8 cellules.

* (3) les cytoplasmes fusionnent mais aucun clivage ne se produit par la suite et l'embryon se dégrade progressivement. Il est à noter qu'entre 90 et 99 μ sec et pour 100 V/cm, la fusion des cytoplasmes se produit mais avec la particularité de laisser échapper quelques grains de vitellus de part et d'autre de l'embryon.

* (4) les cellules restent séparées mais sont altérées en laissant échapper leurs réserves vitellines dans le milieu.

Par ailleurs, il semble que la résistance des oeufs à un choc électrique ait été dépendante de leur cycle cellulaire. En effet, parmi les oeufs d'une même femelle disséquée quelques instants après l'apparition du premier clivage, les derniers manipulés sont généralement plus robustes et ne présentent pas de réaction à un même choc électrique qu'un embryon juste extrait de l'utérus.

5. BIOLISTIQUE SUR EMBRYONS D'ARTEMIA

La troisième technique adaptée à l'introduction d'ADN dans des embryons de Crustacés a été la biolistique. Le bombardement d'embryons en vue de leur transformation génétique est

Disque de rupture	450 psi	650 psi	900 psi
D = 35 mm	(40%)	(20%)	(10%)
D = 65 mm	(80%)	(60%)	(10%)
D = 95 mm	(99%)	(99%)	(80%)
D = 125 mm	(99%)	(99%)	(99%)

Tableau 5 : Taux de survie d'embryons bombardés en fonction du disque de rupture et de la distance séparant l'écran d'arrêt de l'échantillon.

une technique récente (Sanford, 1992) qui a été surtout utilisée pour améliorer les taux d'intégration d'ADN dans des cellules de plantes réfractaires à *Agrobacterium tumefaciens* et difficiles à traiter par des méthodes plus classiques. L'énergie cinétique des microparticules accélérées permet leur pénétration au travers de barrières relativement épaisses telles qu'un chorion d'oeuf d'insecte (Baldarelli et Lengyel, 1990).

5.1. Essai de bombardement au stade cyste

Ce procédé de biolistique dont le principe est rappelé en Matériel et Méthodes (figure 8), a d'abord été appliqué sur des cystes d'*Artemia* qui sont très faciles à obtenir en grande quantité.

Une première série d'expériences de bombardement a été effectuée sur des cystes décapsulés afin d'étudier l'effet de différents disques de rupture avec une distance minimale de 35 mm entre l'écran d'arrêt et l'échantillon. Quel que soit le disque utilisé (450 à 1800 psi), les cystes examinés à la loupe binoculaire n'ont pas montré de signe d'altération ce qui a suggéré que l'énergie cinétique des particules n'avait pas été suffisante pour traverser la couche de chorion qui a subsisté après la décapsulation.

5.2. Essai de bombardement au stade pré-éclosion

Les bombardements suivants ont donc été appliqués à des embryons plus développés et libérés du reliquat chorionique encore trop résistant aux microparticules. Le stade retenu a été celui d'embryons sortant des cystes mais à un moment où ils sont encore prisonniers d'une membrane qui les empêche d'être nageurs, facilitant ainsi leur collecte et leur manipulation.

L'effet de différents disques de rupture en fonction de la distance (D) de 35 mm à 125 mm entre l'écran d'arrêt et l'échantillon a été analysé, chaque échantillon étant constitué de 5000 embryons. Les taux de survie des embryons bombardés ont été estimés 24 heures après le bombardement (tableau 5).

Ces résultats ont montrés que le stade choisi est bien sensible aux microprojectiles et que plus la déflagration est puissante plus la survie est médiocre tout comme le rapprochement de l'échantillon vers l'écran d'arrêt. Bien que ces valeurs ne nous aient pas renseignés directement sur la pénétration des microparticules, elles ont permis cependant de cerner les meilleurs paramètres susceptibles de fournir le meilleur rapport entre le nombre de particules introduites et la survie. Ainsi, par comparaison avec les résultats obtenus chez des embryons de moustiques bombardés pour lesquels une mortalité de 20 à 40 % doit être atteinte pour correspondre à la détection d'un signal en expression transitoire (Mialhe, comm. pers.), pour les nauplii de Crustacés, les disques 450 et 650 psi et une distance (D)

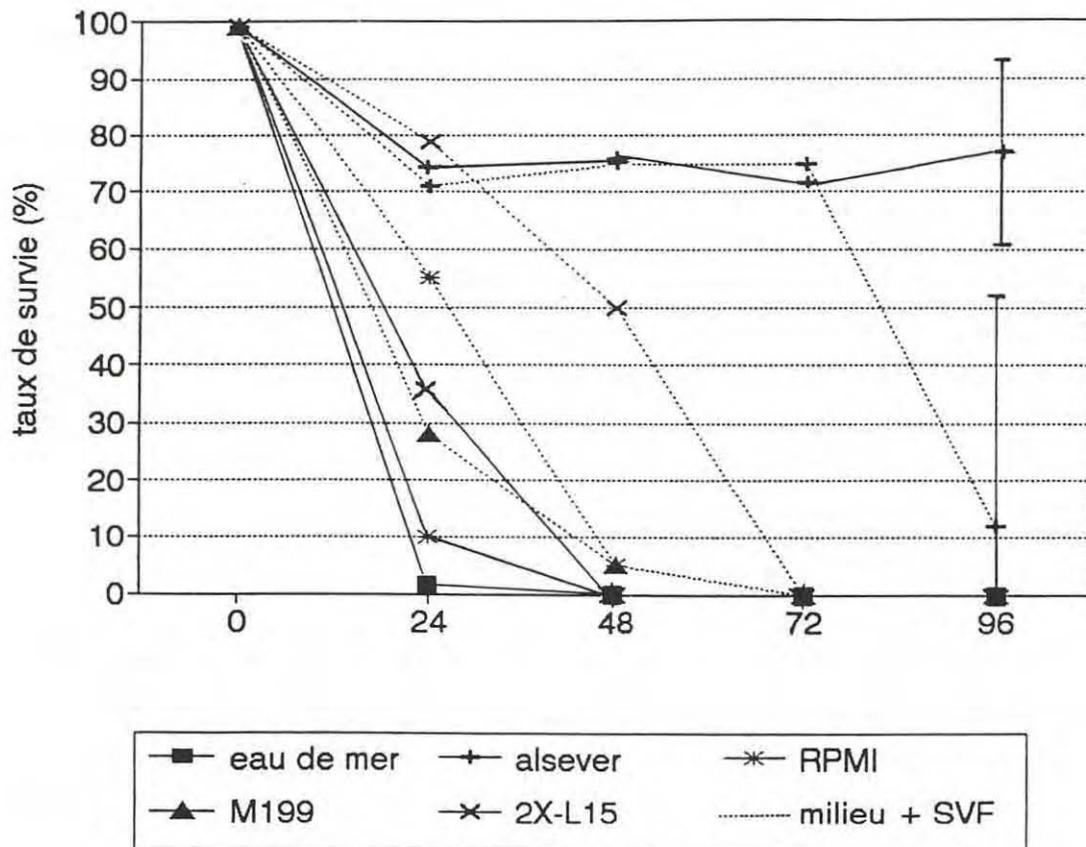


Figure 18 : Taux de survie d'hémocytes de *P. japonicus* maintenus dans différents milieux de culture (eau de mer, Alsever, RPMI, M199 et 2X-L15) avec sérum de veau foetal (SVF) (pointillés) ou sans SVF (traits pleins). Pour l'Alsever avec ou sans SVF, les points sont moyennés et les barres correspondent à l'écart type pour trois réplicats.

de 35 ou 65 mm ont semblé être les valeurs les plus propices pour obtenir une pénétration des microparticules jusque dans le noyau de cellules.

6. MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE LIPOFECTION DES HÉMOCYTES DE *P. JAPONICUS*

Bien que l'introduction et l'intégration d'ADN ne mènent à un animal transgénique que si elles s'effectuent à des stades embryonnaires capables de régénérer un adulte, l'introduction d'ADN dans des cellules somatiques, qui par nature ne peuvent participer à la transmission d'information génétique à la descendance, est utile pour étudier la fonctionnalité de l'ADN et sa régulation d'expression dans ces types cellulaires particuliers.

Ainsi, une quatrième méthode, la lipofection, faisant appel à des lipides de synthèse a été appliquée à des cellules différenciées de *Penaeus*. La lipofection est une méthode répandue de transfection cellulaire qui donne le plus souvent, après une phase d'optimisation des paramètres d'application pour un type cellulaire donné, de bons taux de transformation (80 %). De plus, cette méthode peut s'appliquer aussi bien à des lignées de cellules adhérentes ou en suspension qu'à des cellules maintenues en primoculture (Maurer, 1989).

Chez les Crustacés, aucune de leurs cellules n'étant encore disponible en culture, cette méthode a été appliquée à des cellules primaires du tissu sanguin de *Penaeus*. Ces cellules sont les cellules effectrices de l'immunité chez les Crustacés (Christensen et Nappi, 1988) et la possibilité d'y obtenir des expressions transitoires après transfection pourrait être particulièrement utile pour des travaux sur leur rôle dans les mécanismes de défense.

Un travail préliminaire à la lipofection a été de choisir un milieu de culture pour les hémocytes qui soit compatible avec la durée minimale de survie cellulaire afin qu'un vecteur d'expression puisse s'y exprimer de façon détectable. Chez la majorité des systèmes Vertébrés ou Invertébrés déjà transfectés pour analyser une expression transitoire, cette durée minimale d'incubation est de 24 à 48 heures.

6.1. Sélection d'un milieu de maintien des hémocytes *In vitro*

Différents milieux de culture de cellules de mammifères et la solution d'Alsever, avec ou sans adjonction de SVF, ainsi que l'eau de mer, ont été utilisés et la survie cellulaire a été estimée après 24 heures de culture *in vitro* (figure 18). Parmi les cinq milieux testés (avec ou sans sérum de veau) (voir tableau), les meilleurs résultats en terme de survie ont été obtenus pour les hémocytes maintenus dans l'Alsever sans sérum de veau foetal, avec un taux de survie égal à 75 % après 96h de culture (figure 18). Comparativement, la mise en suspension des hémocytes dans les autres milieux de culture a conduit à une diminution plus rapide des taux de survie. Dans l'eau de mer, le RPMI 1640 et le M199, les hémocytes n'ont

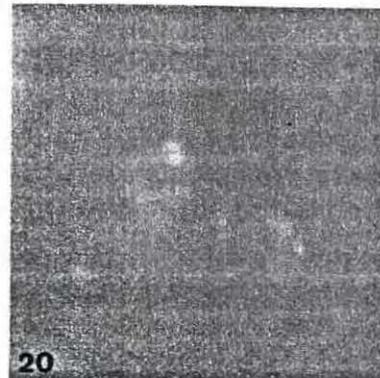
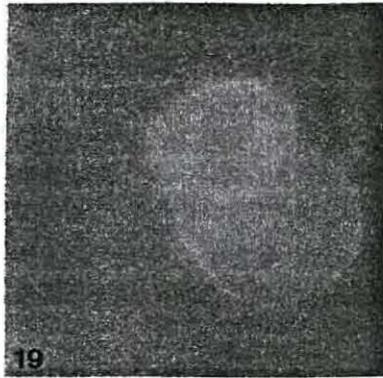


Figure 19 : Hémocytes de *P. japonicus* mis en présence d'un oligonucléotide marqué à la rhodamine (X100).

Figure 20 : Hémocytes de *P. japonicus* mis en présence d'un oligonucléotide marqué à la rhodamine et de liposomes (X100).

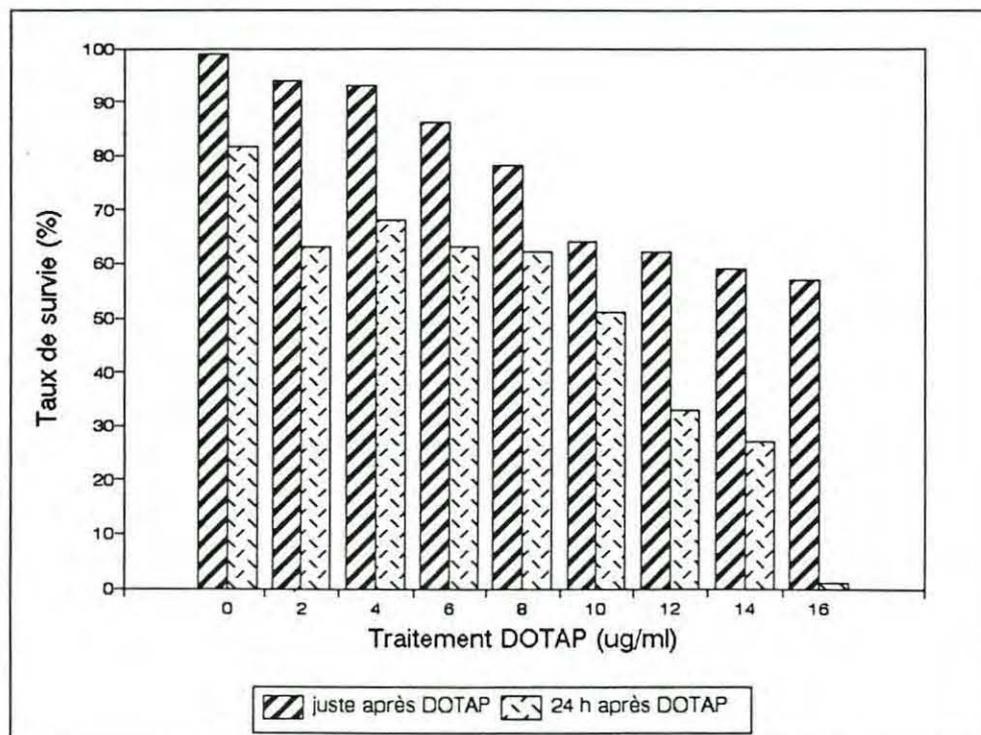


Figure 21 : Taux de survie des hémocytes après un traitement de 4h au DOTAP

plus été viables 24h après leur mise en culture. Pour les milieux 2X-L15, RPMI 1640 et l'eau de mer, l'addition de SVF a significativement prolongé la survie des hémocytes (figure 18). Dans le cas de la solution d'Alsever, l'avantage apporté par le SVF n'a pas été net, et ce même après duplication de l'expérience. La solution d'Alsever sans SVF a donc été utilisée comme milieu de culture pour tester la lipofection en tant que méthode d'introduction d'ADN dans les hémocytes de *Penaeus japonicus*.

6.2. Sensibilité des hémocytes de *P. japonicus* aux liposomes

Avant d'aborder des expériences d'introduction d'ADN par lipofection dans les hémocytes de crevettes, la sensibilité de ces cellules a été testée vis à vis des liposomes en les mettant en présence d'un complexe liposomes – ADN synthétique marqué à la rhodamine. Cette procédure facile à mettre en oeuvre pour détecter en microscopie à épifluorescence la pénétration d'ADN, est similaire à celle développée par Chiang *et al.* (1991) pour montrer le rôle facilitateur des lipides dans le passage d'ADN dans des cellules.

Les oligonucléotides marqués à la rhodamine (ODN*), seuls ou en association avec les liposomes (DOTAP) (tableau 6 : 3 et 4) ainsi que la rhodamine seule (10 μ M) ou associée au DOTAP (tableau 6 : 1 et 2) ont été incubés aux concentrations utilisées par Chiang *et al.* (1991 ; Matériel & Méthodes) pendant 4 heures avec des hémocytes (10⁵ cellules / puits en duplicats). Après l'incubation, les cellules ont été rincées avec de l'Alsever puis observées en microscopie à épifluorescence.

Tableau 6 : Composition des différents milieux (1 à 5) d'incubation des hémocytes.

(signe += présence ; signe - = absence)

	1	2	3	4	5
ODN* 10mM	-	-	+	+	-
rhodamine 10 μ M	+	+	-	-	-
DOTAP 10 μ g/ml	-	+	-	+	-

Dans le témoin (n°5), sans ODN* ni liposomes, aucune fluorescence n'a été détectée. Les profils de fluorescence des hémocytes correspondant à 1, 2 et 3 ont été identiques (figure 19), les cytoplasmes étant faiblement colorés en rouge.

La comparaison fine des profils de fluorescence entre les cellules dans les puits 1 et 2 ont montrés que la rhodamine a pu pénétrer seule dans les hémocytes, son entrée n'étant pas facilitée par les liposomes dans ces conditions expérimentales.

La comparaison des cellules des puits 3 et 4 , a révélé la présence spécifique de spots fluorescents intenses et souvent périnucléaires dans les hémocytes des puits n°4 (figure 20).

Ce résultat indique d'une part que les oligonucléotides marqués seuls, tout comme la rhodamine seule, ont pu entrer dans le cytoplasme (par diffusion passive ou endocytose) et, d'autre part, que les liposomes (DOTAP) ont facilité la pénétration des oligonucléotides dans le cytoplasme sous forme de petites vésicules.

6.3. Seuil de toxicité du DOTAP

Le seuil de toxicité du DOTAP a ensuite été recherché pour une durée d'incubation de 4 heures. Pour cette durée, qui correspond à une valeur moyenne fréquemment utilisée (Felgner *et al.*, 1987), des concentrations croissantes de liposomes (2 à 16 $\mu\text{g/ml}$) ont été utilisées avec une évaluation des taux de survie (test au bleu de Trypan) soit à la fin de l'incubation avec le DOTAP, soit 24 heures plus tard.

Les résultats présentés au travers des histogrammes de la figure 21, montrent qu'au delà d'une concentration en DOTAP de 8 $\mu\text{g/ml}$, la survie hémocytaire à 24 heures a été inférieure à 50 %. Sur la base de ces résultats, la concentration de 8 $\mu\text{g/ml}$ a été retenue pour aborder les expériences de lipofection en présence d'ADN vecteurs d'expression.

7. DISCUSSIONS – CONCLUSION

Modèles biologiques

L'utilisation d'embryons à des stades très précoces du développement étant privilégiée dans les travaux sur la transformation génétique afin d'augmenter les chances d'intégration précoce d'un gène étranger et permettre ainsi une sélection à la génération G0, l'obtention régulière des embryons unicellulaires a donc représenté une étape préalable indispensable à l'ensemble des travaux programmés. La mise au point d'un protocole d'élevage ovovivipare pour l'*Artemia* a permis l'obtention d'embryons unicellulaires manipulables et cultivables *in vitro*. L'avantage majeur des artémies est lié à leur disponibilité dans n'importe quel laboratoire. Cependant, le nombre réduit d'embryons et la lourdeur du protocole de leur obtention ont rapidement conduit à considérer que ce matériel biologique ne serait exploitable qu'à des expérimentations réalisables sur des échantillons numériquement faibles. Pour des études d'expression transitoire par exemple, il est tout à fait envisageable de travailler sur des embryons d'*Artemia* à des stades précoces. Par contre, le développement de ces embryons étant impossible au delà de l'éclosion, des travaux sur la transformation génétique ne pourront pas être développés avec ce modèle. Ceci a motivé la prise en compte d'un deuxième modèle.

Le genre *Penaeus*, en raison de son importance en aquaculture, est celui sur lequel repose la finalité des recherches initiées sur la transformation génétique. Les paramètres

<i>Artemia sp.</i>	
cycle de reproduction	20 à 40 jours
température d'élevage	16°C à 28°C
salinité	0,5% à 20%
lignées	bisexuelles (ratio=1) ou parthénogénétiques
ponte	20 à 30 embryons par femelle
fécondation	interne
développement embryonnaire	in utero
diamètre des ovocytes	220 µm
ovocyte	opaque
gelée corticale	absence après fécondation
zootechnie	bien connue
fréquence des ovocytes	journalières par décapsulations décalées
conservation limitée des embryons en diapause	

<i>Penaeus indicus</i>	
cycle de reproduction	6 mois
température d'élevage	28°C
salinité	3%
lignées bisexuelles	(sex-ratio=1)
fécondation	naturelle en pleine eau
effectif de ponte	150.000 à 300.000 oeufs/femelle
développement embryonnaire	en pleine eau
diamètre des ovocytes	200 µm
ovocyte	opaque
gelée corticale	quelques minutes après la fécondation
zootechnie	bien maîtrisée
fréquence des pontes	journalières par décalage de la photopériode
cryoconservation du sperme uniquement	

Tableau 7 : Caractéristiques biologiques des crustacés *Artemia* et *Penaeus*.

biologiques de l'espèce *indicus* (tableau 7), coïncident avec les besoins expérimentaux dans une problématique de transformation génétique. Les plus importants sont : le taux de fécondité élevé qui facilite grandement un nombre élevé d'expérimentations et le contrôle de la maturité qui permet de disposer quotidiennement de femelles matures tout au long de l'année. Cette disponibilité n'existe bien sûr qu'en zones d'élevage à moins de disposer d'une infrastructure adaptée, ce qui n'a pas été le cas pour le présent travail et nous a conduit à devoir réaliser les expérimentations à l'extérieur du laboratoire.

Le développement embryonnaire a été précisé, notamment la durée du stade unicellulaire. Bien que celle-ci se soit avérée brève et malgré l'impossibilité apparente de pouvoir la prolonger artificiellement en modifiant les températures d'incubation, diverses méthodes d'introduction d'ADN ont pu être pratiquées et d'autres sont envisagées, que ce soit la microinjection ou a *fortiori* des méthodes de transformations "collectives" et plus rapides telles que l'électroporation et la biolistique.

Microinjection

A l'origine, les premiers travaux d'introduction d'ADN chez les Invertébrés ont été menés chez *Drosophila* par simple incubation d'embryons dans des solutions d'ADN. Une amélioration des rendements de transformation a été rapidement recherchée notamment au travers de la microinjection (Germeraad, 1976). Cette technique, si elle n'a autorisé l'injection que d'un nombre restreint d'individus, a par contre permis d'exercer un contrôle sur les volumes injectés dans le *syncytium* embryonnaire de ces animaux. Les taux d'intégration dans le génome ont aussi été grandement augmentés d'autant plus que des systèmes de type transposon étaient disponibles (Engels, 1983 ; Finnegan et Fawcett, 1986). Cette technique a ensuite été appliquée pour transformer des Echinodermes (McMahon *et al.*, 1984a), des Nématodes (Stinchcomb *et al.*, 1985) et des Insectes (Miller *et al.*, 1987 ; McGranne *et al.*, 1988). Dans de rares cas, la transformation a été associée à une intégration dans le génome mise en évidence par Southern. Plus généralement, l'ADN reste sous forme extrachromosomique. Chez les Crustacés, la microinjection d'embryons constituait un domaine vierge.

La technique de microinjection, quoique complexe par l'appareillage qu'elle nécessite, s'est avérée facilement applicable aux embryons d'*Artemia* et de *Penaeus* en dépit du durcissement rapide de la membrane externe. Ce phénomène, qui survient après la dépolarisation membranaire et l'émission des granules corticaux comme chez la plupart des Crustacés (Goudeau et Goudeau, 1986), aurait pu représenter une barrière impénétrable pour une microaiguille finement étirée. L'opacification de cette membrane et la grande quantité de vitellus sont par contre définitivement des paramètres empêchant la microinjection dans les pronuclei comme cela est pratiqué chez la souris (De Pamphilis *et al.*,

1988), ce qui rendra impossible l'intégration précoce d'ADN, des individus transgéniques en mosaïques pouvant être obtenus dans le meilleur des cas en G0.

La reproductibilité du protocole de microinjection établi ici pour *P. indicus*, *P. monodon* et *Artemia* s'est avérée fortement dépendante du procédé de fabrication de l'aiguille mais surtout de son obturation progressive par du cytoplasme. En se répercutant sur le volume inoculé, ceci a montré combien la microinjection est largement empirique quoique parfaitement applicable à différentes sortes d'inoculum. Il faut en particulier retenir les expérimentations en pathologie infectieuse des crevettes rendues possibles par cette technique, qu'il s'agisse de la microinjection de virus et leur embryoculture, ou la coinjection de virus et d'oligonucléotides antisens afin d'étudier l'effet de ces derniers sur la réplication virale.

Des essais de microinjection menés sur des stades 4-cellules et au-delà ont montré que la limitation d'application de la microinjection aux stades uni et bi-cellulaires tient d'avantage au fait qu'après ces stades, le trou créé par l'aiguille dans la membrane chorionique ne se referme pas, ce qui conduit à la mort de l'embryon plutôt qu'à l'impossibilité d'introduire l'aiguille au travers de la membrane durcie. De plus, le volume des cellules diminuant à chaque mitose, celles-ci deviennent de plus en plus sensibles à l'inoculum. Les travaux sur la transformation génétique basée sur la microinjection devront donc être réalisés sur les stades uni ou bi-cellulaires.

La transformation génétique par réimplantation dans l'embryon pluricellulaire de cellules totipotentes préalablement transfectées (Baribault et Kemler, 1989) apparaît difficilement applicable chez les Crustacés en raison de l'enveloppe embryonnaire incompatible avec la microinjection d'éléments de la taille d'une cellule. Des essais pourraient néanmoins être réalisés avec des aiguilles à grande ouverture et biseautées pour injecter non plus une solution dans une cellule mais une cellule au milieu d'autres cellules. Des travaux de ce type ont été récemment publiés chez des Insectes, les cellules microinjectées étant des spermatozoïdes (Sawa et Oishi, 1989). Par ailleurs, des méthodes adaptées à la transfection de cellules embryonnaires devront dans ce cas être spécifiquement développées.

Electroporation

Les expériences rapportées ici ont eu pour but de montrer qu'un traitement électrique à des embryons de Crustacés induit des modifications de leurs membranes correspondant aux phénomènes d'électroporation ou d'électrofusion de cellules adjacentes.

Dans le cas du Crustacé *Artemia franciscana*, le stade 2-cellules a été exclusivement traité. En effet, ce stade a permis simplement d'interpréter l'impact des divers chocs électriques administrés par visualisation directe de la fusion des blastomères. Dans la

chambre d'électrofusion utilisée, les embryons ont été traités et observés individuellement, ce qui rendait particulièrement précise l'analyse de leur développement ultérieur.

Le travail préliminaire chez l'*Artemia* a permis de vérifier l'absence d'effets délétères de solutions non électrolytiques sur le développement des embryons. La solution de mannitol 0,3 M qui a été retenue est faiblement hypotonique par rapport à celle d'élevage (485 mOsm) et ceci pourrait favoriser l'entrée par osmose de solutés lors d'expériences ultérieures d'électroporation pratiquées notamment avec de l'ADN.

L'extrapolation de cette technique aux embryons de *Penaeus* n'a pas été réalisée car l'équipement n'appartenait pas à l'IFREMER et ne pouvait donc être transporté. La membrane chorionique qui durcit rapidement après la réaction corticale, pourrait présenter à ce titre un obstacle à l'application de chocs électriques au vue de l'introduction de molécules telles que de l'ADN dans les embryons de *Penaeus*.

Outre l'intérêt potentiel en transformation génétique, des traitements électriques sur les Crustacés pourront être utilisés à des fins cytogénétiques. En effet, à l'instar des études sur l'effet d'agent physiques ou chimiques pour manipuler le génome des plantes, des Poissons (Arai et Wilkins, 1987 ; Chourrout, 1984), des Mollusques (Allen, 1986 ; Gendreau et Grizel, 1991 ; Cadoret, 92) ou plus récemment des pénéides (Peeters, 1990), il sera intéressant de procéder à la polyploïdisation de Crustacés par fusion des premiers stades méiotiques ou mitotiques notamment en utilisant un préalignement des ovocytes par diélectrophorèse.

Il est à noter enfin que chez *Artemia*, certains embryons ont résisté au choc électrique. C'est un phénomène qui a été aussi observé chez des embryons de mammifères pour lesquels des fusions ont été réalisées pour étudier le phénomène de tétraploïdie (Kubiak et Tarkowski, 1985). Un faible pourcentage d'embryons totalement réfractaires ne fusionnent jamais même après des traitements multiples et intenses (Ozil, comm. pers.). Dans ce type de réponse, peu mentionné dans la littérature, l'oeuf semble être isolé électriquement et aucune désorganisation ne semble se produire que ce soit sur le réseau microtubulaire du cytosquelette ou sur d'autres structures internes de l'oeuf.

Du fait de l'indisponibilité de l'appareillage électrique, aucune expérimentation n'a été menée pour introduire de l'ADN par électroporation. Les protocoles et paramètres établis ici constituent néanmoins des éléments utiles pour poursuivre de tels travaux.

Biolistique

La dépression de vide à l'intérieur de la chambre de bombardement a été initialement prédéterminée par référence aux travaux effectués sur les cellules animales, et ensuite testé directement en vérifiant l'absence d'effet délétère (Sandford *et al.*, comm. pers.). Le vide, qui ne doit pas être trop important afin de ne pas endommager les cellules, doit cependant être suffisant afin de ne pas réduire la vitesse des projectiles et atténuer l'onde de choc due à

l'augmentation brutale de pression d'hélium dans la chambre de réaction. Concernant le choix du matériau, les microparticules de tungstène n'ont pas été retenues à cause de sa toxicité potentielle (Russel *et al.*, 1992) et de la plus grande hétérogénéité de taille des particules. La préparation des supports s'est avérée délicate et constitue un paramètre important de variabilité observé au sein de chaque expérience. En effet, une régularité de dépôt des particules a été très difficile à réaliser. En dépit de cette variabilité d'un tir à l'autre, la biolistique peut néanmoins entrer dans les méthodes efficaces d'introduction d'ADN simultanément dans des pools de plusieurs centaines d'embryons.

Lipofection

Dans une voie complémentaire à la transformation génétique d'embryons, la transfection de cellules pour explorer l'expression transitoire au niveau d'un type cellulaire particulier, a pu être abordée au travers de la lipofection de cellules.

Parmi les différents types cellulaires qui pouvaient être considérés pour développer une méthode de transfection, celui correspondant à des cellules différenciées d'organes tels que l'hépatopancréas ou l'hépitélium branchial est pratiquement impossible à établir en primocultures sans de nombreux microorganismes contaminants (Mialhe, comm. pers.). Les cellules embryonnaires constituent un second type cellulaire intéressant en raison de leur caractère peu différencié. Alors que de telles expérimentations auraient pu être facilement réalisées dans des zones d'élevage, il n'a pas été possible au laboratoire de disposer d'un stock de géniteurs de pénéides ni de structures d'élevage nécessaires à leur maturation et à l'obtention de pontes. C'est pourquoi les travaux de transfection de cellules de crevettes ont porté sur les hémocytes qui peuvent être prélevés aseptiquement sans sacrifice de l'animal donneur et sans dissociation tissulaire préalable.

Compte tenu de l'absence d'informations relatives aux milieux de culture d'hémocytes de crevettes, des expériences préalables ont été nécessaires pour en sélectionner un permettant une survie cellulaire compatible avec une éventuelle expression transitoire de construits d'ADN transfectés. Sur la base de tests de viabilité utilisant le colorant vital bleu de Trypan, il s'est avéré que dans une solution isotonique d'Alsever, la majorité des hémocytes est restée viable au moins quatre jours, ce qui est supérieur à la viabilité observée dans le milieu 2X-L15 qui a été utilisé par Chen (comm. pers.). Par ailleurs, Soderhall (comm. pers.) a montré que l'activité de transcription d'hémocytes d'écrevisse n'est pas inhibée dans cette solution, les cellules perdant cependant leur capacité d'adhésion.

Parmi les techniques de transfection couramment pratiquées, celle qui est basée sur l'utilisation de liposomes cationiques de types lipofectin (DOTAP) est particulièrement performante et présente de nombreux avantages expérimentaux, notamment la facilité de manipulation, la faible toxicité aux doses efficaces et la grande reproductibilité, qui ont été

discutés par Felgner *et al.* (1987). Ceci nous a conduit à la retenir préférentiellement à d'autres techniques de transfection cellulaire, en raison notamment du comportement fusogène du DOTAP avec les membranes plasmiques qui résulte en une introduction cytoplasmique d'ADN court-circuitant les lysozomes et les nucléases associées (Felgner *et al.*, 1987). Plusieurs paramètres de lipofection (durée d'incubation, densité cellulaire, etc...) ont été choisis sur la base des travaux réalisés sur différentes lignées cellulaires (Felgner *et al.*, 1987), et notamment la lignée d'insecte Sf 9 (Mounier, comm. pers.). Par contre, l'effet de la concentration en DOTAP sur le taux de survie hémocytaire a dû être déterminé et la valeur retenue (8 $\mu\text{g/ml}$) correspond à celle généralement employée pour les cellules animales. Des expériences ont ensuite permis de confirmer la transfection par visualisation directe de l'internalisation d'oligonucléotides marqués à la rhodamine.

CHAPITRE 2 :

ETUDE DE L'EXPRESSION DE GENES "REPORTERS" DANS DES CELLULES ET DES EMBRYONS DE CRUSTACES



Vecteur d'expression	Origine	Lignée cellulaire témoin	Hémocytes <i>P. japonicus</i>
hsp 70 (Dr-lacZ)	Drosophile	<i>Drosophila melanogaster</i>	pas d'expression
Actine-β	Drosophile	"	pas d'expression
Actine 3 cytoplasmique (A3-β)	Bombyx	Sf9	pas d'expression
CMV-β	virus (Cytomégalo)	COS	pas d'expression
Ad-β	virus (Adéno)	lymphoblastomes *	pas d'expression
Tk-β	virus (HSV)	lymphoblastomes *	pas d'expression
SV40-β	virus (SV40)	COS	pas d'expression
IE1-β	virus (AcNPV)	Sf9	pas d'expression

* non testé au laboratoire (McGrégor et Caskey, 1989)

Tableau 8 : Résultat d'expériences d'expression transitoire de différents vecteurs d'expression du gène *lac-Z* après lipotransfection de systèmes cellulaires de référence (*) et d'hémocytes de *P. japonicus*.

1. INTRODUCTION

Après l'introduction d'ADN au moyen de l'une des méthodes précédemment développées, deux phénomènes pouvaient être attendus, à savoir l'expression et/ou l'intégration de cet ADN. L'intégration, qui correspond à un événement rare, est intéressante lorsque l'ADN intégré s'exprime. Dans la majorité des cas, l'ADN n'est pas intégré mais il est susceptible de s'exprimer de façon transitoire. L'étude de cette expression est une étape importante dans les recherches relatives à la transformation génétique. L'expression dépend essentiellement du promoteur sous le contrôle duquel est placé le gène introduit mais aussi de l'environnement moléculaire au sein de la cellule transfectée. Comme cela a été mentionné dans le rappel bibliographique, aucun promoteur d'*Artemia*, de *Penaeus* ni d'aucun autre Crustacé n'a été caractérisé. En l'absence de promoteur homologue, il est donc apparu nécessaire de tester des promoteurs hétérologues susceptibles de fonctionner chez *Artemia* et/ou *Penaeus*. Ainsi, dans ce deuxième chapitre, plusieurs promoteurs hétérologues ont été testés à l'échelle de cellules ou d'embryons. Des promoteurs issus d'Insectes ont été utilisés (ceux d'hsp70 de drosophile et d'actine cytoplasmique d'Arthropodes) ainsi que des promoteurs viraux qui fonctionnent dans des cellules de mammifères mais aussi d'Insectes.

2. RECHERCHE D'UNE EXPRESSION TRANSITOIRE A L'ECHELLE CELLULAIRE

2.1 Lipotransfection d'hémocytes de *P. Japonicus*

Sur la base des meilleurs paramètres qui ont permis d'obtenir un taux de survie des hémocytes estimé à 75 % 48 heures après la lipofection, l'expression transitoire de différents vecteurs plasmidiques du gène *lac-Z* codant pour la β -gal bactérienne, a été recherchée.

Dans un premier temps, les constructions que nous avons utilisées ont été validées dans des systèmes cellulaires permettant leur expression. La détection du produit d'expression du gène *lac-Z* a été réalisée par la méthode histochimique décrite par Mc Grégor (Matériel et Méthodes).

Les vecteurs contenant un promoteur d'actine cytoplasmique de *Bombyx* (pA3- β) et celui d'une ADN-polymérase virale dont le fonctionnement est indépendant de la présence du virus (pIE1- β) ont ainsi été exprimés sur une lignée cellulaire de l'insecte *Spodoptera frugiperda* (Sf 9) en utilisant les paramètres optimaux de transfection communiqués par Mounier et Orhesser (comm. pers.).

D'autres vérifications ont eu lieu sur une lignée de *Drosophila melanogaster* pour le vecteur Actine Droso- β et une lignée COS pour les vecteurs CMV β et SV40 (tableau 8).

La méthode histochimique de détection étant ainsi reproduite et la fonctionnalité des vecteurs vérifiée, il a fallu modifier l'osmolarité des réactifs pour l'adapter à celle du milieu

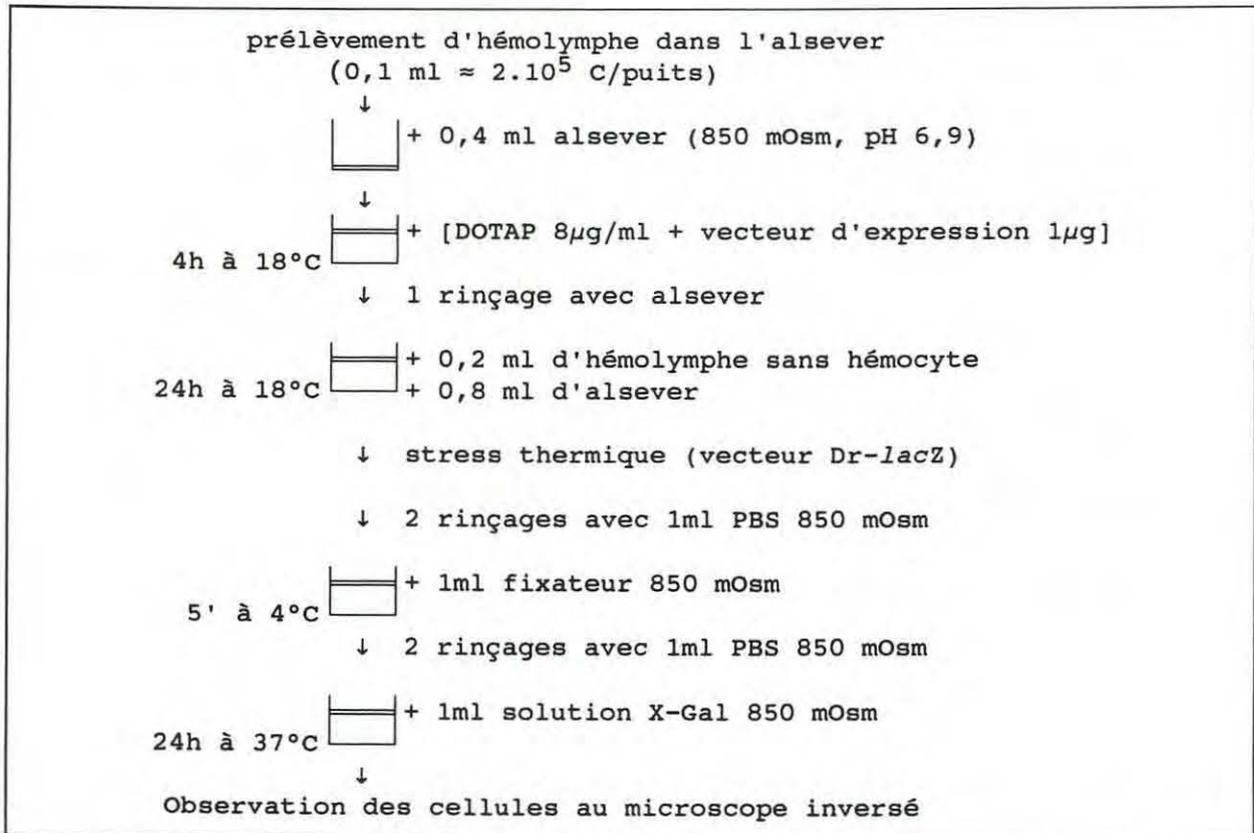


Figure 22 : Protocole de lipotransfection et de détection histochimique de l'activité β -galactosidase adapté à des hémocytes de *Penaeus japonicus*.

des hémocytes. En effet, une expérience préliminaire de fixation des hémocytes avec le fixateur préconisé par McGrégor (300 mOsm), a fait éclater les hémocytes. Du NaCl a donc été systématiquement ajouté au PBS, au fixateur et à la solution de coloration X-Gal pour atteindre l'isotonie à 850 mOsm.

En résultat, parmi les vecteurs d'expression de la β -gal qui ont été lipofectés dans les hémocytes de *P. japonicus* quelques minutes après leur prélèvement (A3 β , Actine Drosoph, CMV β , SV β , Ad β , Tk β , Dr-*lac-Z*, IE1 β) (protocole décrit en figure 22), aucun n'a entraîné de coloration bleue que ce soit après 24 ou 48h d'incubation.

Il en a été de même avec des hémocytes lipofectés avec le plasmide thermoinductible Dr-*lac-Z* et testé 48h plus tard après avoir été préalablement soumis à un choc thermique (30 minutes à 30°C, 35°C ou 40°C puis 2 heures à 20°C).

3. EXPRESSION TRANSITOIRE DE GENES MARQUEURS A L'ECHELLE DE L'ANIMAL.

3.1. Application de la microinjection d'ovocytes de *P. indicus* au testage du promoteur viral CMV contrôlant le gène codant pour la β -galactosidase

Un premier travail a été de mettre au point une méthode simple de détection fiable et sensible de la β -galactosidase qui soit applicable à des embryons. La technique d'immunofluorescence (Matériel & Méthodes) a été sélectionnée car elle permet de détecter de très faibles quantités de protéines directement à l'échelle cellulaire. Au préalable, étant donné l'existence d'activité endogène de type β -galactosidase dans des tissus d'organismes, il a été nécessaire de vérifier que des frottis de larves non injectées étaient négatifs pour la détection d'antigènes de type β -galactosidase selon un test en immunofluorescence.

Ensuite, le protocole de microinjection précédemment établi a permis d'injecter le plasmide CMV-*lac-Z* (linéarisé par *EcoRI*, utilisé à 0,92 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ TE soit environ 65000 copies de 7 kb pour un volume injecté de l'ordre de 0,5 pl) (tableau 4).

Vingt cinq nauplii sur 54 injectés avec ce plasmide, ainsi que d'autres embryons injectés avec du TE ou non injectés, ont été analysés en immunofluorescence entre 9 et 12 heures après l'injection pour la présence d'antigènes de type β -galactosidase. Par comparaison avec les frottis témoins (figure 23a), quelques cellules (environ 15 par frottis) de larves nauplii injectées avec CMV- β ont présentés une fluorescence verte nette indiquant une expression de gène *lac-Z* sous le contrôle du promoteur viral CMV (figure 23b).

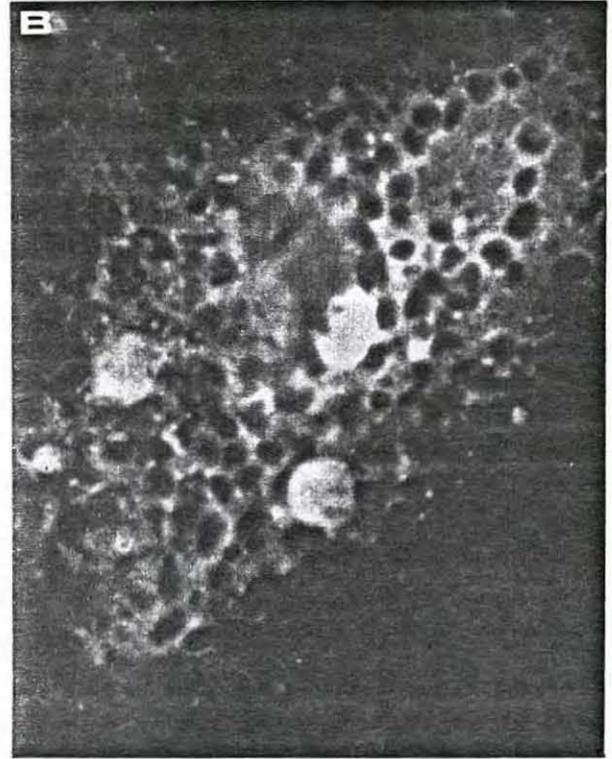
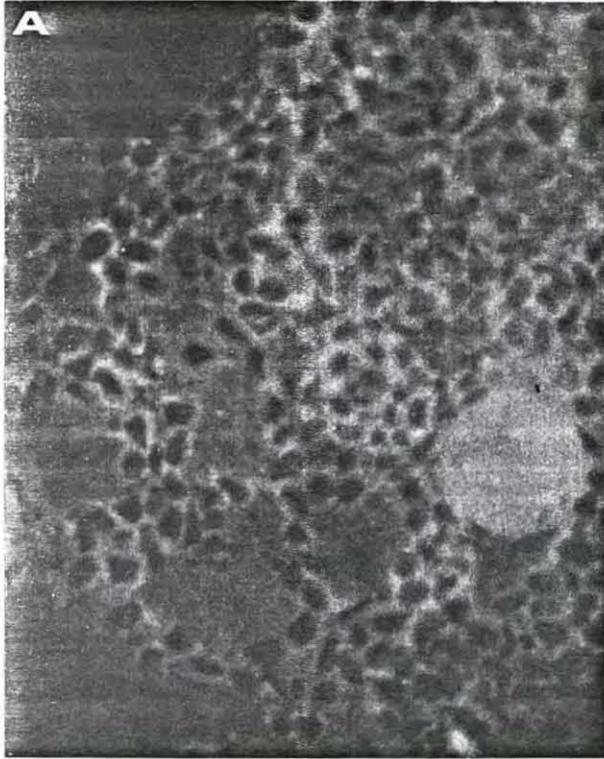


Figure 23 : Frottis d'embryons microinjectés au stade 1-cellule et analysés 10 heures après en immunofluorescence pour la présence d'antigènes β -galactosidase.

A : témoins injectés avec du TE ou non injecté.

B : embryons injectés avec le plasmide CMV- β linéarisé injecté.

3.2. Application du bombardement d'embryons d'*Artemia* au testage du promoteur hsp70 de *Drosophila* contrôlant le gène marqueur codant pour la luciférase

Les résultats présentés ci-après font l'objet d'une publication (annexe 13) soumise à *Aquaculture* et intitulée : "Transient expression of luciferase reporter gene after biolistic introduction into *Artemia franciscana* (Crustacea) embryos". Gendreau *et al.*

Les premières expériences de bombardement précédemment décrites qui ont permis sur la base de critères de survie de déterminer un stade embryonnaire cible préférentiel ont été réalisées avec des microparticules d'or (1 μm) recouvertes d'ADN (10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'or/bombardement). L'ADN choisi a été le vecteur d'expression Dr-luc (promoteur hsp70 de drosophile en amont du gène luciférase de luciole). Ce promoteur fonctionne en effet dans divers systèmes biologiques hétérologues comme les mammifères et les plantes (Robert *et al.*, 1990 ; Schmulling *et al.*, 1989). Le profil de choc thermique utilisé pour le stimuler a été arbitraire en correspondant à celui habituellement pratiqué sur les cellules d'Insectes ou plus récemment sur des embryons d'Insectes, soit 30 minutes à 41°C (Sakai et Miller, comm. pers.).

Pour les deux premières expériences menées sur des cystes décapsulés, un stress thermique a été appliqué 8 heures après le bombardement. L'analyse en luminométrie n'a donné aucun signal renforçant ainsi l'idée que les cystes n'avaient pas été pénétrés par les billes d'or.

La troisième expérience a été réalisée sur des embryons au stade de pré-éclosion. Les résultats d'analyse en luminométrie étant indiqués dans le tableau 9.

L'obtention de valeurs significatives en luminométrie montre que le promoteur de drosophile est fonctionnel chez *Artemia*, tout au moins au stade bombardé. Parallèlement aux analyses en luminométrie, un contrôle bactériologique par étalement d'un broyat tissulaire sur milieu gélosé a été fait sur des embryons bombardés avant l'homogénéisation dans le tampon de lyse et a permis de vérifier l'absence de microorganismes éventuellement transfectés.

L'absence de valeurs positives pour des distances (D) supérieures à 35 mm a mis en évidence la relation entre la vitesse et la distance couverte par les projectiles. Parmi les valeurs positives d'activités luciférase, celles correspondantes au meilleur taux de survie ont été obtenues avec un disque de rupture de 450 psi.

Afin de préciser l'effet du disque de rupture sur l'introduction d'ADN et le taux d'expression du vecteur dans les larves d'*Artemia*, plusieurs bombardements ont été effectués pour les trois types de disques précédemment testés et ce avec une même distance (D= 35 mm). L'effectif des échantillons a été de 10000 larves. Les résultats obtenus (tableau 10) indiquent que l'activité luciférase pour un même disque est variable d'un échantillon à l'autre. Ceci a

Disque de rupture	450 psi	650 psi	900 psi
D = 35 mm	0.640*(40%)	0.361*(20%)	0.485*(10%)
D = 65 mm	0.250 (80%)	0.275 (60%)	0.290 (10%)
D = 95 mm	0.261 (99%)	0.259 (99%)	0.273 (80%)
D = 125 mm	0.250 (99%)	0.243 (99%)	0.254 (99%)

Tableau 9 : Activités luciférase spécifiques (*) et taux de survie (valeurs entre parenthèses) des lysats de 5000 larves nauplius bombardées puis stressées thermiquement (41°C, 30 mn) 8 heures après, en fonction du disque de rupture et de la distance (D) séparant l'écran d'arrêt et les larves.

Disque de rupture	450 psi	650 psi	900 psi
échantillon 1	4.165*	1.277*	0.846*
2	2.383*	3.385*	1.788*
3	1.737*	2.737*	1.599*
4	1.854*	1.168*	2.087*
moyenne (écart)	2.535(±1.122)	2.141(±1.095)	1.580(±0.529)

Tableau 10 : Activités luciférase spécifiques (*) de lysats d'embryons stressés thermiquement 1 jour après leur bombardement, en fonction de 3 disques de rupture.

Temps post-bombardement	12 heures	24 heures	48 heures
échantillon 1	0.404*	0.341*	0.215
2	0.416*	0.426*	0.219
3	0.373*	0.333*	0.216
4	0.278	0.266	0.224

Tableau 11 : Analyse de la cinétique d'expression de l'activité luciférase.

reflété l'hétérogénéité des macrosupports lors de leur réalisation. Parmi les trois types de disques utilisés, celui de 900 psi a engendré les plus mauvais taux d'expression. Bien que les valeurs moyennes d'activité luciférase aient été très proches pour les disques 650 et 450 psi, ce dernier type de disque a été retenu car la survie embryonnaire a été meilleure.

Sur la base de ces résultats, le disque de 450 psi et une distance $D = 35$ mm ont donc été utilisés pour représenter une analyse cinétique de l'expression de luciférase. Pour cela, 12 échantillons de 3000 larves environ ont été bombardés. Ils ont été analysés en trois groupes de quatre, 12 heures, 24 heures et 48 heures après. Les résultats montrés dans le tableau 11, ont indiqué que l'activité luciférase n'est plus détectée dans les échantillons analysés à 48 heures, ce qui suggère une nature transitoire de l'expression (enregistrée à 12 et à 24 heures).

4. DISCUSSIONS - CONCLUSION

Application de la lipofection

Plusieurs types de construits correspondants au gène rapporteur *lac-Z* placé sous le contrôle de différents promoteurs hétérologues ont été transfectés et analysés du point de vue de leur expression transitoire selon une technique histochimique. Celle-ci a été choisie pour sa sensibilité de détection d'une activité enzymatique à l'échelle d'une cellule.

Quel que soit le promoteur considéré, aucune activité β -galactosidase n'a été mise en évidence. Pourtant, du fait de la conservation évolutive de la réponse des organismes à un stress, le promoteur du gène codant pour la protéine hsp 70kD de *Drosophila melanogaster* a été utilisé avec succès pour contrôler l'expression de gènes dans des cellules aussi diverses que celles du tabac (Schmulling et al., 1989) ou de la souris (Robert et al., 1990 ; Heikkila et al., 1986 ; Bensaude, comm. pers.). Ce promoteur, inclus dans le plasmide Dr-*lac-Z*, était donc susceptible de fonctionner chez les Crustacés. De plus, dans le tissu cellulaire choisi, l'activité des promoteurs endogènes de la famille heat-shock a déjà été induite chez d'autres Invertébrés marins (Sanders, 1988 ; Steinert et Pickwell, 1988).

Face à ces résultats négatifs, compte tenu que dans le milieu utilisé (850 mOsm), la β -galactosidase est fonctionnelle (Cadoret, comm. pers.), plusieurs hypothèses peuvent être formulées et peut-être à considérer simultanément :

- (1) Une non-pénétration du substrat qui pourrait être vérifiée par l'emploi d'une technique immunologique *in situ* ou enzymatique par exemple sur un extrait cellulaire.
- (2) Une perte de fonctionnalité des hémocytes consécutive à leur maintien *in vitro*, en dépit de leur viabilité. Chez les bivalves marins par exemple, dans le cadre de l'étude de mécanismes microbicides phagocytaires, il a été montré par la technique de chimioluminescence que des hémocytes d'huître perdent leur capacité à générer des

radicaux toxiques de l'oxygène au delà de deux heures de maintien *in vitro* (Boulo *et al.*, 1991).

(3) Une non-fonctionnalité des promoteurs traduite par des anomalies dans des processus post-transcriptionnels (annexe 14) qui nécessiteraient pour être testées de développer des techniques de type Northern, Western blot ou d'immunohistologie.

Néanmoins, disposant de cette technique de lipofection, il pourrait être envisagé d'étudier d'autres promoteurs y compris dans d'autres types de cellules que les hémocytes.

A propos des promoteurs, outre le testage d'autres promoteurs hétérologues, certaines séquences promotrices pourraient être rapidement caractérisées chez l'*Artemia* puisque des gènes y ont déjà été clonés avec une connaissance de leur profil d'expression comme le gène *ras* (Diaz-Guerra *et al.*, 1989) et le gène d'actine (Sastre *et al.*, 1989 ; Macias et Sastre, 1990). Enfin, la caractérisation de promoteurs inductibles reste très séduisante dans la possibilité qu'elle offrirait de faire exprimer un gène à un moment choisi pendant une durée déterminée. A ce titre, le promoteur *hsp70* de Crustacé mérite d'être isolé et son fonctionnement caractérisé.

Concernant les types cellulaires transfectables chez les Crustacés, du fait de la limite imposée par les problèmes de culture cellulaire rencontrés chez les Crustacés, des cellules embryonnaires moins différenciées pourraient être utilisées comme système d'étude de l'expression. Dans ce but, la transfection d'embryons a été entreprise selon les techniques de microinjection et de biolistique.

Application de la microinjection

Le vecteur d'expression injecté dans des embryons de *Penaeus indicus* a été un promoteur hétérologue d'origine virale (CMV) dont l'efficacité avait été établie chez différentes espèces (McGrégor *et al.*, 1989).

Sur les frottis analysés selon une technique immunologique, seules quelques cellules ont présenté une fluorescence ce qui souligne l'extrême sensibilité de la technique d'immunofluorescence. De plus, cela valide l'utilisation d'embryons pour étudier l'expression transitoire en raison essentiellement de l'absence de contraintes relatives à la culture *in vitro* de cellules, les embryons étant faciles à élever. De plus, l'ADN étant introduit au stade unicellulaire, son expression est susceptible de se produire différenciellement selon les types cellulaires et ce au fur et à mesure de leur différenciation.

Les résultats indiquent que le promoteur viral (CMV) est efficace pour contrôler l'expression de gènes marqueurs. La mosaïcité de l'expression peut correspondre au fait que l'ADN a été non intégré et ne s'est pas suffisamment répliqué sous cette forme extrachromosomique pour investir toutes les cellules des gastrula. Une autre hypothèse serait qu'il existe une spécificité cellulaire d'expression liée au promoteur ou à des éléments

de transcription. Afin de déterminer si cette expression a été transitoire ou stable, il eut été nécessaire de pratiquer des analyses sur l'ADN génomique d'individus plus âgés (Southern, hybridation *in situ*), ce qui ne pouvait être envisagé compte tenu de l'absence d'infrastructure adaptées simultanément à des élevages larvaires et des analyses de biologie moléculaire.

En bilan, il apparaît que la microinjection d'embryons est adaptée à des recherches en transgénèse chez les Crustacés. Bien que le volume injecté soit difficilement reproductible pour les raisons invoquées précédemment, cette technique est fiable pour l'étude qualitative d'une construction que ce soit en expression transitoire (testage de promoteurs hétérologues) ou stable (profil spatio-temporel de l'expression).

Application de la biolistique

Les résultats obtenus chez des larves d'*Artemia* concernant l'expression du gène marqueur luciférase placé sous le contrôle du promoteur hsp70 de drosophile confirment l'intérêt de la biolistique pour tester l'efficacité de promoteurs. Il faut souligner que l'avantage d'utiliser le gène marqueur de la luciférase a été de pouvoir utiliser une méthode très sensible de détection par luminométrie qui a permis de mener des analyses quantitatives. Ces expériences pourront être vraisemblablement transférées rapidement chez *Penaeus* en appliquant les mêmes paramètres de biolistique tout d'abord à des stades de développement similaires à ceux qui ont été traités chez *Artemia* puis à des embryons à des stades encore plus précoces afin d'aborder des travaux non seulement relatifs à l'expression transitoire mais aussi stable consécutivement à l'intégration d'ADN dans le génome (profils spatio-temporels d'expression, régulation, induction).

CHAPITRE 3 :

**CARACTERISATION DE SEQUENCES
NUCLEIQUES DANS LE GENOME DES
CRUSTACES *ARTEMIA* ET *PENAEUS***

1. INTRODUCTION

Trois types de séquences homologues ou hétérologues doivent être considérées dans le cadre de recherches sur la transformation génétique des Crustacés :

* (1) des séquences propices à une haute fréquence d'intégration et/ou un ciblage de l'intégration de l'ADN étranger dans le génome.

* (2) des séquences impliquées dans le contrôle de l'expression (promoteur, enhancer), soit pour altérer leur capacité de régulation (stimulation ou inhibition), soit pour les coupler à un gène ou des séquences nucléiques (homologues ou hétérologues), l'expression dans l'animal transgénique lui conférant un avantage particulier.

* (3) des séquences de gènes d'intérêt dont le mode d'expression (amplifié, muté ou réprimé) dans l'animal transgénique est susceptible d'engendrer un avantage.

Dans les paragraphes suivants sont présentés les résultats obtenus sur des séquences du génome des pénéides relevant chacune de l'un des trois types précédemment décrits.

Type 1 : ADN répété. L'emploi de ce type d'ADN pourrait par coinjection avec de l'ADN exogène augmenter le taux d'intégration de ce dernier comme cela a été obtenu chez *Nicotiana* (Marchesi *et al.*, 1989). De plus, selon ces auteurs, il semblerait que la co-transformation avec de l'ADN répété ait favorisé l'intégration en des sites préférentiellement adjacents aux répétitions homologues endogènes ce qui correspond à un processus de ciblage.

Ensuite, la recherche du promoteur inductible (type 2) du gène *hsp70* de *Penaeus* qui serait apte à contrôler l'expression de gènes de façon inductible et ectopique (lieu inhabituel d'expression). La réponse au stress thermique par production de protéines de stress étant un phénomène ubiquitaire depuis la levure jusqu'à l'homme, en passant par les Crustacés (McLennan et Miller, 1990.), et la séquence de ces protéines étant très conservée, cette recherche a été envisagée par PCR à partir d'homologies recherchées dans la région codante mais aussi non codante.

Enfin, la caractérisation chez *Penaeus* du proto-oncogène *rho* (*ras*-homologue) (type 3). Ce gène, identifié et cloné chez *Artemia* (Diaz-Guerra *et al.*, 1989), a été caractérisé chez *Penaeus* par PCR du fait de sa forte homologie avec les proto-oncogènes d'autres espèces. Les proto-oncogènes de Crustacés constituent un groupe de gènes candidats pour la transformation génétique en vue de l'immortalisation de cellules *in vivo* qui pourraient éventuellement être cultivées *in vitro* et aboutir ainsi à l'établissement de lignées cellulaires (Kelekar et Cole, 1987).

Parmi les 83 séquences nucléiques caractérisées chez des Crustacés (annexe 6) et compilées dans les banques informatiques d'acides nucléiques (72.708 séquences dans la mise à jour n°29 d'EMBL), une seule séquence concerne le genre *Penaeus* (Kim et Abele,

1990) et 63 % concernent l'*Artemia*. Parmi celles-ci, deux séquences relèvent de l'un des trois types précédemment cités. Il s'agit d'une part d'une séquence du gène *ras* et d'autre part d'une séquence d'ADN répété .

2. MISE EN EVIDENCE DE SEQUENCES REPETEES DANS LE GENOME DE *PENAEUS SP*

Deux approches ont été développées pour mettre en évidence des séquences répétées au sein du génome de *Penaeus* : (1) la séparation d'une bande d'ADN après centrifugation isopycnique du génome préalablement mis en présence d'un colorant de Hoechst qui a la particularité de se fixer préférentiellement aux bases A et T (Karlovsky et Cock, 1991) et (2) la présence d'une fraction d'ADN résistante à la digestion du génome par différents enzymes de restriction.

2.1. Séparation d'ADN répété satellite par centrifugation isopycnique

Chez l'*Artemia*, cette méthode a permis à Cruces *et al.* (1986) de mettre en évidence à partir d'ADN génomique 2 bandes dans un gradient de CsCl dont la mineure d'une densité moindre a été qualifiée de satellite. Cette bande s'est révélée correspondre à de l'ADN constitué de nombreux petits motifs hautement répétés (113 bp).

Le protocole utilisé chez l'*Artemia* a été appliqué à de l'ADN génomique de *Penaeus*. Quatre cents μg d'ADN génomique purifié d'*Artemia* et de *P. japonicus* ont été centrifugés (20°C, 24h, 60000 rpm, rotor VTi 65 Beckman) en présence du colorant de Hoechst 33258 (200 μl / 100 μl ADN) dans du CsCl homogène (50 %) ou en gradient préformé (51, 52, 53, 54 et 55 %).

Avec l'ADN d'*Artemia*, deux bandes ont été visualisées comme décrit par Cruces *et al.* (1987) ainsi qu'avec l'ADN de *P. japonicus* (donnée non montrée) mais à des densités différentes. Les densités ont été évaluées par pesée d'aliquotes de 100 μl de chacune des bandes à température ambiante. Les bandes majeures d'*Artemia* et de *P. japonicus* avaient des densités respectives de $d = 1,669$ et de $d = 1,683$ alors que les petites bandes ont été situées à $d = 1,655$ et $d = 1,669$.

2.2. Séparation d'ADN répété par digestion enzymatique

Plusieurs aliquotes de 10 μg d'ADN génomique purifié de *P. monodon* et de *P. japonicus* ont été digérées pendant une nuit avec l'un des enzymes de restriction suivants : *Bam*H1, *Xba*1, *Hind*3, *Hae*3, *Eco*R1, *Pst*1, *Mae*3, *Hpa*2, *Taq*1, *Alu*1 et *Mbo*2. Après migration d'une aliquote sur gel d'agarose à 0,8 % et coloration, une bande de 23 kb est apparue sur le gel

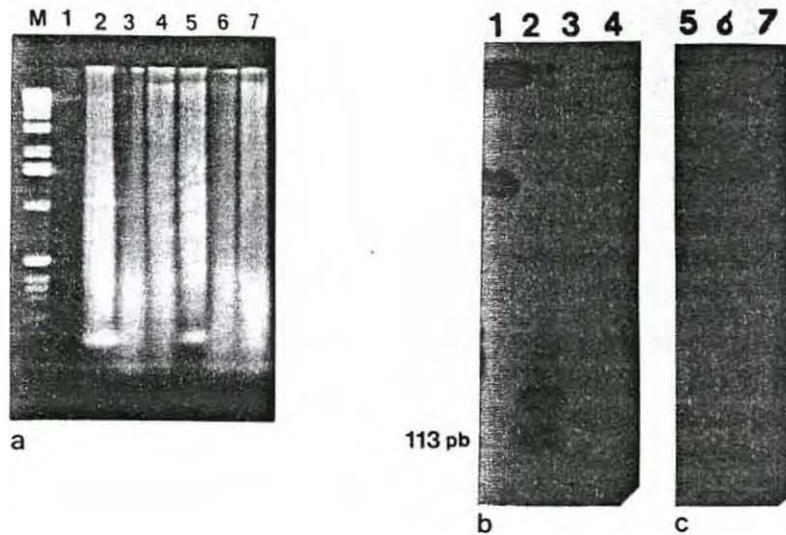


Figure 24 : Southern blot.

a : ADN génomiques digérés par *AluI* avant transfert

b : film après hybridation avec la sonde pMW103 (plasmide pUC+sonde).

c : film après hybridation avec pBR322 (pUC 19).

(1) pMW103 natif.

(2 et 5) ADN d'*Artemia*.

(3 et 6) ADN de *P. japonicus*.

(4 et 7) ADN de *P. monodon*.

(M) Marqueur de taille.



Figure 25 : plasmide pMW103.

(1) digéré par *AluI*.

(2) natif.

(M) Marqueur de taille.

pour tous les puits sauf ceux correspondant à l'ADN digéré par *Alu1* et *Taq1* où est apparu une faible bande d'ADN. La taille des fragments générés par l'action de ces deux enzymes a été estimée à environ 120 bp.

Ce résultat indique que la bande d'ADN de 23 kb, réfractaire à la majorité des enzymes utilisés mais sensible à l'action de *Taq1* et de *Alu1*, est constituée de petits motifs d'environ 120 bp qui contiennent les sites de coupure de *Taq1* et *Alu1* (taille des sites de reconnaissance : 4 nucléotides).

Ce résultat étant tout à fait identique à celui que Cruces *et al.* (1987) ont obtenu sur le génome d'*Artemia*, l'éventuelle homologie de séquence entre l'ADN répété d'*Artemia* et de *Penaeus* a été recherchée par hybridation en Southern.

L'hybridation a été effectuée entre 10 µg d'ADN génomique (*Artemia*, *P.japonicus* et *P. monodon*) digérés par *Alu1* (figure 24a) et le plasmide pMW103 (figure 25) dont l'insert correspond au fragment d'ADN répété de 113 bp d'*Artemia*. Le plasmide ayant dû être utilisé entier (insert + vecteur) comme sonde à cause du procédé de marquage à la peroxydase (taille minimale de la sonde: 500 bp) des témoins (négatifs) ont dû être réalisés avec comme sonde le vecteur de clonage seul.

Après révélation du film, aucun signal n'est apparu hormis celui correspondant au témoin positif (ADN génomique d'*Artemia* digéré par *Alu1* reconnu par le plasmide pMW103) (figure 24b et 24c).

Ces résultats peuvent indiquer que le degré d'homologie entre les fragments répétés d'*Artemia* et ceux de *Penaeus* est faible et tout au moins insuffisant pour s'hybrider l'un à l'autre dans les conditions de stringence imposées par le kit. Cependant, la sensibilité et la résistance des ADN génomiques d'*Artemia* et de *Penaeus* aux mêmes enzymes étant similaires, une certaine homologie reste probable. A plus long terme, il conviendrait de cloner le motif repéré chez *Penaeus* afin de déterminer sa séquence et de l'utiliser en cotransfection ou sous forme de séquences latérales ("flanking sequence") avec l'ADN étranger afin d'évaluer son éventuelle capacité à augmenter le taux d'intégration dans le génome de *Penaeus*.

3. RECHERCHE DES SEQUENCES DU PROTO-ONCOGENE *RHO* ET DU PROMOTEUR DE HSP70 PAR PCR SUR LE GENOME DE *PENAEUS*

Les stratégies de recherche de la séquence d'un gène dans un génome s'effectuent classiquement par le criblage d'une banque génomique soit par des oligonucléotides de synthèse ou des ADNc soit par des anticorps si la banque est d'expression. Dans certains cas, une recherche plus directe et plus sensible peut être utilisée. Elle repose sur l'amplification enzymatique (PCR) de fragments situés entre des séquences consensuelles entre plusieurs groupes d'organismes qui sont théoriquement présentes dans le génome à

étudier (Innis *et al.*, 1989). Cette stratégie de recherche et d'identification de gènes repose sur la connaissance de séquences apparentées dans d'autres groupes zoologiques et, notamment chez des Invertébrés dans le cas présent.

L'application de cette stratégie a été tentée afin d'isoler le promoteur du gène hsp70 et le proto-oncogène *rho* sur le génome de *Penaeus*.

Pour chacune de ces séquences, les étapes du travail ont été les suivantes :

(1) Compilation des séquences nucléiques et protéiques concernant celles caractérisées chez des Invertébrés marins.

(2) Identification de séquences caractérisées chez différents groupes d'Invertébrés.

(3) repérage de régions très conservées dans les séquences sélectionnées à l'aide d'alignements informatisés de ces séquences.

(4) choix et synthèse des séquences de couples d'amorces de PCR situées dans ces régions conservées.

Le choix et le dessin de ces amorces ont résulté de la satisfaction du plus grand nombre possible des contraintes suivantes :

- **T_m** (température de fusion qui correspond à celle pour laquelle la moitié des molécules d'ADN double-brins sont dissociées) : la plus élevée possible pour permettre une hybridation à haute température et réduire ainsi l'amplification non spécifique

- **taille minimum** : de 20 à 30 mer pour une hybridation spécifique, taille du fragment à amplifier d'environ 600 bp pour cloner et séquencer sans sous clonage

- **extrémité 3'** : 2 à 3 nucléotides très conservés ou tout au moins n'empêchant pas l'hybridation comme l'inosine

- **extrémité 5'** : inclusion de séquences correspondant à des sites de restriction différents pour faciliter le clonage. Au moins deux résidus doivent y être ajoutés en 5' pour ne pas inhiber la digestion du fragment néosynthétisé à cet endroit.

- **structure secondaire** : la séquence ne doit pas pouvoir s'apparier en structure secondaire avec elle-même ou avec la séquence qui sera utilisée conjointement.

- **appariement non spécifique en 3'** avec la séquence du gène hsp70 de bactéries, notamment *E. coli*, afin d'éviter l'amplification sur des génomes bactériens éventuellement contaminants depuis l'extraction de l'ADN génomique des tissus de Crustacés.

(5) amplification enzymatique sur le génome de *Penaeus* à l'aide des amorces de synthèse avec adaptation des paramètres (nombre et durée des cycles, [MgCl₂], température d'hybridation et d'élongation).

(6) hybridation moléculaire du produit d'amplification à partir du génome de *Penaeus* avec une séquence hétérologue la plus proche possible du groupes des Crustacés.

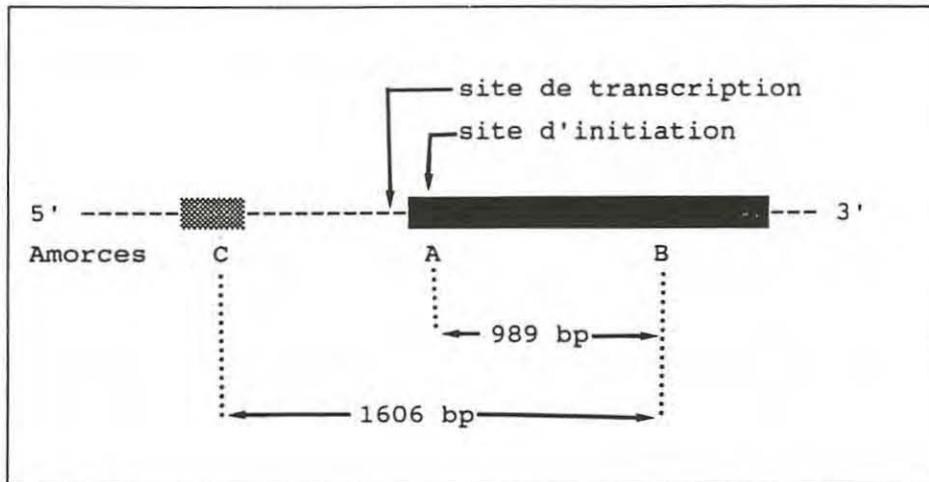


Figure 26a : Tailles théoriques attendues des fragments amplifiés par les paires d'amorces A-B et B-C sur le gène hsp70 de *Drosophila melanogaster* (référence EMBL: DROHSP7A).

■ séquence Pelham ■ exon

```

Consensus          CTGGAATNTTCTAGA
Function          =====
hsp 70            CGAGAGAGCGCGCCTCGAATGTTCCGAAAAGAGCGCGCGAGTATAAA
                  :
hsp 83            CATCCAGAAGCCTCTAGAACTTTCTAGAGACTTCCAGTTCGGTCCGGTTTTTCTATAAA
                  :
hsp 22            ATTCGAGAGAGTCCGGTATTTTCTAGATTATATGGATTCCTCTCTGTCAAGAGTATAAA
                  :
hsp 26            TTTCTGTCACTTTCCGGACTTTCTAGAAAAGCTCCAGCGGGTATAAA
                  :
hsp 27            GTCCGTCCCTTGGTIGCCATGCACTAGTGTGTGTGAGCCAGCGTCAGTATAAA
                  :
hsp 68            TGACCCCTTCTCGCAGGGAATCTCGAATTTTCCCTCCCGGCGACAGAGTATAAA
                  :
hsp 68            CTCCGAGGGAAATCTCGAATTTTCCCTCCCGGCGACAGAGTATAAA
hsp 23            CGCCGACGGCGGCACGCACACTACGATAJCGAGCGGTTGTATAAA
  
```

Figure 26b : Séquence consensuelle "Pelham" entre les régions non codantes en amont des différents gènes de type hsp chez *Drosophila*. (extrait de Pelham, 1982)

* (7) en cas d'hybridation positive, clonage et séquençage du ou des fragments amplifiés qui ont été reconnus par la séquence hétérologue.

3.1. Recherche d'une portion de séquence régulatrice du gène Inductible de hsp70

L'intérêt des gènes hsp codant pour des protéines de stress (thermique ou chimique) réside dans la possibilité d'activer temporairement leur expression par des variations plus ou moins importantes mais brèves de température ou de teneur en métaux lourds du milieu (Friedenreich et Scharl, 1990 ; Steinert et Pickwell, 1988). Cette induction relève notamment de la présence de séquences régulatrices situées en amont du gène dans la région promotrice (Pelham, 1982). Ce type de séquence inductible, très utilisé en transgénèse pour contrôler l'expression d'un gène placé en aval, est situé en région non codante des gènes de type hsp (Aranshah *et al.*, 1987) et est généralement très peu conservé. Son identification devrait donc passer par le criblage de banques génomiques à l'aide d'ODN ou d'ADNc. Cependant, dans le cas du gène de hsp70, des zones consensuelles de séquences ont été identifiées dans les régions codantes mais aussi dans la région non codante située en 5', et ont servi de base pour tenter leur amplification sur le génome de pénéides.

3.1.1. Choix d'amorces de PCR spécifiques du gène hsp70

Le choix des amorces a procédé de deux approches :

(1) la recherche de régions conservées en régions codantes.

Parmi les séquences du gène hsp70 disponibles dans les banques de données de séquences, des alignements par le programme CLUSTAL ont montré une extrême conservation de la séquence, de la bactérie jusqu'à l'homme, par une forte homologie au niveau protéique (annexe 15) mais aussi au niveau nucléique sur les 2 premiers résidus nucléiques de chaque codon (annexe 16). Les homologies les plus fortes en acides nucléiques étant cependant limitées à la phase codante, deux amorces (A et B) situées dans ces régions (annexe 17) ont donc été synthétisées et purifiées. La taille attendue des fragments amplifiés, à l'aide des amorces A et B, à partir du gène hsp70 d'un animal phylogénétiquement proche des Crustacés : la drosophile (référence Genbank : DROHSP7A) est de 989 bp (figure 26a).

(2) la recherche d'une région conservée en région promotrice non codante.

Chez la drosophile, la séquence Pelham (Pelham, 1982) (figure 26b) est reconnue être indispensable à la réponse aux stress thermiques. Cette séquence correspond à un petit motif très conservé de 15 nucléotides situés en région 5' non codante de tous les gènes de la famille hsp chez l'insecte *Drosophila*. Dans le catalogue de séquences nucléiques de

CELHSP16C DEFINITION *C.elegans* heat shock protein genes (hsp16-48 and hs
POS.= 3130 TCCTGCAGCCGTTTGA**GAATGTTCTAGA**AAGTCCTAGATGCAT

CELHSP16C DEFINITION *C.elegans* heat shock protein genes (hsp16-48 and hs
POS.= 3284 TGCAAGAAGCAGCTC**GAATGTTCTAGA**AAAAGGTGGAAATGA

CELHSP16D DEFINITION *C.elegans* heat shock protein genes 16-41 and 16-2,
POS.= 1256 TTCTGCAGCCTTACA**GAATGTTCTAGA**AAGTCCTAGATGCAT

CELHSP16D DEFINITION *C.elegans* heat shock protein genes 16-41 and 16-2,
POS.= 1410 TGCAACAAGCAGCTC**GAATGTTCTAGA**AAAAGGTGGAAAATA

DDIHSP DEFINITION *Dictyostelium discoideum* heat-shock promoter in DI
POS.= 15 ATTTTTTATTCTTC**GAATGTTCTAGA**ACATTCTAAAAAATT

DROHS83 DEFINITION *Drosophila melanogaster* 5'end of heat shock gene hs
POS.= 1474 ACATTTGCCGCTCGA**GAATGTTCTAGA**GGTTTCTATGCTTTA

DROHSP82 DEFINITION *Drosophila melanogaster* gene for heat shock protein
POS.= 1465 ACATTTGCCGCTCGA**GAATGTTCTAGA**GGTTTCTATGCTTTA

DROHSP83A DEFINITION *D.melanogaster* heat shock gene hsp83 (locus 63B) 5'
POS.= 1474 ACATTTGCCGCTCGA**GAATGTTCTAGA**GGTTTCTATGCTTTA

DROHSP2 DEFINITION *Drosophila melanogaster* gene coding for heat shock
POS.= 464 ATATATATAAATAAA**GAATATTCTAGA**ACCCCCAAAACAAAC

DROHSP7A2 DEFINITION *D.melanogaster* heat shock protein 70 genes, locus 8
POS.= 1500 ATATATATAAATAAA**GAATATTCTAGA**ATCCCAAACAAACC

DROHSP7C1 DEFINITION *D. melanogaster* heat shock locus 87C1: alpha-gamma
POS.= 517 TTTCCAAAATAAAGC**GAATATTCTAGA**ATCCCAAACAAACT

DROHSP7C2 DEFINITION *D.melanogaster* heat shock locus 87C1: proximal gene
POS.= 520 TTTCCAAAATAAAGC**GAATATTCTAGA**ATCCCAAACAAACT

DROHSP7D1 DEFINITION *D.melanogaster* heat shock locus 87C1: distal hsp70
POS.= 1253 TTTCCAAAATAAAGC**GAATATTCTAGA**ATCCCAAACAAACT

DROHSP7D1 DEFINITION *D.melanogaster* heat shock locus 87C1: distal hsp70
POS.= 4532 TTTCCAAAATAAAGC**GAATATTCTAGA**ATCCCAAACAAACT

DROHSP8 DEFINITION Alpha-gamma fragment from the *Drosophila* heat shock
POS.= 517 TTTCCAAAATAAAGC**GAATATTCTAGA**ATCCCAAACAAACT

CELHSP70 DEFINITION *C.elegans* heat shock protein 70A gene, complete cds
POS.= 274 TTTTGTGACGAAATTC**GAATTTTCTAGA**ATCCCGCCACGCCA

YSCHSP104A DEFINITION *S.cerevisiae* heat shock protein (HSP104) gene, comp
POS.= 37 ATATATATTTTTCCA**GAATTTTCTAGA**AGGGTTATTAATTAC

GGHSP DEFINITION *G.gallus* heat-shock protein
POS.= 225 **CTGGCAGGTTCCAGA**

Figure 27 : Résultat de la recherche dans GENBANK du motif Pelham (**GAATNTTCTAGA**) consensuel des régions 5' des gènes hsp de *Drosophila* sp.

hsp70 disponibles, on a procédé à une recherche informatique d'un motif apparenté à celui décrit par Pelham. Le résultat de la recherche de ce motif dans la banque Genbank (programme FASTA) a montré que ce motif, très conservé dans la famille des protéines de stress chez la drosophile, se retrouve partiellement dans les régions 5' non codantes des gènes hsp70 du nématode *Coenorhabditis elegans*, du poulet *Gallus gallus*, de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et de *Dictyostelium discoideum* (figure 27). Une amorce C (figure 26 et annexe 17) correspondant à cette région a donc été synthétisée avec un degré de dégénérescence néanmoins assez élevé et deux inosines en 3' afin de favoriser son hybridation notamment en 3'. Cette amorce C a été utilisée en PCR avec l'amorce B précédemment décrite. La taille théorique du fragment amplifié par cette paire d'amorces est de 1,606 kb chez la drosophile (figure 26a).

3.1.2. Expériences d'amplification

Les deux couples d'amorces A-B et B-C ont été utilisés sur de l'ADN génomique de *P. indicus*, *P. japonicus*, *P. monodon* et *Drosophila melanogaster*. Un microgramme d'ADN génomique a dû être utilisé par microtube afin d'obtenir une amplification visible sur les gels.

Les résultats sont présentés en figure 28. Les amorces A-B ont généré plusieurs bandes à partir du génome de drosophile (figure 28a) (élongation à 50°C), dont une correspond à la taille attendue, alors qu'aucune bande n'est apparue avec les amorces B-C, même pour une température d'hybridation inférieure (45°C) ou une concentration en MgCl₂ plus élevée qui sont des valeurs de paramètres moins stringents pour l'hybridation des amorces et le fonctionnement de l'enzyme thermostable (donnée non présentée).

Par contre, sur le génome de *P. indicus* (figure 28b), ces couples d'amorces ont généré des profils d'amplification tout à fait identiques (5 bandes de 1,6kb, 1,2kb, 0,8kb, 0,52kb et 0,45 kb) dont deux ont correspondu aux tailles attendues mais suggérant une contamination des paires d'amorces entre elles.

Des témoins négatifs ont été réalisés simultanément et n'ont révélé ni de contamination des amorces entre elles (figure 28e) ni de contamination extérieure (figure 28f).

Sur le génome de *P. monodon*, les amorces B-C ont engendré une légère amplification (figure 28c).

Aucune amplification n'a pu être obtenue sur le génome de *P. japonicus* dans les mêmes conditions d'amplification.

En vue de tester le degré d'homologie des bandes amplifiées chez *P. japonicus* avec la séquence en 5' du gène hsp70 de drosophile, une hybridation en Southern a été effectuée sur les bandes réamplifiées.

Figure 28 : Amplifications enzymatiques (PCR) sur les génomes de *D.melanogaster*, *P. indicus*, *P. japonicus* et *P. monodon* à l'aide des amorces A-B et B-C pour amplifier respectivement un fragment codant et un non codant (Séquence Pelham) du gène hsp70.

- a : (1) ADN *D. melanogaster* + amorces A-B (5 bandes générées : A, B, C, D, E)
 (2) ADN *D. melanogaster* + amorces B-C (5 bandes générées : A', B', C', D', E')
 (M) marqueur de taille
- b : (1) ADN *P. indicus* + amorces B-C
 (2) ADN *P. indicus* + amorces A-B
- c : (1) ADN *P. japonicus* + amorces B-C
 (2) ADN *P. monodon* + amorces B-C
- d : Bandes D,E,C,B,A et D',E',C',B',A' respectivement réamplifiées dans les puits 1,2,3,4,5 (amorces B-C) et 6,7,8,,9 et 10 (amorces A-B).
- e : Témoins négatifs
 (1) amorces A-B seules
 (2) amorces B-C seules
- f : Témoins négatifs de vérification de non contamination des amorces.
 (1) amorce A
 (2) amorce B
 (3) amorce C

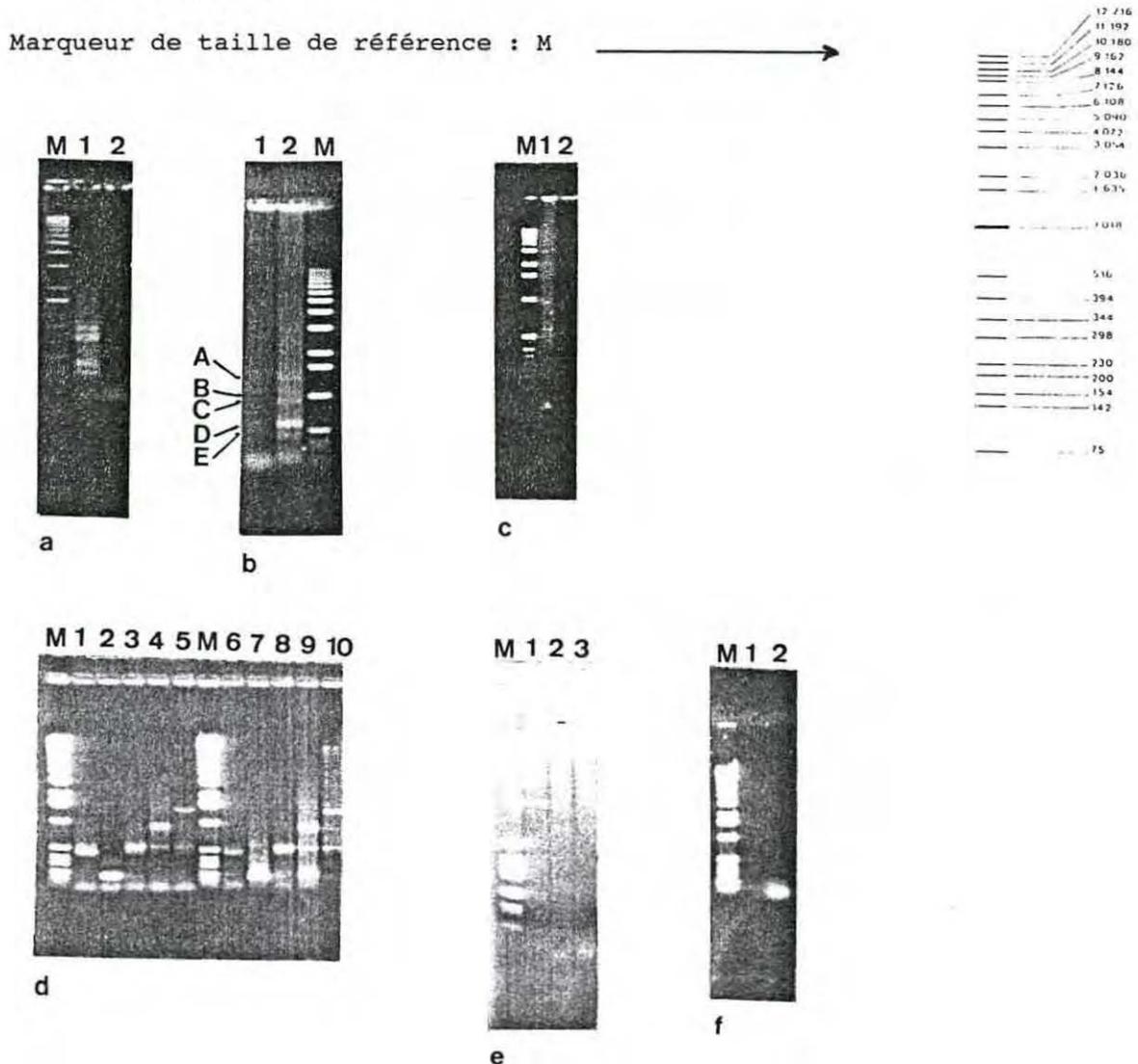




Figure 29 : Obtention de la sonde de 611 bp correspondant au promoteur de hsp70 chez *Drosophila*, à partir du construit Dr-lacZ.

- (1) fragment de 611 bp
- (2) plasmide Dr-lacZ sans le fragment de 611 bp
- (3) plasmide Dr-lacZ linéarisé par *HindIII*
- (M) marqueur de taille

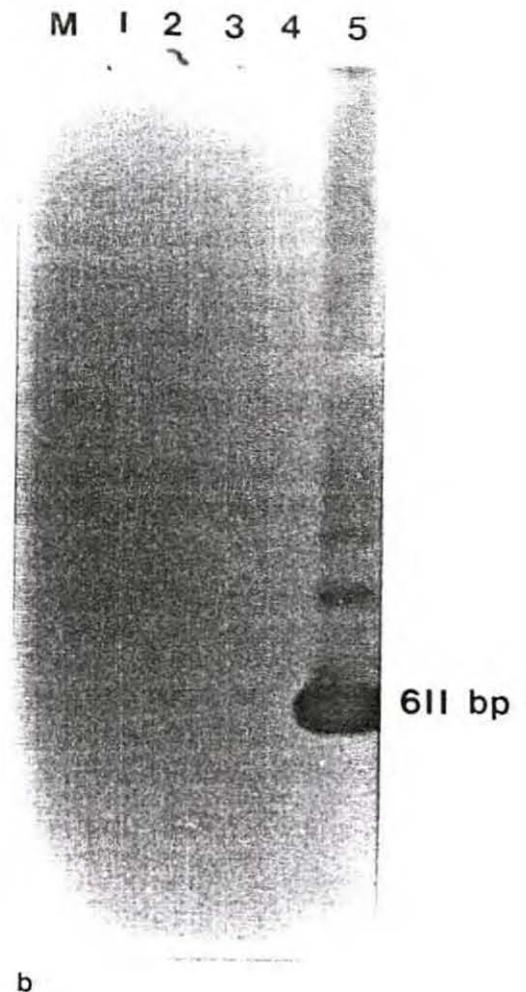
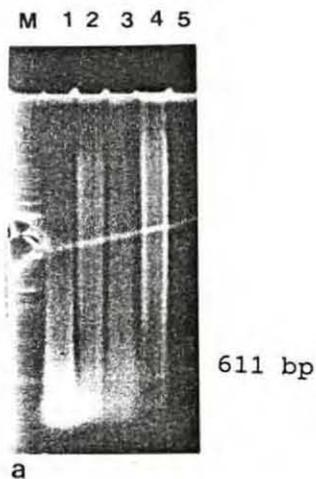


Figure 30 : Hybridation de génomes de *Penaeus* et d'*Artemia* (digestion *EcoRI*) avec le fragment de 611 bp obtenu après digestion de Dr-lacZ par *HindIII* et *SalI*.

a : Avant transfert sur membrane

b : Après impression du film

- (1) ADN *P. japonicus*
- (2) ADN *P. monodon*
- (3) ADN *P. indicus*
- (4) ADN *Artemia*
- (5) 50ng du fragment de 611 bp
- (M) marqueur de taille

A partir des 10 bandes qui ont été obtenues chez *P. indicus*, chacune a été réamplifiée à l'aide des couples d'amorces qui les avaient respectivement générées (figure 28d).

Une hybridation en Southern a ensuite été réalisée entre ces bandes réamplifiées chez *P. indicus* par le couple d'amorces B-C et la séquence promotrice du gène hsp70 de drosophile (660 bp), extraite par *SalI* et *HindIII* du vecteur d'expression Dr-lac-Z (figure 29).

Aucun signal n'a été détecté par le film révélant ainsi qu'aucune des 5 bandes amplifiées par les amorces B-C ni une quelconque amplification non perceptible par coloration au BEt, n'a présenté d'homologies suffisante pour s'hybrider avec le promoteur de hsp70 de drosophile.

Enfin, afin de savoir si la séquence promotrice du gène hsp70 de drosophile (660 bp) présentait une homologie de séquence avec les génomes de *Penaeus* ou d'*Artemia*, une hybridation en Southern a été réalisée entre cette séquence de drosophile et ces différents génomes digérés par *EcoRI*.

Le résultat montré en figures 30a et 30b n'indique aucun signal d'hybridation sur les différents génomes testés montrant ainsi vraisemblablement une limite du système de détection qui a été utilisé : la sensibilité, puisque la sonde issue de drosophile aurait dû s'hybrider avec le génome de drosophile.

3.2. Caractérisation d'une portion de séquence du proto-oncogène *rho* chez les crevettes pénéides

Cette caractérisation entre dans un projet de recherche sur la culture cellulaire de cellules d'invertébrés marins (réseau national) qui est motivé par les travaux relatifs à l'immortalisation cellulaire. Chez des Mammifères, en effet, l'immortalisation ou la transformation complète de cellules peut être provoquée par l'expression stable de proto-oncogènes mutés ou d'oncogènes viraux (Jenkins *et al.*, 1984 ; Kelekar et Cole, 1987 ; Roberson et Walker, 1988 ; Komatsubara *et al.*, 1988 ; Rovinski et Benchimol, 1988 ; Fry *et al.*, 1990 ; Inokuchi *et al.*, 1991). L'immortalisation des cellules est pratiquée soit *in vitro* à partir de primocultures, soit *in vivo* par transformation génétique.

L'obtention de lignées cellulaires de crevette selon cette approche d'immortalisation est prioritaire en pathologie infectieuse, la majorité des agents pathogènes de crevettes étant intracellulaires. C'est dans ce contexte que la recherche de proto-oncogènes chez les crevettes a été entreprise. En effet, les proto-oncogènes spécifiques des pénéides, qui doivent être étudiés dans les processus normaux de différenciation, sont probablement les gènes les plus aptes à transformer leurs cellules et leurs embryons par intégration dans leur génome.

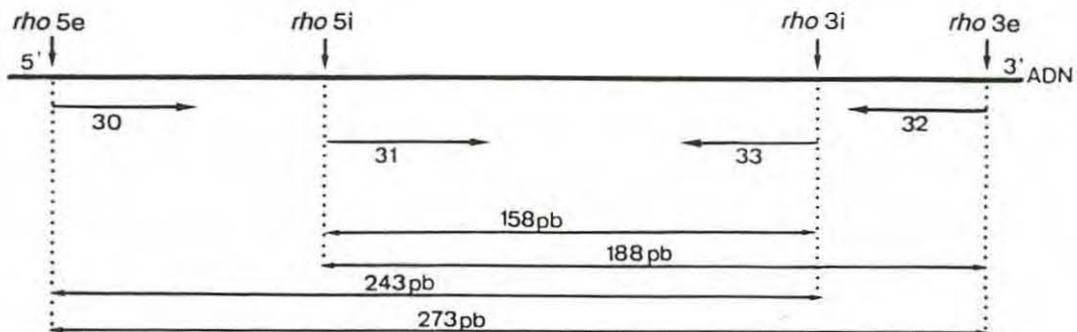
La stratégie de recherche de proto-oncogènes chez les pénéides a été identique à celle qui a été utilisée pour le gène hsp70 en amplifiant par PCR des régions de proto-oncogènes

ODNs	position	séquence (5'-3')	longueur (mer)
ras5e	5'	ATTCAAATCATTTTGTAGATGAATATG	28
ras5i	5'	GAAACCTGTCTTCTTGATATTCTTGACA	28
ras3i	3'	TGTTGGCAAATCACATTTATTTCCAACCAA	30
ras3e	3'	GTGTA AAAACCATCGTCTACACCCAT	26
rho5e	5'	TTICCI GAIGTITACGTICCIACIGTITT	29
rho5i	5'	TGGGAIACIGCIGGICAIGAIGAITA	26
rho3i	3'	ACAI(TC)(TG)(TG)GACAIAAITGIIIIACITCIGG	29

a

couple d'ODNs	taille (bp) attendue
ras5e-ras3e	403
ras5e-ras3i	297
ras5i-ras3e	327
ras5i-ras3i	222
rho5e-rho3i	243
rho5i-rho3i	158

b



c

Figure 31 : Amorces choisies pour amplifier des portions des gènes *ras* et *rho*.

a : séquences des amorces et longueur (mer).

b : tailles amplifiées attendues.

c : position des amorces *rho* sur l'ADN génomique de *Aplysia californica* et taille théorique des fragments amplifiés en fonction des paires d'amorces utilisées

à partir d'amorces correspondant à des séquences consensus identifiées à partir des gènes déjà caractérisés chez d'autres espèces. Parmi les proto-oncogènes pris en compte, les gènes *ras* et *rho* ont été sélectionnés en raison de l'abondance des informations les concernant, notamment chez des Invertébrés marins et en particulier chez *Artemia* (Diaz-Guerra *et al.*, 1989).

3.2.1. Localisation de régions consensus des proto-oncogènes *ras* et *rho* par analyse informatique

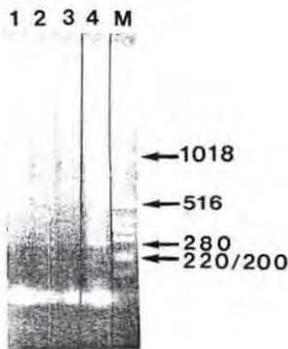
Cent six séquences de *ras* et de *rho* de différents organismes (annexe 18) ont été comparées avec la séquence *ras* publiée pour *Artemia sp.* (Diaz-Guerra *et al.*, 1989) par un algorithme de type KANEHISA (résultats non montrés). Une analyse des homologues a été effectuée ensuite à partir des 7 séquences les plus représentatives des différents groupes (annexe 19).

Les régions N-terminales des séquences *ras* se sont révélées être bien conservées en acides aminés ainsi que trois régions conservées en C-terminal en position 109-120, 143-149 et 152-163 (annexe 20).

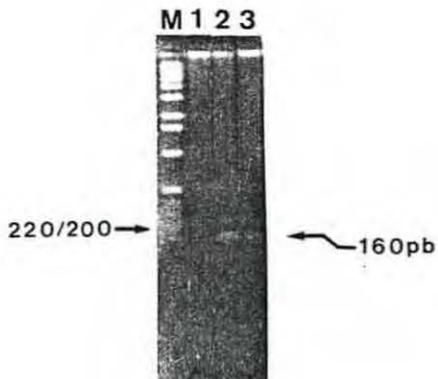
Les alignements des séquences *rho* (annexe 20), ont été réalisés sous programme CLUSTAL et ont montré des régions plus conservées (indiquées par une étoile). Le dendrogramme qui accompagne cet alignement multiple confirme le fait que la séquence *rho* d'*Aplysia californica* (Mollusca) est plus proche des séquences *rho* de Mammifères que de la séquence *rho* de la levure (Madaule *et al.*, 1987).

3.2.2. Choix et synthèse des ODNs pour la PCR

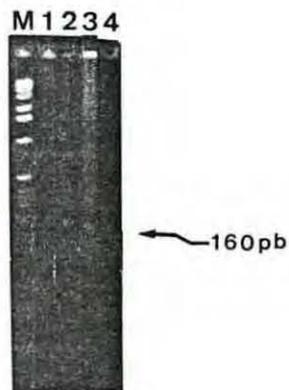
A partir des alignements précédents, les séquences des régions très conservées ont été choisies pour synthétiser les ODNs. Deux paires d'ODNs, une externe (*ras5e* et *ras3e*) et l'autre interne (*ras5i* et *ras3i*), ont été choisies pour les proto-oncogènes *ras* et *rho* (annexe 19 et 20 ; figure 31c). Les ODNs pour l'oncogène *rho* ont dû être très dégénérés dans les cas où 3 à 4 bases étaient possibles (amorce *rho5e* : 8 Inosil, *rho5i* : 7 Inosine et *rho3i* : 8 Inosine). Les séquences des ODNs ainsi que les tailles attendues des fragments qui doivent être amplifiés à partir du génome de drosophile sont présentées dans les figures 31a et 31b. L'ODN, *ras5i*, n'a pas pu être utilisé du fait d'une anomalie de synthèse qui s'est révélée lors d'une vérification de routine sur gel.



a : Hybridation des amorces à 50°C
 couples d'ODNs *ras5e-ras3e*
 1 : *P. monodon*
 2 : *P. japonicus*
 3 : *P. indicus*
 4 : *A. franciscana*



b : Hybridation des amorces à 53°C
 couple d'ODNs *rho5i-rho3i*
 1 : *A. franciscana*
 2 : *P. monodon*
 3 : *P. japonicus*



c : Hybridation des amorces à 50°C
 couple d'ODNs *rho5i-rho3i*
 1 : *A. franciscana*
 2 : *P. monodon*
 3 : *P. japonicus*
 4 : *P. indicus*

Figure 32 : Fragments amplifiés avec les amorces *ras* et *rho* à partir d'ADN génomique d'*Artemia*, de *P. monodon*, *P. japonicus* et *P. indicus*.

a : hybridation des amorces *ras*.

b et c : hybridation avec les amorces *rho*.

M : marqueur de taille.

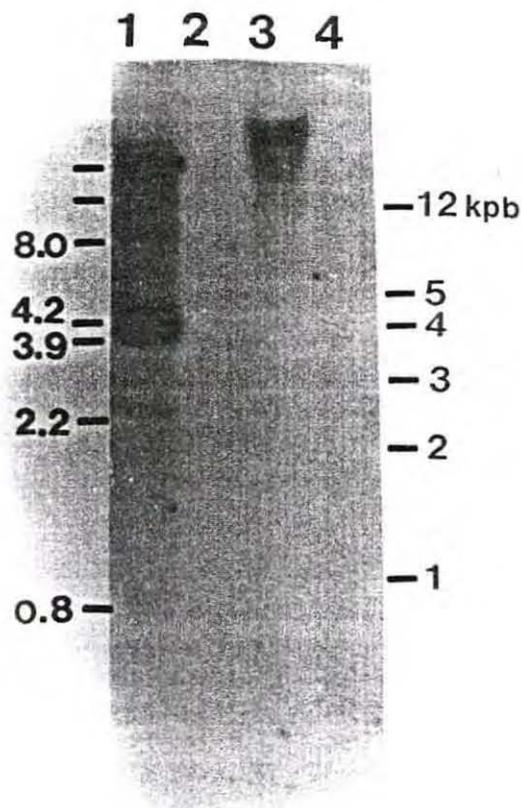


Figure 33 : Southern-blot réalisé sur 10 μ g de différents ADN génomiques coupés par *EcoRI* puis hybridés avec le fragment ras d'ADNc d'*Artemia* (702 bp).

- 1 : ADN d'*Artemia*
- 2 : ADN de *P. indicus*
- 3 : ADN de *P. japonicus*
- 4 : ADN de *P. monodon*

3.2.3. Amplifications avec les ODNs ras

Plusieurs essais d'amplifications avec les couples d'amorces *ras5e-ras3e*, ou *ras5e-ras3i*, ont été effectués à différentes températures pour l'étape d'hybridation. Aucune amplification n'a été obtenue à partir des ADN génomiques de crevette. Cependant, une bande de 280 pb a été amplifiée avec les amorces *ras5e* et *ras3e* à partir de l'ADN génomique d'*Artemia sp.* (figure 32a) alors que la taille attendue était de 403 pb sur cette espèce (figure 31b). Cette amplification s'est révélée non spécifique après clonage et séquençage du fragment (Lee, comm. pers.).

En complément d'une PCR sur les différents génomes de pénéides, une hybridation de type Southern a été réalisée entre ces génomes et le fragment *ras* d'ADNc d'*Artemia* (702 bp) issu du plasmide *pcRas4* (figure 33). Alors qu'aucun signal n'est apparu à partir des ADN génomiques de *P. monodon* et *P. indicus*, un signal fort avec une bande correspondant à une taille de fragment supérieur à 12 kb a été obtenu à partir de l'ADN génomique de *P. japonicus*. De plus, une bande majeure de 3,9 kb, 4 bandes mineures de 0,8 kb, 2,2 kb, 4,2 kb et 8 kb ainsi que deux autres supérieures à 12 kb, ont été révélées sur l'ADN génomique d'*Artemia*.

3.2.4. Amplifications avec les ODNs rho

L'amorce *rho5e*, préalablement utilisée sur de l'ADN génomique de la moule *Mytilus edulis* et ayant conduit à une amplification non spécifique (Noël, comm. pers.), celle-ci n'a pas été utilisée pour réaliser la PCR sur l'ADN génomique de pénéides. Par contre, avec les amorces *rho5i* et *rho3i*, une bande de 160 pb correspondant à la taille attendue a été amplifiée à partir de l'ADN génomique de crevettes pénéides mais pas de l'ADN génomique d'*Artemia sp.* (figures 32b et 32c).

3.2.5. Caractérisation des fragments amplifiés (clonage, dot-blot et séquençage)

Les bandes de 160 pb amplifiées par PCR à partir de l'ADN génomique de *P. monodon*, *P. japonicus* et *P. indicus* ont été purifiées par Genclean (Stratagene). Dans le cas de *P. monodon*, le fragment amplifié a été cloné dans le plasmide pBluescript II KS+. Trois clones recombinants ont été obtenus après vérification par coupures avec des enzymes de restriction et par hybridation en dot-blot avec le fragment *rho* d'*Aplysia californica* de 1 kpb (figure 34). Parmi les trois clones identifiés, deux ont été séquencés (*pSH-RHO1* et *pSH-RHO2*). L'analyse de leurs séquences a révélé une différence d'une base A en G (figures 35

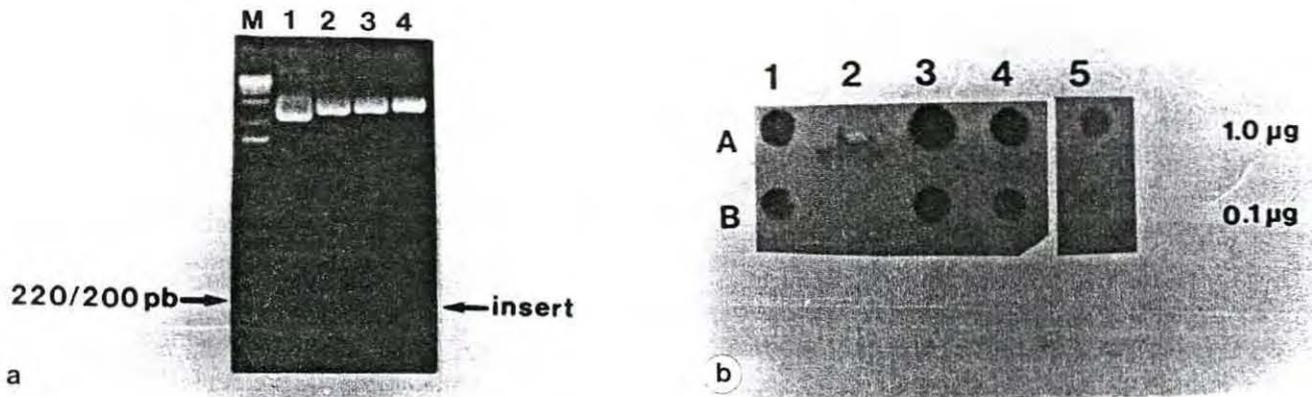


Figure 34 : Identification des clones recombinants contenant le fragment (160 bp) amplifié avec les amorces *rho5i* et *rho3i* à partir du génome de *P. monodon*.

a : Digestion par *EcoRI* et *XhoI*.

M : Marqueur de taille

1 à 4 : clones recombinants

b : Hybridation non radioactive en dot-blot avec la sonde *rho* d'*Aplysia californica*.

1 à 4 : clones recombinants

5 : plasmide pBluescript

volume de dépôt : B=A/10

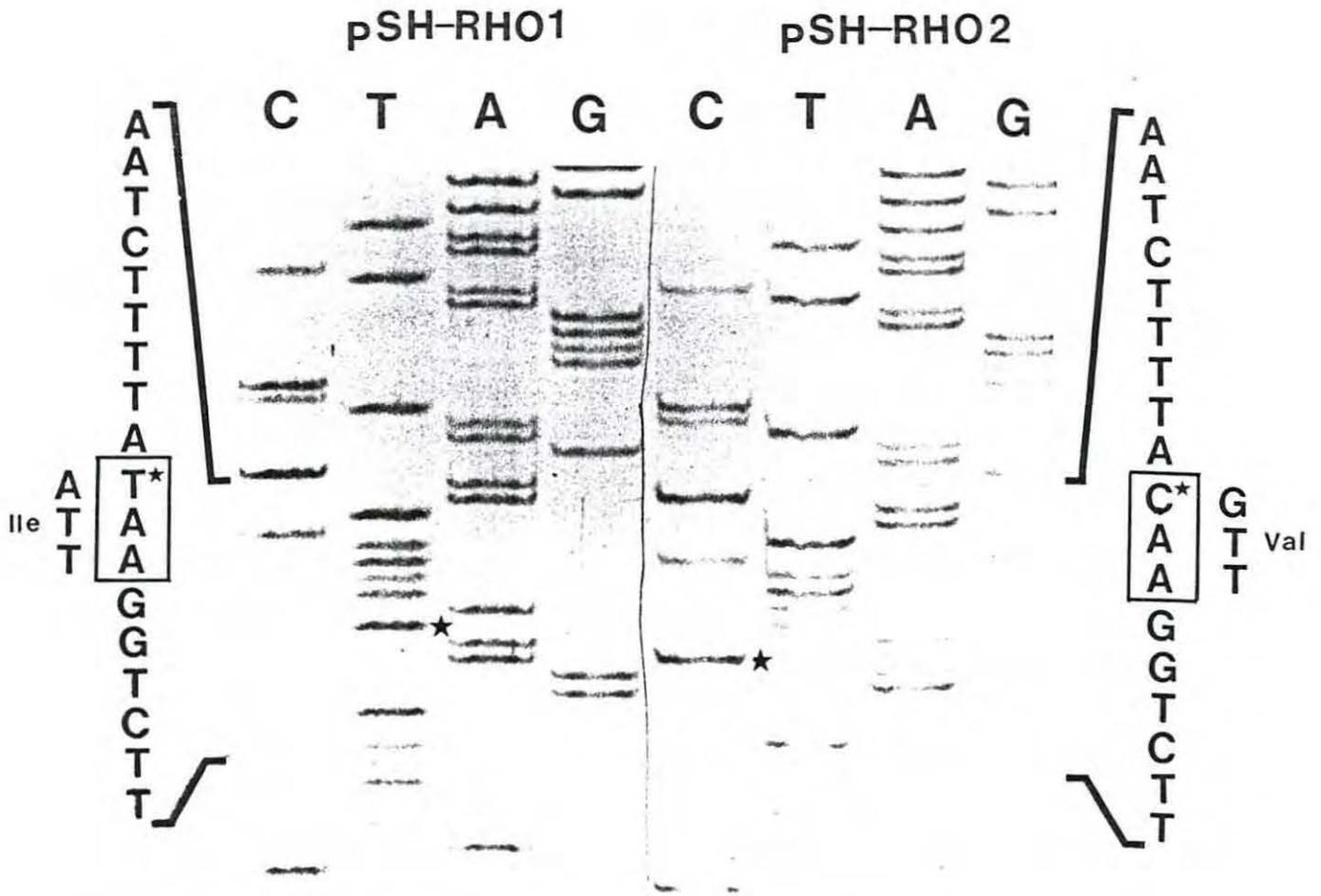


Figure 35 : Partie du profil de séquençage du fragment de 160 bp amplifié et dans pSH-*rho1* et pSH-*rho2*.

différence conduit au niveau des acides aminés au remplacement de l'isoleucine (ATT) par un résidu valine (GTT).

	D R L R P L S Y P D T D V I L M C
pSH-RHO1	GACAGATTGAGGCCACTGTCCTACCCCGACACAGATGTCATACTCATGTGT
pSH-RHO2	-----
	D R L R P L S Y P D T D V I L M C
	F S I D S P D S L E N I* P E K W T
pSH-RHO1	TTCTCTATTGATTCCCGGATTTCGTTAGAAAATATTCCAGAAAAATGGACG
pSH-RHO2	-----G-----
	F S I D S P D S L E N V* P E K W T

Figure 36 : Comparaison des séquences pSH-RHO1 et pSH-RHO2
 - : homologie de séquence
 * : différence d'acide aminé

Des homologies de séquence de la séquence *rho* (102 bases) de pSH-RHO1 ont été recherchées parmi toutes les séquences nucléiques disponibles dans GENBANK ainsi que toutes les séquences protéiques de la banque NBRF à l'aide de l'algorithme FASTA. Au niveau des acides nucléiques, la séquence *rho* de crevette pénéide est plus proche des séquences *rho* de Mammifère (81,2 % - 78,7 %) que de la séquence *rho* de la levure (76 %), et présente 77,5 % d'homologie avec la séquence *rho* d'*Aplysia californica* (annexe 21). Au niveau des acides aminés, la séquence déduite de 34 acides aminés est 100 % homologue avec les séquences *rho* des Mammifères et d'*Aplysia californica*, 97 % avec la séquence *rhoB* humaine et 78.8 % avec la séquence *rho* de la levure (annexe 22).

4. DISCUSSIONS - CONCLUSION

L'étude du génome des Crustacés s'est située jusqu'à présent surtout au niveau cytogénétique montrant ainsi une très grande variation de la taille du génome chez les Crustacés décapodes (Chow *et al.*, 1990) en dépit d'une probable absence de polyploïdisation au cours de leur évolution (Vaughn, 1975). A un niveau plus fin d'analyse, c'est principalement le génome du genre *Artemia* qui a été étudié compte tenu de ses avantages expérimentaux sur les autres genres. Ainsi, au niveau moléculaire, des séquences variées sont connues comme des gènes ribosomiques (Gallego *et al.*, 1987) avec l'identification du site d'initiation (Gil *et al.*, 1987), des gènes d'actine (Macias et Sastre, 1990), d'histones (Bagshaw *et al.*, 1987) ou de protéines marqueuses de l'évolution (Bhattacharyya *et al.*, 1990). Concernant les génomes mitochondriaux, c'est encore celui

d'*Artemia* qui, après étude de son organisation par Southern blotting et comparaison de séquences, s'avère être très semblable à celui de la drosophile (Batuecas *et al.*, 1988), suggérant ainsi une assez faible distance phylogénétique entre ces Arthropodes.

Parmi les autres séquences connues chez *Artemia*, celles d'ADN répété présentent un intérêt potentiel dans le cadre de la transformation génétique. En effet, selon les travaux de Marchesi *et al.* (1989), la cotransformation d'un gène étranger avec de l'ADN répété pourrait intervenir favorablement sur le processus d'intégration. Ainsi, ce type d'ADN, hautement répété, a été recherché de façon similaire chez les Crustacés du genre *Penaeus*. Parmi les approches de mise en évidence de telles structures répétées au sein du génome des pénéides, celles qui n'ont pas été basées sur une hypothétique homologie de séquence avec le fragment répété d'*Artemia* (Séparation sur gradient de CsCl et digestion enzymatique) ont révélé une similarité dans l'organisation des deux génomes. L'étape ultérieure pourrait être l'isolement du motif repéré chez *Penaeus* afin d'insérer plusieurs de ses copies dans la construction de vecteurs expérimentaux d'intégration en les plaçant notamment aux extrémités. En effet, le phénomène de recombinaison homologue est naturel chez la levure mais observé chez la souris avec de très faibles taux de réussite dans le ciblage de séquences flanquées d'extrémités appartenant à l'espèce transfectée.

Dans le même ordre d'idée, la caractérisation d'autres séquences répétées telles que les gènes ribosomiques ou d'histones devront être entreprises. Dans l'hypothèse où le processus d'intégration par recombinaison homologue s'avèrera être un phénomène suffisamment fréquent et précis chez les Crustacés, cette stratégie d'augmentation du taux d'intégration et/ou de précision d'intégration pourrait être développée.

La stratégie de recherche par PCR d'une séquence de gène sur un génome eucaryote de quelques milliards de paires de bases a déjà été utilisée avec succès (Stephen *et al.*, 1986) même en partant de séquences protéiques très conservées consensus dont au moins le troisième résidu de chacun des codons était très variable (Sakanari *et al.*, 1989). Son avantage sur les autres méthodes de recherche de gènes est de s'affranchir de la création de banques et de leur criblage par des sondes nucléiques dont l'homologie peut être suffisante pour produire des hybridations spécifiques (Scharf *et al.*, 1986). L'utilisation d'oligonucléotides correspondant à des séquences consensuelles peut alors être nécessaire, la PCR pouvant avantageusement remplacer l'hybridation classique. Cette stratégie basée sur l'emploi de la PCR est applicable à des régions très conservées parmi des espèces phylogénétiquement éloignées mais elle ne permet pas bien sûr de caractériser et d'isoler un gène dont on ne connaît pas de séquence apparentées. Les séquences nucléiques des gènes *hsp70* et *ras* ou *ras*-homologue sont bien connues chez de nombreuses espèces et la stratégie retenue a pu s'appliquer mais n'aboutir qu'à une identification effective que dans le cas du gène *rho*. Cette stratégie qui repose sur la détection de régions phylogénétiquement

conservées puis à leur amplification par PCR, est à notre connaissance originale chez les Crustacés alors qu'elle tend à se vulgariser dans de nombreux groupes zoologiques.

Concernant le gène *hsp70*, l'approche par PCR ne s'est pas révélée fructueuse pour isoler une portion ni du promoteur ni de la phase codante du gène *hsp70* de *Penaeus*. Les amplifications non spécifiques obtenues peuvent être expliquées soit par la petite taille et la forte dégénérescence de l'amorce C (motif Pelham dégénéré) qui n'a pu se fixer de façon préférentielle dans la région en 5' non codante, soit par l'absence réelle du motif Pelham chez *Penaeus*. Il faut rappeler qu'Innis *et al.* (1990) estiment qu'une longueur de 20 à 30 nucléotides est nécessaire pour une hybridation correcte, ce qui est en faveur de la première hypothèse.

Une approche totalement similaire ayant récemment conduit Cooperstein et Chen (1991, séquences non publiées) à identifier un fragment codant de *hsp70* chez l'huître, de nouvelles amorces pourraient être choisies et testées.

L'hypothèse relative à l'absence du motif Pelham, tel qu'il est décrit chez la drosophile, ne pourra être vraisemblablement vérifiée qu'après le séquençage du promoteur de *hsp70* chez des pénéides par d'autres voies plus classiques comme le criblage d'une banque génomique par l'ADNc de *hsp70* de la drosophile par exemple.

D'autres gènes auraient pu être préférentiellement recherchés par cette méthode, tels que des gènes antimicrobiens de type cécropines ou diptéricines (Reichhart *et al.*, 1989 ; Lidholm *et al.*, 1987 ; Kockum *et al.*, 1984). Cependant, leurs séquences sont trop spécifiques d'un groupe zoologique pour pouvoir déduire des séquences consensus exploitables en PCR. Par contre, parmi les séquences disponibles chez *Artemia*, les proto-oncogènes sont intéressants dans l'optique d'immortalisation de cellules de Crustacés. L'identification de proto-oncogènes homologues apparaît une voie de recherche à développer si l'on se réfère aux travaux réalisés dans ce domaine chez les Vertébrés. A ce jour, la connaissance limitée du génome des Crustacés pénéides montre qu'il est opportun d'aborder l'identification d'oncogènes selon une stratégie faisant appel à la recherche de régions conservées dans ces gènes au travers de différents groupes zoologiques (De Loof et Schoofs, 1990) puis à l'amplification des séquences homologues par PCR (Innis *et al.*, 1990).

A propos du gène *rho*, en dépit d'amorces relativement courtes avec un taux de dégénérescence assez élevé, la PCR a permis d'amplifier sélectivement chez *Penaeus monodon* une portion du gène *rho*. Les séquences de différents fragments clonés ont révélé une seule différence concernant dans tous les cas le même nucléotide. Il est de ce fait peu probable qu'il s'agisse d'erreurs liées à l'activité de la polymérase thermostable mais plutôt d'une variabilité du gène, les codons correspondant respectivement à des acides aminés très proches (Ile et Val) d'un point de vue physico-chimique. Cette variabilité pourrait correspondre à différentes copies du gène d'après les résultats en Southern blot ou bien à une mutation silencieuse. Les fragments amplifiés et clonés constituent maintenant des

réactifs spécifiques utiles pour identifier l'ensemble du gène et pour étudier son expression spatio-temporelle au cours du développement embryonnaire mais aussi au cours de phénomènes de mues et de régénérescence d'appendices. Ces données seront utiles pour préciser le rôle des proto-oncogènes dans les processus normaux de multiplication cellulaires ainsi que dans les quelques cas de tumeurs décrits chez les Crustacés (Overstreet et Van Devender, 1978 ; Lightner et Brock, 1987 ; Sparks et Lightner, 1973). L'accumulation de ces données est à considérer compte tenu de l'importance et de l'urgence à établir des lignées cellulaires pour ces animaux.

En ce qui concerne la recherche du gène *ras*, aucun fragment n'a été amplifié à partir des ADNs génomiques de *P. indicus*, *P. japonicus* et *P. monodon*. Cependant, le signal important obtenu en Southern-blot avec la sonde *ras* d'*Artemia sp.* sur l'ADN de *P. japonicus* renforce la possibilité d'identification de ce gène. Aussi, de nouvelles expériences de PCR devront être réalisées mettant en oeuvre des ODNs dégénérés comme cela été fait pour la recherche du gène *rho* ou bien en procédant au criblage d'une banque génomique. Sur la base de ces premiers résultats et compte tenu de la multiplication des caractérisations des oncogènes chez des représentants de groupes zoologiques éloignés (Nématodes, Insectes, Vertébrés inférieurs), il devrait être possible dans l'avenir d'identifier d'autres proto-oncogènes de Crustacés selon cette stratégie dans l'optique d'immortalisation par cotransfection cellulaire (Samarut, 1990).

**CONCLUSIONS GENERALES ET
PERSPECTIVES**

La stratégie de recherche sur la transgénèse chez les Crustacés a été abordée par ses aspects méthodologiques en l'absence de données spécifiques. Par contre, cette stratégie nouvelle pour les Crustacés a été envisagée par référence aux très nombreuses données disponibles chez d'autres groupes animaux et végétaux tout en intégrant les particularités biologiques des Crustacés, dont certaines étaient d'ailleurs mal connues.

A partir des résultats de ce présent travail, une double analyse peut être menée concernant d'une part les modèles biologiques retenus et d'autre part les étapes abordées pour l'obtention d'un transgène (introduction d'ADN, intégration, expression transitoire).

Les modèles biologiques

Les expérimentations ont principalement porté sur deux genres différents (*Artemia* et *Penaeus*). Le premier, très facile à mettre en élevage et à reproduire dans n'importe quel laboratoire, s'est avéré être tout à fait adapté à la mise au point de techniques spécifiques de l'embryon ultérieurement transposables au genre *Penaeus* avec des modifications mineures. En effet, au niveau cellulaire, du fait de l'absence de lignées établies chez les Crustacés, l'expérimentation reste actuellement très limitée. A l'échelle de l'embryon, par contre, les premières microinjections, effectuées sur l'*Artemia*, ont pu rapidement conduire à l'établissement d'un protocole d'ailleurs identique pour les espèces des deux genres qui ont été manipulées (*A. franciscana*, *P. indicus*, *P. monodon*). Concernant la biolistique et l'électroporation, on peut s'attendre à une adaptation rapide des résultats qui ont été établis pour *Artemia* chez des pénéides. Cependant, pour cette dernière famille, dont l'élevage complet s'est avéré difficilement accessible à l'échelle d'un laboratoire, il semble devoir s'orienter vers la participation de laboratoires situés en zone d'élevage ou de structures de recherches telles que le COP (IFREMER, Tahiti) qui pourraient éventuellement développer des travaux dans ce domaine. De même, des Centres d'expérimentation à caractère zootechnique mais très concernés par la transformation génétique, par exemple l'Institut Océanique d'Hawaï, pourraient être impliqués. De tels rapprochements, effectués dans le cadre d'une collaboration internationale, permettraient de progresser beaucoup plus rapidement dans le domaine de recherche de la transgénèse chez les Crustacés.

Introduction d'ADN

Concernant l'étape d'introduction d'ADN dans des embryons pour l'obtention d'un transgène, les méthodes qui ont été utilisées appartiennent aux méthodes dites physiques (injection, biolistique, électroporation).

Il pourrait être possible d'expérimenter d'autres méthodes d'introduction notamment médiée par un système vecteur biologique. Tout comme les Baculovirus d'Insectes qui sont

largement utilisés en tant que vecteur d'expression en système cellulaire d'Insecte, des promoteurs de gènes viraux d'Insectes puis de Crustacés lorsque ces derniers seront caractérisés, pourraient être à même de contrôler l'expression d'un gène étranger chez les Crustacés. Concernant les virus connus chez les crevettes, il est possible que certains puissent être utilisés comme vecteurs d'intégration dans le génome. En effet, l'IHHN a été récemment assimilé à la famille des Parvoviridae (Bonami *et al.*, 1990). Or il a été montré que des Densovirus (Parvoviridae) d'insectes ont une capacité d'intégration certainement liée à leur structure génomique caractérisée par la présence de séquences terminales répétées (Giraud *et al.*, 1992 ; Rolling 1992). De plus, ces virus pourraient aussi se maintenir sous forme d'épisome dans les cellules ce qui permettrait de les exploiter pour transformer des animaux indépendamment de phénomènes d'intégration.

Parmi les autres méthodes dites "biologiques" d'introduction d'ADN, le chargement de spermatozoïdes en ADN étranger (Gagné *et al.*, 1991 ; Arezzo, 1989 ; Lavitrano *et al.*, 1989 ; Atkinson *et al.*, 1991 ; Castro *et al.*, 1990) reste une approche séduisante pour introduire un nouveau gène dans un génome. L'ADN introduit dans le sperme est en effet ainsi assuré de parvenir au pronucleus femelle, soit parce qu'il serait déjà intégré dans le génome du pronucleus mâle avant la caryogamie, soit parce qu'il serait présent dans le pronucleus mâle et en contact étroit avec le matériel génomique. Cette méthode élégante de transformation suppose néanmoins de pouvoir tout d'abord introduire de l'ADN dans un pool de spermatozoïdes sans affecter leur pouvoir fécondant et réaliser ensuite une fécondation *in vitro* avec un bon taux de fécondation. Ces deux étapes apparaissent encore comme un obstacle chez *Penaeus* dans la mesure où la fécondation *in vitro* n'est pratiquement pas maîtrisée et où les spermatophores prélevés sur les mâles de pénéides perdent presque totalement leur capacité d'adhésion et donc leur pouvoir fécondant lorsqu'ils sont dissociés en spermatozoïdes. Néanmoins, ces inconvénients pourraient être surmontés principalement chez les espèces à thélycum fermé où les taux de fécondation sont très supérieurs à ceux obtenus chez des espèces à thélycum ouvert. Juste avant leur mise en place sur le ventre de femelles qui sont sur le point de pondre, il serait en effet possible d'envisager d'introduire de l'ADN exogène dans des spermatophores non dissociés. Pour ce faire, la biolistique sur les spermatophores semblerait bien adaptée contrairement à l'électroporation ou la lipofection qui seraient inefficaces sur un spermatophore entier car elles doivent pouvoir agir sur la membrane de chacun des spermatozoïdes.

La microinjection est apparue bien appropriée pour l'*Artemia* en regard du faible effectif de chacune de ses pontes mais, du fait de l'extrême variabilité des molécules inoculables, elle reste aussi tout à fait génératrice de multiples applications pour des espèces à taux de fécondité comme les pénéides (150 à 500 000 oeufs pour *P. indicus*). De plus, cette technique qui offre une bonne fiabilité dans l'introduction de grandes quantités d'ADN par embryon (100 à 30000 copies ; Minhas et Voelkel, 1989), permettrait d'injecter plusieurs

centaines d'embryons par jour dans des structures de production qui en manipulent plusieurs millions dans le même temps. De plus, ces performances pourraient être augmentées en pratiquant la microinjection sur des stades 2 ou 4 cellules. En effet, outre le fait de pouvoir quand même analyser l'effet d'un ADN introduit en expression transitoire, des animaux chimériques pourraient être ainsi créés. Ces derniers pourraient être criblés en G0 ou en G1 par des analyses en "Southern" sur des biopsies (pattes, sang par exemple). Il faut néanmoins noter qu'une analyse en G1, si elle permet de déterminer les individus transgéniques, suppose de garder au moins un an les crevettes issues des embryons injectés. Enfin, quel que soit le stade injecté, l'opacité des réserves vitellines cytoplasmiques ne permettent pas de visualiser les pronuclei chez les Crustacés. De ce fait, l'introduction de molécules ne peut s'effectuer, à court terme, que dans le cytoplasme. A moyen terme, il pourrait être envisagé de colorer spécifiquement les pronuclei (Minhas et Voelkel, 1989 ; Prather, 1990) ou d'injecter l'ADN associé à des peptides de "targeting nucléaire". En effet, ce type de peptides tels que des oligopeptides correspondants à l'antigène T du virus SV 40, un heptapeptide PKKKRKV, ont été montrés extrêmement efficaces, après couplage avec des protéines, pour les transporter dans le noyau (Chelsky *et al.*, 1989). Néanmoins, l'introduction dans le cytoplasme reste relativement efficace comme cela a été démontré pour des expérimentations de transfert de gènes chez les Echinodermes (McMahon *et al.*, 1985 ; Hough-Evans *et al.*, 1987) et les Poissons (Ozato *et al.*, 1989) avec toutefois une faible fréquence d'intégration (10^{-2} à 10^{-5}).

Intégration

Face à la double constatation que le phénomène d'intégration est un événement rare, deux moyens pourraient partiellement compenser cet inconvénient avec d'une part l'augmentation du nombre des individus traités en utilisant des traitements de masse comme la biolistique et d'autre part l'emploi de construit susceptible de s'intégrer avec une haute fréquence.

La biolistique a permis de traiter 10^5 embryons d'*Artemia* de façon simultanée. Cet effectif, qui s'est avéré suffisant pour détecter un signal d'expression transitoire, serait encore compatible avec des chances d'intégration chez l'*Artemia* à condition de disposer de systèmes de criblage comme l'emploi de gènes de sélection (gène néomycine par exemple). Une extrapolation des paramètres établis pour le bombardement d'*Artemia* pourrait rapidement s'envisager à des larves de *Penaeus*. Cette technique "de masse" apparaît d'autant plus adaptée aux embryons que la membrane chorionique qui entoure les embryons quelques instants après la fécondation est franchissable par des particules. La nécessité d'appliquer une méthode sur plusieurs centaines d'oeufs à la fois, pour espérer pouvoir transformer, est non seulement d'accéder à des tailles d'échantillon compatibles avec les

taux de transformation mais aussi de pouvoir évaluer qualitativement puis quantitativement la structure des construits introduits (force du promoteur, présence d'introns, régions régulatrices, forme superenroulée ou linéaire).

Outre le fait d'être rare, l'intégration est aléatoire (Murnane *et al.*, 1990). En survenant à un site permissif dans l'euchromatine hôte, un gène qui s'intègre peut perturber un locus fonctionnel résident. Ceci explique pourquoi les lignées d'organismes transgéniques peuvent rarement être maintenues à l'état homozygote. L'intégration est un mécanisme encore assez peu compris et incontrôlé dans la majorité des organismes transformés à l'heure actuelle (Bishop et Smith, 1989). Par exemple, l'intégration de concatémères tête-tête en multiples copies est chose fréquente (Goedon et Ruddle, 1985). Il apparaît donc que la recherche de systèmes d'intégration à des sites spécifiques pourrait non seulement améliorer l'efficacité d'intégration mais aussi permettre un contrôle sur la façon ou sur le site dans lequel l'ADN s'intègre. Dans ce domaine, certains groupes d'organismes bénéficient déjà de particularités ou d'applications qui confèrent un contrôle plus ou moins précis sur la fréquence et le site d'intégration (virus vecteur d'intégration, transposons, recombinaison homologue, système recombinase de levure).

Pour la transformation de lignées germinales, comme celle de la *Drosophila melanogaster*, ou le "transposon tagging" (Gierl et Saedler, 1992), des représentants de la famille des éléments mobiles activateurs sont couramment utilisés.

Ces éléments transposables de la famille des éléments mobiles sont soupçonnés de participer aux événements évolutifs des génomes eucaryotes et se retrouvent dispersés dans la plupart des phylum (Berg et Howe, 1989). Ils présentent des similarités parfois très fortes comme celles entre les séquences d'une transposase de drosophile et de plante (Calvi *et al.*, 1991). Un transposon est une séquence d'ADN capable de changer de localisation dans le génome (avec ou sans duplication) sans jamais apparaître à l'état libre. Ce type de séquence, introduit dans une cellule embryonnaire, s'intègre spontanément mais au hasard. Son emploi ne permet donc pas de privilégier un site d'intégration. Ceci explique pourquoi cette technique permet de mettre en évidence et de cloner des gènes inconnus lorsque l'intégration se produit au sein d'un gène codant pour une protéine et qu'elle conduit à une altération sélectionnable du phénotype. Son emploi avec un plasmide "helper" permet cependant d'augmenter de façon très importante le taux d'intégration (1 intégration pour 100 injections chez *Drosophila melanogaster*). Il faut cependant noter que des transposons hétérologues semblent peu fonctionnels car très spécifiques. Par exemple, l'élément P, opérationnel chez la drosophile, n'est pas fonctionnel chez les autres genres de Diptères (Walker, 1988). A ce titre, des stratégies d'isollements et d'analyses de tels éléments chez les Crustacés devraient être développées en priorité. Chez le moustique *Anopheles gambiae* par exemple, l'identification de l'un d'eux a été réalisée par le criblage d'une banque

génomique pour repérer des répétitions de séquences (Besansky, 1990) car ce type d'éléments correspond à de l'ADN moyennement répété chez la drosophile. Il n'est pas certain qu'un élément identifié chez les Crustacés par cette technique se révèle être un bon vecteur de transformation. D'autres approches devraient donc aussi être entreprises comme la recherche de phénomènes de dysgenèse hybride qui ont conduit par exemple à caractériser chez le Nématode *Panagrellus redivivus* un élément transposable susceptible d'être utilisé comme vecteur de transformation du Nématode modèle *C. elegans* (Link *et al.*, 1987). De même, la recherche de mutations génétiques instables peuvent conduire à la mise en évidence de tels éléments mobiles (Besansky *et al.*, comm. pers.).

La levure possède une recombinase (FLP) qui catalyse la recombinaison spécifique du site FRT dans le génome. Le gène codant pour cette enzyme et ses cibles de recombinaison (FRT issu du plasmide 2 μ m de levure) ont été testés avec succès dans d'autres systèmes biologiques.

Ainsi, l'implantation de ce système binaire dans des lignées cellulaires de mammifères a permis d'activer un gène et de cibler l'intégration d'un ADN transfecté vers un site spécifique du génome (O'Gorman *et al.*, 1991). A l'échelle de l'individu, ce système fonctionne de façon extrachromosomique chez *Drosophila* (Galic et Lindquist, 1989) et chez le moustique *Aedes* (Morris et Schaub, 1991). En effet, la coinjection d'embryons avec un gène FLP sous le contrôle de *phsp70* et des plasmides cibles flanqués de sites de recombinaison FRT, a donné lieu à la recombinaison médiée par FLP entre les sites FRT d'un plasmide et ceux de plasmides séparés. Dans la recherche d'un pilotage de l'intégration chez les Crustacés, il sera intéressant d'y tester ce système hétérologue. S'il fonctionne chez les Crustacés, ce système pourrait conduire à créer des individus transformés avec des séquences FRT susceptibles de se recombiner et d'intégrer n'importe quel ADN à cet endroit à l'image d'un lecteur de cassettes capable de lire différentes cassettes.

La technique récente d'intégration ponctuelle du matériel génétique par ciblage génique a permis de modéliser beaucoup de maladies génétiques humaines et quelques cancers qui résultent de la mutation d'un seul gène (Melton, 1991). C'est pourquoi ces maladies sont de plus en plus reproduites par des souris transgéniques créées par cette technique en altérant un seul codon voire une seule base sur leur génome. Le ciblage génique par recombinaison homologue (annexe 23) permet de remplacer une séquence endogène par une autre exogène ou bien d'insérer une séquence connue à une position précise du génome. Cette stratégie repose sur une homologie de séquence entre le morceau à intégrer et celui qu'il doit remplacer (remplacement) ou celui qui le reçoit (insertion). Cette opération implique qu'un gène donné va s'intégrer dans son homologue génomique. Son application majeure dans le futur est la gènothérapie qui visera à remplacer une séquence malade par une

séquence saine. Pour la création d'organismes transgéniques, ce mécanisme de faveur de site d'intégration pourrait être mis à profit en ajoutant des portions homologues à la région ciblée de part et d'autre du néogène à introduire. Ainsi, la séquence des régions cibles doit être connue afin d'en ligaturer une copie de part et d'autre de l'ADN non endogène. Chez les Mammifères, pour une recombinaison efficace, la quantité d'homologie se situe entre 164 bp et 400 bp (Bollag *et al.*, 1989). Les régions réceptrices de Crustacés devraient posséder les caractéristiques suivantes : se situer dans des domaines où la transcription et la traduction puissent avoir lieu, exister en plusieurs copies contiguës ou dispersées afin d'augmenter les taux d'intégration et enfin ne pas être essentielles pour la vie normale de l'organisme. Ainsi, les séquences d'ADN répété comme l'ADN satellite, les gènes ribosomiques ou les gènes d'histones apparaissent comme des cibles potentielles à caractériser pour de la recombinaison ou de la coinjection avec le gène à intégrer. Chez *Nicotiana*, en effet, la coinjection d'un gène d'intérêt avec de l'ADN hautement répété engendre une nette augmentation du taux d'intégration du plasmide d'intérêt (Marchesi *et al.*, 1989).

Les systèmes précédents (éléments mobiles, système recombinase, recombinaison homologue ou "gene targeting") devraient pouvoir être abordés tant sur l'embryon que sur des cellules embryonnaires de Crustacés comme cela se fait déjà chez la souris (Maryon et carroll, 1991). L'avantage de passer par la transformation de cellules embryonnaires qui sont ensuite implantées dans un autre embryon afin de participer au développement gonadique est la présélection du génotype désiré ou de la différence phénotypique. De plus, cette technique autorise une analyse très précise des altérations spécifiques du matériel génétique sans les inconvénients du transgène classique. Par rapport à l'introduction directe d'ADN dans l'embryon à un stade précoce, cette technique nécessite l'introduction de l'ADN dans des cellules embryonnaires suivie de la réimplantation de quelques cellules sélectionnées dans un autre embryon. Cependant, dans le cas des Crustacés, l'application de ce principe soulèverait de nouvelles difficultés techniques notamment le maintien et la sélection dans un milieu de culture qui reste à déterminer mais aussi la capacité d'embryons pluricellulaires à survivre à la macroinjection de cellules par l'intermédiaire d'aiguilles à ouverture beaucoup plus large que pour la microinjection d'ADN. Dans ce travail, la notion d'intégration n'a pas pu être prise en compte expérimentalement du fait essentiellement de la difficulté d'accès au matériel biologique.

Expression et gènes cibles

Dans le cadre de ce travail, les expressions transitoires des gènes marqueurs (*lac-Z* et *luc*) ont été obtenues dans des embryons et des cellules embryonnaires mais pas en primocultures dans les conditions de maintien que l'on a utilisé.

Ces résultats valident cependant les techniques de microinjection et de biolistique pour poursuivre la transformation génétique d'*Artemia* et de *Penaeus*. La microinjection, jointe à une méthode histologique fiable et sensible (immunofluorescence ou réaction colorimétrique de type X-gal sur frottis ou sur coupe), devrait permettre d'envisager une étude qualitative de l'expression notamment la spécificité spatio-temporelle de promoteurs. La biolistique, au contraire, apparaît mieux adaptée pour appréhender les aspects quantitatifs de l'expression liés par exemple à la construction nucléique introduite (enhancers, promoteurs plus ou moins "forts", autres séquences régulatrices...). Concernant les promoteurs, il n'est pas surprenant que celui correspondant au gène *hsp70* de la drosophile ait fonctionné compte tenu de l'extrême ubiquité de son fonctionnement notamment chez les plantes (Robert *et al.*, 1990 ; Schmulling *et al.*, 1989). L'activité de CMV, quoique localisée à quelques cellules chez les larves de *P. indicus*, est plus surprenante. En effet, celui-ci est habituellement parmi l'un de plus actifs chez les Mammifères (McGrégor, 1989). Néanmoins, si le promoteur *hsp70* de la drosophile paraît à présent susceptible d'être testé en amont d'autres gènes à des stades différents avec des inductions différentes, d'autres promoteurs hétérologues devront être testés à leur tour sans pour autant négliger la recherche de promoteurs homologues.

La recherche et la caractérisation de promoteurs homologues ainsi que de gènes candidats au transfert de gènes, représentent enfin un dernier point clef dans la démarche de création de Crustacés transgéniques. En effet, l'une des questions qui s'avère primordiale concerne les gènes à intégrer. Il ne faut pas oublier qu'un gène candidat au transfert de gènes chez les Crustacés n'est pas nécessairement un gène issu du génome des Crustacés et qu'il peut être d'origine très variée dans le règne animal ou végétal comme par exemple des gènes d'immunoglobulines de Mammifère introduits puis traduits par un tabac transgénique (Hiatt, 1990).

Aucune culture cellulaire n'est disponible actuellement chez les pénéides. Ceci représente un obstacle pour toute étude touchant à des agents pathogènes, comme les virus, à commencer par leur propagation. Dans la littérature, outre par l'emploi d'agents mutagènes, de nombreux cas d'établissement de lignées cellulaires à partir de tissus d'organismes transformés dans la nature ou *in vitro* par des oncogènes sont rapportés (Klein-Szanto *et al.*, 1991). Chez les pénéides, l'étude des tumeurs reste essentiellement descriptive sur la base d'observations histopathologiques (Lightner et Sparks, 1973 ; Overstreet et Van Devender, 1978 ; Lightner et Brock, 1987) lors de contrôles de routine et n'ont jamais donné lieu à l'établissement de cultures cellulaires. Par contre, parmi les proto-oncogènes *myc*, *abl*,

antigène T du virus SV40 et *ras*, ce dernier a été impliqué dans le développement et la progression de tumeurs humaines ou animales suite à son altération et à son activation en oncogène (Barbacid, 1990 ; Wirgin *et al.*, 1989 ; McMahon *et al.*, 1988). Ce proto-oncogène devient transformant lorsqu'il est mutagénisé au niveau de 2 codons bien définis et provoque l'apparition d'une grande variété de tumeurs dans tous les tissus. Il existe 3 catégories d'oncogènes *ras* (*H-ras1*, *K-ras2*, *N-ras*) qui permettent tous d'obtenir des lignées cellulaires et des tumeurs chez les mammifères. A ce titre, le proto-oncogène *ras* est un gène candidat au transfert dans un génome de Crustacé dans l'optique d'induire une tumorigénèse de cellules susceptibles d'initier l'établissement de cultures cellulaires de Crustacés.

Cet oncogène cellulaire *ras* a été trouvé chez de nombreux organismes allant de l'Homme aux levures les moins évoluées (*Saccharomyces pombe*) et séquencé notamment chez l'*Artemia* (Diaz-Guerra *et al.*, 1989). Cette dernière séquence, qui présente seulement 50-60 % d'homologie avec des eucaryotes inférieurs (*Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*) et 75-80 % d'homologie avec les gènes homologues de *Drosophila melanogaster* ou de Mammifère (*Ha-ras*, *Ki-ras*, *N-ras*), a pu être le point de départ de l'identification d'un tel proto-oncogène chez *Penaeus*. Cet oncogène cellulaire, muté *in vitro*, pourrait à présent être utilisé conjointement avec un autre gène transformant tels que *myc* pour perturber le cycle cellulaire et déclencher l'immortalisation.

En raison de l'importance des maladies infectieuses des Crustacés et de la rareté des moyens de prophylaxie, des gènes conférant une résistance à des pathogènes pourraient être prioritairement recherchés. A cet égard, il faut distinguer les virus des autres agents pathogènes dont les modes de réplication sont plus complexes.

Dans le règne animal, de nombreuses séquences codant pour des protéines qui présentent des propriétés microbicides et cytotoxiques ont déjà été identifiées. Ainsi, ont été mise en évidence les cécropines, les attacines et l'hémoline (superfamille des immunoglobulines) chez le ver à soie *Hyalophora* (Boman *et al.*, 1985 ; Sun *et al.*, 1990) ; les diptéricines et les défensines chez *Phormia* (Hoffmann et Hoffman, 1990) ; les magainines chez le Xénope (Zasloff, 1985) ; des homologues de cécropines chez le porc (Lee *et al.*, 1989) ; des bacténécines chez les bovins (Skerlavaj *et al.*, 1990) ou plus récemment un peptide antimicrobien chez la limule *Tachypleus* (Shigenaga *et al.*, 1990). De plus, le promoteur de certaines de ces protéines est déjà caractérisé comme celui des diptéricines de la drosophile (Hoffman, 1991). L'utilisation de telles molécules pour induire une résistance à des agents pathogènes a été testée chez les plantes (Jaynes *et al.*, 1987) et les Insectes. Les effets anti-parasitaires des magainines et des cécropines, sous la forme de peptides synthétiques, ont été démontrés vis-à-vis d'oocystes de différentes espèces de *Plasmodium* chez les moustiques. Une inhibition du développement du parasite chez l'anophèle a pu être observée consécutivement à l'injection de ces peptides (Gwadz *et al.*, 1989). De tels

CRUSTACES

(*Artemia*, *Penaeus*)

Introduction d'ADN **A**

- * microinjection
- * electroporation
- * biolistique
- * lipofection

Intégration **C**

- * virus
- * transposon
- * recombinaison homologue
- * système recombinaison

Expression **B**

- * expression transitoire
- * promoteur - enhancer

Figure 37 : Etapes clefs pour la création de crustacés transgéniques.

résultats suggèrent que l'expression de gènes codant pour ces peptides chez des Insectes transgéniques, peut conduire à l'acquisition d'une résistance à des pathogènes. De même, chez les Crustacés d'élevage, une tentative de contrôle de certaines pathologies bactériennes notamment pourrait être envisagée.

Concernant plus spécifiquement les viroses, les cas de résistance après transformation sont ceux qui sont obtenus chez des plantes transgéniques qui codent pour une protéine virale, dont la préexistence à l'infection, perturbe l'infection (Grummet, 1990). Dans les élevages de pénéides, ce sont les Baculovirus qui sont responsables des viroses les plus sévères avec notamment les Baculovirus MBV, BP et BMN). L'infection par MBV ou BP peut être diagnostiquée en microscopie photonique par la recherche de corps d'inclusion intranucléaire et plus récemment par PCR pour MBV (Vickers *et al.*, 1990) bien que son génome ne soit pas cloné. Les amorces de PCR utilisées ont été choisies sur le génome du Baculovirus^{*}d'Insecte. Cette méthode récente de diagnostic encore limitée à l'échelle du laboratoire, basée sur une reconnaissance préalable de séquences de l'ADN viral d'Insecte, plaide en faveur d'une similarité des génomes des Baculovirus d'Insectes et de pénéides. Partant de cette hypothèse et sachant que la biologie moléculaire du Baculovirus d'Insecte AcNPV est bien connue (Blissard et Rohrmann, 1990 ; Friesen et Miller, 1986), des gènes susceptibles d'inhiber la réplication virale sont des gènes candidats à être intégrés puis exprimés. Comme chez les Insectes, le Baculovirus de pénéide est infectieux à l'état de virion. Des gènes viraux impliqués respectivement dans la réplication du virion d'AcNPV (ADN polymérase "IE1") et de son passage de cellule à cellule ou "budding" (protéine gp64) sont connus chez l'Insecte et pourraient par conséquent devenir la cible d'un blocage par anti-sens, l'hôte *Penaeus* transgénique produisant à terme cet anti-sens (annexe 24). Evidemment, les problèmes d'expression comme le niveau d'expression devront être résolus ainsi que l'efficacité du blocage qui pourrait être renforcé par l'addition de structure ribozyme dans le construction anti-sens.

Parmi tous les domaines de recherche fondamentale et appliquée que la transformation génétique pourrait permettre d'aborder chez les Crustacés, actuellement seul celui qui conduit à assurer la pérennité des espèces élevées, essentiellement dans les pays en voie de développement, mérite d'être poursuivi. Dans cet objectif, qui repose sur les trois étapes clefs : A, B et C (figure 37), l'introduction d'ADN et l'expression ont été partiellement résolus dans le cadre de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- ABATZOPOULOS T.J., KASTRITSIS C.D., TRIANTAPHYLLIDIS C.D., 1986. A study of karyotypes and heterochromatic associations in *Artemia*, with special reference to two greek populations. *Genetica*, 71 : 3-10.
- ADAIR G.M., NAIRN R.S., WILSON J.H., 1990. Targeted gene replacement at the endogenous aprt locus in CHO cells. *Somatic Cell & Molecular Genetics*, 16(5) : 437-441.
- AL-SHAWI R., KINNAIRD J., BURKE J., 1990. Expression of a foreign gene in a line of transgenic mice is modulated by a chromosomal position effect. *Molecular And Cellular Biology*, 10(3) : 1192-1198.
- ALLEN S. K., 1986. Genetic manipulations. Critical review of methods and performances, shellfish. EIFAC/86/SYMP. R17.
- ANCHORDOGUY T., CROWE J.H., GRIFFIN F.J., CLARK W.H., 1988. Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Cryobiology* : 25 : 238-243.
- ANDREASON G.L., EVANS G.A., 1988. Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotech.*, 6(7) : 650-660.
- ANDRES A.C., MUELLENER D.B., RYFFEL G.U., 1974. Persistence methylation and expression of vitellogenin gene derivatives after injection into fertilized eggs of *Xenopus laevis*. *Nucl. Acids Res.*, 12 : 2283-2302.
- ANZAI H., YONEYAMA K., YAMAGUCHI I., 1989. Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. *Mol. Gen. Genet.*, 219 : 492-494.
- AONO M., KUBO A., SAJI H., NATORI T., TANAKA K., KONDO N., 1991. Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that expresses the gene for glutathione reductase from *Escherichia-coli*. *Plant Cell Physiol.*, 32(5) : 691-697.
- AQUACOP, 1983. Constitution of broodstock, maturation, spawning and hatching systems for penaeid shrimps in the centre océanologique du pacifique. In: Handbook of Mariculture, McNey J.P. (eds.), 1 : 104-121.
- ARAI K., WILKINS N., 1987. Triploidization of brown trout (*Salmo trutta*) by heat shocks. *Aquaculture*, 64 : 97-103.
- ARANSHAH A., MESTRIL R., SCHILLER P., DREANO M., VOELLMY R., 1987. Organization of the *Drosophila melanogaster* hsp70 heat shock regulation unit. *Molecul. and Cellul. Biol.*, 7(3) : 1055-1062.
- AREZZO F., 1989. Sea urchin sperm as a vector of foreign genetic information. *Cell Biol. International Reports*, 13(4) : 391-404.
- ASANO Y., OTSUKI Y., UGAKI M., 1991. Electroporation-mediated and silicon carbide fiber-mediated DNA delivery in *Agrostis-alba* l (redtop). *Plant Sci.*, 79(2) : 247-252.
- ATKINSON P.W., HINES E.R., BEATON S., MATTHAEI K.I., REED K.C., BRADLEY M.P., 1991. Association of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 29(1): 1-5.
- BACHILLER D., SCHELLANDER K., PELI J., RUTHER U., 1991. Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 30(3) : 194-200.

- BAGSHAW J.C., ANDREWS M.T., PERRY B.A., 1987. Structure and expression of histone genes in *Artemia*. In *Bioch. and Cell Biol. of Artemia*, eds McRae, Bagshaw, Warner, pp 1–20.
- BALDARELLI R.M., LENGYEL J.A., 1990. Transient expression of DNA after ballistic introduction into *Drosophila* embryos. *Nucleic acids Research*, 18(19) : 5903–5904.
- BARBACID M., 1990. *ras* oncogenes : their role in neoplasia. *Euro. J. Clin. Inv.*, 20 : 225–235.
- BARIBAULT H., KEMLER R., 1989. Embryonic stem cell culture and gene targeting in transgenic mice. *Mol. Biol. Med.*, 6 : 481–492,
- BARTOLETTI D.C., HARRISON G.I., WEAVER J.C., 1989. The number of molecules taken up by electroporated cells : quantitative determination. *FEBS*, 256 , 1(2) : 4–10.
- BATUECAS B., GARESSE R., CALLEJA M., VALVERDE J.R., MARCO R., 1988. Genome organization of *Artemia* mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 16(14) : 6515–6529.
- BAULCOMBE D., 1989. Strategies for virus resistance in plants. *TIG*, 5(2) : 56–60.
- BEACHY R.N., STARK D.M., DEOM C.M., OLIVER M.J., FRALEY R.T., 1987. Expression of sequences of tobacco mosaic virus in transgenic plants and their role in disease resistance. In "Tailoring genes for crop improvement", G. Bruening *et al.* (eds.), 169–180.
- BEATON M.J., HEBERT P.D.N., 1989. Miniature genomes and endopolyploidy in cladoceran crustaceans. *Genome*, 32 : 1048–1053.
- BEHRINGER R.R., RYAN T.M., REILLY M.P., ASAKURA T., PALMITER R.D., BRINSTER R.L., TOWNES T.M., 1989. Synthesis of functional human hemoglobin in transgenic mice. *Science*, 245 : 971–973.
- BEKKAOUI F., PILON M., LAINE E., RAJU D.S.S., CROSBY W.L., DUNSTAN D.I., 1988. Transient gene expression in electroporated *Picea glauca* protoplasts. *Plant Cell Reports*, 7 : 481–484.
- BELKOWSKI L.S., FAN X.D., BLOOM B.R., 1989. Transfection of murine and human macrophage-like cell lines by cationic liposomes. *Focus*, 11 (2) : 35.
- BENFANTE R., LANDSBERGER N., TUBIELLO G., BADARACCO G., 1989. Sequence-directed curvature of repetitive *Alu1* DNA in constitutive heterochromatin of *Artemia franciscana*. *Nucleic Acids Research*, 17(20) : 8273–8282.
- BERG D.E., HOWE M.M., 1989. Mobile DNA. *Amer. Soc. Microbiol.*, ISBN1–55581–005–5, XII–972p, 28 CM, OLTRO268.
- BERNS A., BREVER M., VERBEEK S., VON LOHVIZEN M., 1989. Transgenic mice as a means to study synergism between oncogenes. *Int. J. Cancer*, 4 : 22–25.
- BERNSTEIN A., BREITMAN M., 1989. Genetic ablation in transgenic mice. *Mol. Biol. & Med.*, 6 : 523–530.
- BERTHELEMT-OKAZAKI N.J., HEDGECOCK D., 1987. Effect of environmental factors on cysts formation in the brine shrimp *Artemia*. In *Artemia Research and its Applications*, 3 : 167–182.

- BHATTACHARYYA K.K., BERGSTROM E.E., HOKIN L.E., 1990. Molecular cloning of the beta subunit of the Na,K-ATPase in the brine shrimp *Artemia*. The cDNA derived amino acid sequence shows low homology with the beta-subunits of vertebrates except in the single transmembrane and the carboxy terminal domains. *FEBS*, 269(1) : 233-238.
- BIDNEY D, SCELONGE C, MARTICH J, BURRUS M, SIMS L, HUFFMAN G, 1992. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium-tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 18(2) : 301-313.
- BISHOP J.O., SMITH P., 1989. Mechanisms of chromosomal integration of microinjected DNA. *Mol. Biol. Med.*, 6 : 283-298.
- BLISS J.G., HARRISON G.I., MOURANT J.R., POWELL K.T., WEAVER J., 1988. Electroporation : the population distribution of macromolecular uptake and shape changes in red blood cells following a single 50 μ s square wave pulse. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 20 : 57-71.
- BLISSARD G.W., ROHRMANN G.F., 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.*, 35 : 127-155.
- BOLLAG R.J., WALDMAN A.S., LISKAY R.M., 1989. Homologous recombination in mammalian cells. *Annual Review of Genetic*, 23 : 199-225.
- BOMAN H.G., FAYE I., HOFSTEN P.V., KOCKUM K., LEE J.Y., WANTHOPOULOS K.G., 1985. On the primary structures of lysozyme, cecropins and attacins from *Hyalophora cecropia*. *Dev. Comp. Immunol.*, 9 : 551-558.
- BONACCORSI S., GATTI M., PISANO C., 1990. Transcription of a satellite DNA on two Y chromosome loops of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 99 : 260-266.
- BONAMI, 1990. *J. Gen. Virol.*, 71 : 3657-3664.
- BONIFER C., VIDAL M., GROSVELD F., SIPPEL A.E., 1990. Tissue specific and position independent expression of the complete gene domain for chicken lysozyme in transgenic mice. *EMBO J.*, 9(9) : 2843-2848.
- BONNEROT C., GRIMBER G., BRIAND P., 1990. Patterns of expression of position dependent integrated transgenes in mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 6331-6335.
- BOULAY J.L., DENNFELD C., ALBERGA A., 1987. The *Drosophila* development gene *snail* encodes a protein with nucleic acid binding fingers. *Nature*, 330 : 395-398.
- BOULO V, HERVIO D., MORVAN A., BACHERE E., MIALHE E., 1991. *In vitro* culture of mollusc hemocytes. Functional study of burst respiratory activity and analysis of interactions with protozoan and procaryotic pathogens. Worl Congress on Cell and Tissue Culture, Anaheim (California USA), 1-20 june 1991.
- BRAZOLOT C.L., PETITTE J.N., ETCHES R.J., GIBBINS A.M.V., 1991. Efficient transfection of chicken cells by lipofection, and introduction of transfected blastodermal cells into the embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 30(4) : 304-312.
- BREM G., BRENIG B., HORSTGEN-SCHWARK G., WINNACKER E.L., 1988. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 68 : 209-219.
- BREM G., WANKE R., WOLF E., 1989. Multiple consequences of human growth hormone expression in transgenic mice. *Mol. Biol. Med.*, 6 : 531-547.

- BRISKIN M.J., HSU R.Y., BOGGS T., SCHULTZ J.A., RISHELL W., BOSSELMAN R.A., 1991. Heritable retroviral transgenes are highly expressed in chickens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(5) : 1736-1740.
- BROWN L.L., RICKS R., EVELYN T.P.T., 1990. Experimental intra-ovum infection of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) eggs with *Renibacterium salmoninarum* using a microinjection technique. *Dis. Aqu. Org.*, 8 : 7-11.
- BUHLER T.A., 1990. Rabbit β -casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbit. *Biotechnol.*, 8 : 140-143.
- BUONO R.J., LINSER P.J., 1991. Transgenic zebrafish made by electroporation. In The Second International Marine Biotechnology Conference (Poster). Oct. 3-16, 1991. Baltimore, Maryland, USA.
- BURTON F.H., HASEL K.W., BLOOM F.E., SUTCLIFFE J.G., 1991. Pituitary hyperplasia and gigantism in mice caused by a cholera toxin transgene. *Nature*, 350(6313) : 74-77.
- BUSBY S.J., REEDER R.H., 1983. Spacer sequences regulate transcription of ribosomal gene plasmids injected into *Xenopus* embryos. *Cell*, 34 : 989-996.
- CABRERA C.V., ALONSO M.C., JOHNTON R.G., PHILLIPS, LAWRENCE P.A., 1987. Phenocopies induced with anti-sense RNA identify the *wingless* gene. *Cell*, 50 : 659-663.
- CADORET J.P., 1992. Electric field-induced polyploidy in mollusc embryos. *Aquaculture*, 106 : 127-139.
- CADORET J.P., DELECHENEAU J.M., GENDREAU S., MIALHE E. Protocols for microinjection of 1-cell embryos of bivalve molluscs and for detection of injected molecules. Soumis à *Aquaculture*.
- CALVI B.R., HONG T.J., FINDLEY S.D., GELBART W.M., 1991. Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants - *hobo*, *activator*, and *Tam3*. *Cell*, 66(3) : 465-471.
- CARMELANN B.Z., BEEBE D.C., 1991. Rapid re-amplification of PCR products purified in low melting point agarose gels. *Biotechniques*, 11 : 158-162.
- CARTER B.J., MENDELSON E., TREMPE J.P., 1990. AAV DNA replication, integration, and genetics. In Handbook of Parvoviruses (1): 169.
- CARTIER N., HAGEGE J., LACAVE R., BRIAND P., KAHN A., VANDEWALLE A., 1991. Establishment of kidney cell lines derived from transgenic mice. *Medecine/Science*, 7(4) : 413.
- CASTRO F.O., HERNANDEZ O., ULIVER C., SOLANO R., MILANES C., AGUILAR A., PEREZ A., 1990. Introduction of foreign DNA into the spermatozoa of farm animals. *Theriogenology*, 34 : 1099-1110.
- CAZENAVE C., STEIN C.A., LOREAU N., THUONG N.T., NECKERS I.M., SUBASHINGE C., HELENE C., COHEN J.S., TOULME J.J., 1989. Comparative inhibition of rabbit globin mRNA translation by modified antisense oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Research*, 17 : 4255.
- CHELSKY D., RALPH R., JONAH G., 1989. Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol. Cell. Biol.*, 9 : 2487-2492.

- CHEN L., LIM M.Y., BOSE H., BISHOP J.M., 1988b. Rearrangements of chicken immunoglobulin genes in lymphoid cells transformed by the avian retroviral oncogene *v-rel*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 549–553.
- CHEN T.T., ZHU Z., DUNHAM R.A., POWERS D.A., 1989. Gene structure, expression and inheritance of rainbow trout and human GH genes in carp and loach. In *Current topics in Marine Biotechnology*. Ed. Miyachi, S. *et al.*, 271–274.
- CHEN X. Z., YUN J. S., WAGNER T. E., 1988a. Enhanced viral resistance in transgenic mice expressing the human beta 1 interferon. *J. of Virology*, 62(10) : 3883–3887,
- CHEON C.I., DELAUNEY A.J., VERMA D.P.S., 1990. Maintenance of a plant line containing an antisense gene and silencing of the target gene following sexual crosses. *Plant Science*, 66 : 231–236.
- CHIANG M.Y., CHAN H., ZOUNES M.A., FREIER S.M., LIMA W.F., BENNETT C.F., 1991. Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule-1 expression by two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 266(27) : 18162–18171.
- CHOURROUT D., 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homologous diploid gynogenetics. *Aquaculture*, 36 : 111–126.
- CHOURROUT D., GUYOMARD R., HOUDEBINE L.M., 1986. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri* rich.) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture*, 51 : 143–150.
- CHOW S., DOUGHERTY W.J., SANDIFER P.A., 1990. Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus *Penaeus*. *Journal of Crustacean Biology*, 10(1) : 29–36.
- CHRISTENSEN B.M., NAPPI A.J., 1988. Immune responses of Arthropods. *Animal and Plant Sc.* : 15–19.
- CHUPEAU M.C., BELLINI C., GUERCHE P., MAISONNEUVE B., VASTRA G., CHUPEAU Y., 1989. Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplasts. *Biotechnology*, 7 : 503–508.
- CLARK A.J., BESSOS H., BISHOP J.O., BROWN P., HARRIS S., LATHE R., MC GLENAGHAN M., PROWSE C., SIMONS J.P., WHITELAW C.B.A., WILMUT I., 1989. Expression of human anti-hemophylic factor IX in the milk of transgenic sheep. *Biotechnol.*, 7 : 487–492.
- CLARK W.H., TALBOT P., NEAL R.A., MOCK C.R., SALSER B.R., 1973. *In vitro* fertilization with non-motile spermatozoa of the brown shrimp *Penaeus aztecus*. *Marine Biology*, 22 : 353–354.
- COLBERE-GARAPIN F., GARAPIN A.C., 1985. Genetic engineering of animal cells. *Animal Cell Biotechnology*, 2(16) : 405–429,
- COLIN A.M., CATLIN T.L., KIDSON S.H., MAXSON R., 1988. Loosely linked early and late histone H2B genes are differentially expressed after microinjection into sea urchin zygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 507–510.
- CONNELLY C.S., FAHL W.E., IANNACCONE P.M., 1989. The role of transgenic animals in the analysis of various biological aspects of normal and pathologic states. *Experimental Cell Research*, 183 : 257–276.

- COOPERSTEIN S.B., CHEN T.T., 1991. Differential expression of stress-induced protein genes in oyster larvae and spat. Abstract in the Second International Marine Biotechnology Conference, Baltimore, Maryland USA, October 13-16, 1991.
- COTTEN M., BIRNSTIEL M.L., 1989. Ribozyme mediated destruction of RNA *in vivo*. *EMBO Journal*, 8(12) : 3861-3866.
- CRAMPTON J., MORRIS A., LYCETT G., WARREN A., EGGLESTON P., 1990. Transgenic mosquitoes: a future vector control strategy. *Parasitology Today*, 6(2) : 31-36.
- CRIEL G., 1980. Morphology of the female genital apparatus of *Artemia* : a review. *The Brine Shrimp Artemia*, 1: 75-86.
- CRITTENDEN L.B., SALTER D.W., 1990. Expression of retroviral genes in transgenic chickens. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 41 : 163-171.
- CROSSLEY I., SWANN K., CHAMBERS E., WHITAKER M., 1988. Activation of sea urchin eggs by inositol phosphates is independent of external calcium. *Biochem. J.*, 252 : 257-262.
- CRUCES J., DIAZ-GUERRA M., GIL I., RENART J., 1989. The 5S rRNA-histone repeat in the crustacean *Artemia* : structure, polymorphism and variation of the 5S rRNA segment in different populations. *Nucleic Acids Research*, 17(15) : 6283-6297.
- CRUCES J., SEBASTIAN J., RENART J., 1981. Restriction mapping of the rRNA genes from *Artemia* larvae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98 : 404-409.
- CRUCES J., SEBASTIAN J., RENART J., 1982. Ribosomal ribonucleic acids from the crustacean *Artemia*. *FEBS Letters*, 137(1) : 108-110.
- CRUCES J., WONENBURGER M.L.G., DIAZ-GUERRA M., SEBASTIAN J., RENART J., 1987. Identification of a satellite in the *Artemia* genome. *Artemia Research and its Applications*, Eds Declair, W. *et al.*, 2 : 403-411.
- CULLEN B.R., 1987. Use of eucaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Methods in Enzymol.*, 152 : 684-704.
- CUOZZO M., O'CONNELL K. M., KANIEWSKI W., FANG R. X., CHUA N.H., TUMER N. E., 1988. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Biotechnology*, 6 : 549-557.
- CUTHBERTSON R. A., KLINTWORTH G. K., 1988. Transgenic mice: a gold mine for furthering knowledge in pathobiology. *Laboratory Investigation*, 58(5) : 484-502.
- DAHL G.A., TEMPE J., 1983. Studies on the use of toxic precursor analogues of opines to select transformed plant cells. *Theor. Appl. Genet.*, 66 : 233-239.
- DAVIDSON E.H., FLYTZANIS C.N., LEE J.J., ROBINSON J.J., ROSE S.J., SUCOV H.M., 1985. Lineage-specific gene expression in the sea urchin embryo. *Dis. Aqu. Org.*, 8 : 7-11.
- DE CHAFFOY D., GODELIEVE DE M.-C., KONDO M., 1978. On the permeability and formation of the embryonic cuticle during development *in vivo* and *in vitro* of *Artemia salina* embryos. *Differentiation*, 12 : 99-109.

- DE LOOF A., SCHOOF L., 1990. Homologies between the amino acid sequences of some vertebrates peptidic hormones and peptides isolated from invertebrate sources. *Comp. Biochem. Physiol.* 95b(3) : 459-468.
- DE PAMPHILIS M.L., HERMAN S.A., MARTINEZ-SALAS E., CHALIFOUR L.E., WIRAK D.O., CUPO D.Y., MIRANDA M., 1988. Microinjecting DNA into mouse ova to study DNA replication and gene expression and to produce transgenic animals. *Biotechniques*, 6(7) : 662-680.
- DESGROSEILLERS L., COWAN D., MILES M., SWEET A., SCHELLER R.H., 1987. *Aplysia californica* neurons express microinjected neuropeptide genes. *Mol. and Cellul. Biol.*, 2762-2771.
- DESSEN P., FONDRAT C., VALENCIEN C., MUGNIER C., 1978. BISANCE: A french service for access to biomolecular sequence databases. *Cabios*, 6 : 355-356.
- DIAZ-GUERRA M., QUINTANILLA M., PALMERO I., SASTRE L., RENARD J., 1989. Differential expression of a gene highly homologous to c-ras during the development of the brine shrimp *Artemia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162(2) : 802-808.
- DIXIT M., WEBB M.S., SMART W.C., OHI S., 1991. Construction and expression of a recombinant adeno-associated virus that harbors a human β -globin-encoding cDNA. *Gene*, 104: 253-257.
- DOBKIN S., 1961. Early developmental stages of pink shrimp, *Penaeus duorarum* from Florida waters. *Fishery Bulletin*, 61(190) : 321-348.
- DOUGLAS J.W., MILLER F.A., KIM M.H., 1991. The effects of electric field mediated transfer of non permeable molecules of meiosis, fertilization, and early embryo development. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 165 : 1480-1486.
- DREANO M., FISCHBACH M., MONTANDON F., SALINA C., PADIEU P., BROMLEY P., 1988. Production of secretable proteins using the passage *in vivo* as tumours of cells carrying heat-inducible expression constructs. *Biotechnology*, 6 : 953-958.
- DUNHAM R.A., EASH J., ASKINS J., TOWNES T.M., 1987. Transfer of the metallothionein human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 116 : 87-91.
- DUVEREUX, HAEBERLI, SMITHIES, 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Research*, 12 : 387-395.
- EFRAT S., 1991. Sexual dimorphism of pancreatic beta-cell degeneration in transgenic mice expressing an insulin-ras hybrid gene. *Endocrinology*, 128(2) : 897-901.
- EICHHOLTZ D.A., ROGERS S.G., HORSCH R.B., KLEE H.J., HAYFORD M. *et al.*, 1987. Expression of mouse dihydrofolate reductase gene confers methotrexate resistance in transgenic petunia plants. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 13 : 67-76.
- ENGELS W.R., 1983. The P family of transposable elements in *Drosophila*. *Ann. Rev. Genet.*, 17 : 315-344.
- ETKIN L.D., PEARMAN B., 1987. Distribution, expression and germ line transmission of exogenous DNA sequences following microinjection into *Xenopus laevis* eggs. *Development*, 90 : 15-23.
- EVANS M.J., 1989. Potential for genetic manipulation of mammals. *Mol. Biol. Med.*, 6 : 557-565.

- EVARD C., LEBERT M., BORDE I., GALIANA E., BERNARD R., ROUGET P., 1991. Gene transfer into neural cells. Immortalization and genetic labelling of the cells. *Medecine/Science*, 7(4) : R9.
- FALLON A.M., 1991. DNA-mediated gene transfer - applications to mosquitoes. *Nature*, 352(6338) : 828-829.
- FAUTREZ J., FAUTREZ-FIRLEFIN N., 1971. Contribution à l'étude des glandes coquillères et des coques de l'oeuf d'*Artemia salina*. *Annal. Biol.*, 82 : 41-83.
- FAWZY G., SALEEM M., CUTLER A.J., 1990. Design and cloning of a synthetic gene for the flounder antifreeze protein and its expression in plant cells. *Gene*, 91 : 159-165.
- FEISS M., BECKER A., 1983. DNA packaging and cutting. In: Hendrix, R.W., Roberts, J.W., Stahl, F.W. and Weisberg, R.A. (eds), *Lambda II*. 305-330. Cold Spring Harbor, NY.
- FELGNER P.L., GADEK T.R., HOLM M., ROMAN R., CHAN H.W., WENZ M., NORTHROP J.P., RINGOLD G.M., DANIELSEN M., 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 7413-7417.
- FELGNER P.L., HOLM M., 1989. Cationic liposome mediated transfection. *Focus*, 11 (2) : 22-25.
- FILLATI J.J., KISER J., ROSE R., COMAI L., 1987. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Biotechnology*, 5 : 726-730.
- FINNEGAN D.J., FAWCETT D.H., 1986. Transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Oxford surveys on eukaryotic genes* (3) chap. 1 : 1-62.
- FISH N., KARP A., JONES M.G.K., 1988. Production of somatic hybrids by electrofusion in *Solanum*. *Theor. appl. Genet.*, 76 : 260-266.
- FLETCHER G.L., SHEARS M.A., KING M.J., DAVIES P.L., HEW L., 1988. Evidence for antifreeze protein gene transfer in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45 : 352-357.
- FORSTER E., EMEIS C.C., 1985. Quantitative studies on the viability of yeast protoplasts following dielectrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 26 : 65-69.
- FRANKS R.R., HOUGH-EVANS B.R., BRITTEN R.J., DAVIDSON E.H., 1988. Direct introduction of cloned DNA into the sea urchin zygote nucleus, and fate of injected DNA. *Development*, 102 : 287-299.
- FREEMAN J.A., CHRONISTER R.B., 1988. Cell-specific endopolyploidy in developing *Artemia*. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 198 : 490-495.
- FRIEDENREICH H., SCHARTL M., 1990. Transient expression directed by homologous and heterologous promoter and enhancer sequences in fish cells. *Nucleic Acids Research*, 18(11) : 3299-3305.
- FRIESEN P.D., MILLER L.K., 1986. The regulation of Baculovirus gene expression. In *Current Topics in Microbiology and Immunology. The molecular biology of Baculoviruses*. Eds. Doerfler W., Bohn P., 31-50.

- FRY D.G., MILAM L.D., DILLBERGER J.E., MAHER V.M., McCORMICK J.J. 1990. Malignant transformation of an infinite life span human fibroblast cell strain by transfection with v-Ki-ras. *Oncogene*, 5 :1415-1418.
- FUCHS L.Y., OVANDO C., JOSEPH P., SOBERON X., CHARLI J.L., 1990. Repetitive DNA sequence from the crayfish *Procambarus clarkii*. *Nucleic Acids Research*, 18(6) : 1650.
- GAGNE M.B., POTHIER F., SIRARD M.A., 1991. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 29 : 6-15.
- GALE K., CRAMPTON J., 1989. The ribosomal genes of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Eur. J. Biochem.*, 185 : 311-317.
- GALIC K.G., LINDQUIST S., 1989. The FLP-recombinase of yeast catalyses site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell*, 59 : 499-509.
- GALLARDO C., CASTRO J., 1987. Reproduction and genetics of mexican *Artemia*. In *Artemia Research and its Applications*. Eds. Sorgeloos P., Bengston D.A., 1 : 249-253.
- GALLEGO M.E., DIAZ-GUERRA M., CRUCES J., SEBASTIAN J., RENART J., 1986. Characterization of two types of rRNA gene repeat units from the crustacean *Artemia*. *Gene*, 48 : 175-182.
- GASSER C.S., FRALEY R.T., 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. *Science*, 244 : 1293-1299.
- GAVORA J.S., BENKEL B., SASADA H., CANTWELL W.J., FISER P., TEATHER R.M., NAGAI J., SABOUR M.P., 1991. An attempt at sperm-mediated gene transfer in mice and chickens. *Can. J. Anim. Sci.*, 71(2) : 287-291.
- GENDREAU S., DELECHENEAU J.M., LEE R.S., CADORET J.P., MIALHE E.. Microinjection of crustacean embryos and transient expression of injected DNA. *Soumis à Aquaculture*.
- GENDREAU S., GRIZEL H., 1990. Induced triploidy and tetraploidy in the european flat oyster *Ostrea edulis* L.. *Aquaculture*, 90 : 229-238.
- GENDREAU S., LARDANS V., CADORET J.P., MIALHE E.. Transient expression of luciferase reporter gene after biolistic introduction into *Artemia franciscana*. (Crustacea) embryos. *Soumis à Aquaculture*.
- GERENDAY A., PARK Y.J., LAN Q., FALLON A.M., 1989. Expression of a heat inducible gene in transfected mosquito cells. *Insect Biochem.*, 19(7) : 679-686.
- GERMERAAD S. 1976. Genetic transformation in *Drosophila* by microinjection of DNA. *Nature*, 262 : 229 - 231
- GIERL A., SAEDLER H., 1992. Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Mol. Biol.*, 19, 1 : 39-49.
- GIL I., GALLEGO M.E., RENART J., CRUCES J., 1987. Identification of transcriptional initiation site of ribosomal RNA genes in the crustacean *Artemia*. *Nucleic Acids Research*, 15(15) : 6007-6013,
- GILADI E. SPINDEL E.R., 1991. Simple luminometric assay to detect phosphoinositol-linked receptor expression in *Xenopus* oocytes. *Biotechniques*, 10 : 744.

- GIRAUD C., DEVAUCHELLE G., BERGOIN M., 1992. The Densovirus of *Junonia coenia* (JcDNV) as an insect cell expression vector. *Virology*, 186: 207–218.
- GORDON J.W., 1989. Transgenic animals. *Int. Review Cytology*, 15 : 171–229.
- GORDON J.W., GRUNFELD L., GARRISI G.J., TALANSKY B.E., RICHARDS C., LAUFER N., 1988. Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertility & Sterility*, 50(1) : 68–73.
- GOUDEAU M., GOUDEAU H., 1986. The resumption of meiotic maturation of the oocyte of the prawn *Palaemon serratus* is regulated by an increase in extracellular Mg²⁺ during spawning. *Developmental Biology*, 118 : 361–370.
- GREEN P.J., PINES O., INOUE M., 1986. The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 55 : 569–597.
- GRIERSON D., SMITH C.J.S., WATSON C.F., 1989. Regulation of gene expression in transgenic tomato plants by antisense RNA and ripening specific promoters.
- GRUMET R., 1990. Genetically engineered plant virus resistance. *HortScience*, 25 : 508–512.
- GRUMET R., SANFORD J.C., JOHNSTON S.A., 1987a. A demonstration of pathogen-derived resistance using *Escherichia coli* and the bacteriophage, ϕ . *Molecular Strategies For Crop Protection*, 3–12.
- GRUMET R., SANFORD J.C., JOHNSTON S.A., 1987b. Pathogen derived resistance to viral infection using a negative regulatory molecule. *Virology*, 161 : 561–569.
- GWADZ R., KASLOW D., LEE J.Y., 1989. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Infection and Immunity*, 57 : 2628–2633.
- HAGIO T., BLOWERS A.D., EARLE E.D., 1991. Stable transformation of *Sorghum* cell cultures after bombardment with DNA-coated microprojectiles. *Plant Cell Rep*, 10(5) : 260–264.
- HANDLER A.M., O'BROCHTA D.A., 1991. Prospects for gene transformation in insects. *Ann. Rev. Entomol.*, 36 : 159–183.
- HAYASHI K.I., FUJIWARA Y., 1988. A new method for obtaining metaphase chromosomes from the regeneration blastema of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54(9) : 1563–1565.
- HAYWARD D.C., GLOVER D.M., 1988. Analysis of the *Drosophila* rDNA promoter by transient expression. *Nucleic Acids Research*, 16(10) : 4253.
- HEIKKILA J.J., BROWDER L.W., GEDAMU L., NICKELLS R.W., SCHULTZ G.A., 1986. Heat-shock gene expression in animal embryonic systems. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28 : 1093–1105.
- HEMENWAY C., FANG R.X., KANIEWSKI W.K., CHUA N.H., TUMER N.E., 1988. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J.*, 7 : 1273–1280.

- HENTHORN P., ZERVOS P., RADUCHA M., HARRIS H., KADESCH T., 1988. Expression of a human placental alkaline phosphatase gene in transfected cells : use as a reporter for studies of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 6342–6346.
- HIATT A., 1990. Antibodies produced in plants. *Nature*, 344 : 469–470.
- HIATT A., CAFFERKEY R., BOWDISH K., 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342(6245) : 76–78.
- HITCHCOCK M.J.M., GINNS E.I., MARKUS-SEKURA C.J., 1987. Microinjection into *Xenopus* oocytes: Equipment. In "Method in enzymology", Berger S.B., Kimmel A.R. (eds.), *Academic Press*, 12 : 276–284.
- HOFFMANN D., HOFFMANN J.A., 1990a. Cellular and molecular aspects of insect immunity. Introduction.. 34th Forum in Immunology, *Res. Immunol.* (Annales de l'Institut Pasteur), 141(9) : 895–896.
- HOFFMANN J.A., HOFFMANN D., 1990b. The inducible antibacterial peptides of dipteran insects.. 34th Forum in Immunology, *Res. Immunol.* (Annales de l'Institut Pasteur), 141(9) : 910–918.
- HOFMAN G.A., EVANS G.A., 1986. Electronic genetic–physical and biological aspects of cellular electromanipulation. *IEEE Engineering in Med. and Biol.* : 14–25.
- HOOPER M.L., 1990. Genetically engineered animals: implication for human diseases. *Biofutur*, 30–35. jan. 90.
- HOUEBINE L.M., 1991. Les biotechnologies animales. *INRA, Prod. Anim.*, 4(1) : 81–88.
- HOUEBINE L.M., CHOURROUT D., 1991. Transgenesis in fish. *Experientia*, 47(9) : 891–897.
- HOUGH-EVANS B. R., BRITTEN R. J., DAVIDSON E. H., 1988. Mosaic incorporation and regulated expression of an exogenous gene in the sea urchin embryo. *Developmental Biology*, 129 : 198–208,
- HUG P., SLEIGHT R.G., 1991. Liposomes for the transformation of eukaryotic cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 1097(1) : 1–17.
- HUGHES S.H., PETROPOULOS C.J., FEDERSPIEL M.J., SUTRAVE P., FERRY-SCHAUDIES S., BRADAC J.A., 1990. Vectors and genes for improvement of animal strains. *J. Reprod. Fert.*, 41 : 39–49.
- HULTMARK D., ENGSTROM A., BENNICH H., KAPUR R., BOMAN H.G., 1982. Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia pupae*. *Eur. J. Biochem.*, 127 : 207–217.
- IDZERDA R.L., BEHRINGER R.R., THEISEN M., HUGGENVIK J.I., MCKNIGHT G.S., BRINSTER R.L., 1989. Expression from the transferrin gene promoter in transgenic mice. *Molec. and Cellular Biol.*, 9 : 5154–5162.
- IKEDA K., POSILICO J.T., BOYLE M.B., WEBB A.C., BROWN E.M., BROADUS A.E., 1989. Microinjected *Xenopus* oocytes secrete mature, biologically active parathyroid hormone. *Mol. Crinol. Endo.*, 3(7) : 1084–1089.
- INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J., WHITE T.J., 1990. PCR protocols: A guide to methods and applications. *Academic Press*, New York, 482 pp.

- INOKUCHI S., UEDA M., HASHIMOTO K., HANDA H., MITOMI T. 1991. Immortalization of human epidermal keratinocytes by the recombinant SV40 adenovirus vector. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 27A : 827–828.
- INOUE K., 1991. Expression of reporter genes introduced by microinjection and electroporation in fish embryos and fry. International Marine Biotechnology Conference 1991, October 13–16, Baltimore, Maryland, USA.
- INOUE K., ASADA S., KABENO S., YAMASHITA S., NAGAHISA E., FUJITA T., 1989. Production of transgenic Medaka as a model for genetic engineering of fish. In Current topics in Marine Biotechnology. Ed. Miyachi, S. *et al.*, 277–280.
- IRITANI A., 1991. Micromanipulation of gametes for *in vitro* assisted fertilization. *Molec. Reprod. Develop.*, 28 : 199–207.
- ISA K., SHIMA A., 1987. Transfection and stable expression of a dominant selective marker ecogpt in a cultured cell line of the fish, *Carassius auratus*. *J. of Cell Science*, 88 : 219–224.
- IWAKURA Y., ASANO M., NISHIMUNE Y., KAWADE Y., 1988. Male sterility of transgenic mice carrying exogenous mouse interferon gene under the control of the metallothionein enhancer promoter. *EMBO Journal*, 7(12) : 3757–3762.
- JAENISCH R., 1988. Transgenic animals. *Science*, 240 : 468–1474.
- JAYNES J.M., XANTHOPOULOS K.G., DESTEFANO-BELTRAN L., DODDS J.H., 1987. Increasing bacterial disease resistance in plant utilizing antibacterial genes from insects. *Bioessays*, 6(6) : 263–270.
- JEANPIERRE M., 1987. A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucl. Acid. Res.*, 22 : 9611.
- JENKINS J.R., RUDGE K., CURRIE G.A. 1984. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature*, 312 : 651–654.
- JESSUS C., CAZENAVE C., OZON R., HELENE C., 1988. Specific inhibition of endogenous tubulin synthesis in *Xenopus* oocytes by anti-messenger oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Research*, 16(5) : 2225–2233.
- JIA S.R., 1991. *Bio/Technology*, 9 (10) : 994–995.
- JUCHAULT P., MOCQUARD J.P., 1989. Effet de l'inoculation d'une bacterie endocellulaire feminisante sur la croissance et la reproduction des femelles du crustace oniscoide *Armadillidium vulgare* (latr.). Conséquences possibles sur l'evolution des populations. *Crustaceana*, 56(1) : 83–92.
- KAEPLER H.F., GU W., SOMERS D.A., RINES H.W., COCKBURN A.F., 1990. Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Rep.*, 9(8) : 415–418.
- KAHN A., BRIAND P., 1991. Establishment of cell lines by targeted carcinogenesis in transgenic animals. *Medecine/Science*, 7(4) : R6.
- KAMATA T., KUNG H.F., 1990. Modulation of maturation and ribosomal protein phosphorylation in *Xenopus* oocytes by microinjection of oncogenic ras protein and protein kinase C. *Molecular and Cellular Biology*, 10(3) : 880–886.
- KARLOVSKY P., DE COCK W.A.M., 1991. Buoyant Density of DNA–Hoechst 33258. *Analytical Biochem.*, 194 : 192–197.

- KARTHA K.K., CHIBBAR R.N., LEUNG N., GEORGES F., CASWELL K., KENDALL E., QURESHI J., 1989. Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports.*, 8 : 429-432.
- KATULA K.S., HOUGH-EVANS B.R., BRITTEN R.J., DAVIDSON E.H., 1987. Ontogenic expression of a cyt-actin fusion gene injected into sea urchin eggs. *Developmental*, 101 : 437-447.
- KELEKAR A., 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.
- KEN C.F., LIAO C.F., HSU Y.L., WU J.L., 1991. Gene transfer in the cichlid fish *Cichlasoma nigrofasciatum*. In ROC-France Workshop on Fish Biology, Pathology and Genetics in Aquaculture. Taiwan, mai 1991.
- KIM W., ABELE L.G. 1990. Molecular phylogeny of selected decapod crustaceans based on 18S rRNA nucleotide sequences. *J. Crust. Biol.* 10 : 1-13.
- KING D., WALL R.J., 1988. Identification of specific gene sequences in preimplantation embryos by genomic amplification : detection of a transgene. *Molecular Reproduction and Development*, 1 : 57-62.
- KLEIN T.M., FROMM M., WEISSINGER A., 1988a. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high velocity microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 4305-4309.
- KLEIN T.M., GRADZIEL T., FROMM M.E., SANFORD J.C., 1988b. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high velocity microprojectiles. *Biotechnology*, 6 : 559-563.
- KLEIN-SZANTO A., BRADL M., PORTER S., MINTZ B., 1991. Melanosis and associated tumors in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 : 169-173.
- KNUTSON J.C., YEE D., 1987. Electroporation : parameters affecting transfer of DNA into mammalian cells. *Analytical Biochemistry*, 164 : 44-52.
- KOBAYASHI S., UCHIMIYA H., 1989. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* osb.) protoplasts by direct DNA transfer. *Jpn. J. Genet.*, 64 : 91-97.
- KOCKUM K., FAYE I., HOFSTEN P.V., LEE J.Y., XANTHOPOULOS K.G., BOMAN H.G., 1984. Insect immunity. Isolation and sequence of two cDNA clones corresponding to acidic and basic attacins. *The EMBO J.*, 3 (9) : 2071-2075.
- KOMATSUBARA S., MORI K., HATANAKA M., AMAGAI T., SHIMIZU S., MURAMATSU S., 1988. Immortalization of murine leukocytes by oncogenes : phenotypic characterization of transformants immortalized by *v-src* or *ha-ras* oncogenes : expression of b220, a b-cell lineage specific antigen. *Microbiol. Immunol.*, 32(8) : 869-875.
- KONO T., KWON O.Y., NAKAHARA T., 1991. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. *J. Reprod. Fert.*, 93 : 165-172.
- KOSTURKO L.D., VANECH M., 1987. *In vitro* encapsidation of plasmid DNA into human adenovirus empty capsids. *Virus Research*, 6 : 123-132.

- KOZAK M., 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44 : 283-292.
- KRZYMINSKA U.B., LEUNG P., ONEILL C., PIKE I.L., 1992. Microinsemination by sperm transfer. *Lancet*, 339 : 8789: 375.
- KUBIAK J.Z., TARKOWSKI A.K., 1985. Electrofusion of mouse blastomeres. *Expl. Cell. Res.*, 157 : 561-566.
- KURATA S.I., TSUKAKOSHI M., KASUYA T., IKAWA Y., 1986. The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cells. *Experimental Cell Research*, 162 : 372-378.
- LABBE J. C., PICARD A., DOREE M., 1987. Does the m-phase promoting factor (mpf) activate a major Ca²⁺ and cyclic nucleotide-independent protein kinase in starfish oocytes *Develop. Growth & Differ.*, 30(2) : 197-207.
- LAND R.B., 1989. The application of molecular manipulation to livestock improvement. In *Evolution and Animal Breeding* : 213-217.
- LANDEL C.P., 1991. The production of transgenic mice by embryo microinjection. *Genet. Anal-Tech. Appl.*, 8(3) : 83-94.
- LANZENDORF S.E., SLUSSER J., MALONEY M.K., HODGEN G.D., VEECK L.L., ROSENWAKS Z., 1988. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertility & Sterility*, 49(5) : 835-842.
- LARKIN P.J., TAYLOR B.H., GERSMANN M., 1990. Direct gene transfer to protoplasts. *Austr. J. Plant Physiol.*, 17 : 291-302.
- LAVITRANO M., CAMAIONI A., FAZIO V.M., DOLCI S., FARACE M.G., SPADAFORA C., 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs : genetic transformation of mice. *Cell*, 57 : 717-723.
- LAVITRANO M., FRENCH D., ZANI M., FRATI L., SPADAFORA C., 1992. The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 31(3) : 161-169.
- LAWTON M.A., TIERNEY M.A., NAKAMURA I., ANDERSON E., KOMEDA Y., DUBE P., HOFFMAN N., FRALEY R.T., BEACHY R.N., 1987. Expression of a soybean conclycinin gene under the control of the cauliflower mosaic virus 35S and 19S promoters in petunia tissues. *Plant Molecular Biology*, 9 : 315-324.
- LEBROWSKI J.S., MCNALLY M.M., OKARMA T.B., LERCH L.B., 1988. Adeno-associated virus : a vector system for efficient introduction and integration of DNA into a variety of mammalian cell types. *Molecular & Cellular Biology*, 8(10) : 3988-3996.
- LEE J.Y., BOMAN A., CHUANXIN S., ANDERSSON M., JORNVALL H., MUTT V., BOMAN H.G., 1989. Antibacterial peptides from pig intestine : isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 9159-9162.
- LIAO I.C., 1990. Aquaculture in Taiwan. In: Mohan Joseph, M. (ed.), *Aquaculture in Asia. Asian Fisheries Society, Indian. Branch.* 345-369.
- LIAO I.C., HUANG T.L., 1973. Experiments on the propagation and culture of prawns in Taiwan. In : T.V.R. Pillay (Eds), *Coastal Aquaculture in the Indo-Pacific region.* Fishing News (Books), England. 328-344.

- LIDHOLM D.-A., GUDMUNDSSON G.H., XANTHOPOULOS K.G., BOMAN H.G., 1987. Insect immunity: cDNA clones coding for the precursor forms of cecropins A and D, antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. Elsevier Science Publishers B.V., 226(1) : 8-12.
- LIGHTNER D.V., 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.
- LIGHTNER D.V., PROCTOR R.R., SPARKS A.K., ADAMS J.R., HEIMPEL A.M., 1973. Testing penaeid shrimp for susceptibility to an insect nuclear polyhedrosis virus. *Environmental Entomology*, 2(4) : 611-613.
- LINK C.D., GRAF-WHITSEL J., WOOD W.B., 1987. Isolation and characterisation of a nematode transposable element from *Panagrellus redivivus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* : 5325-5329,
- LINTHORS H.J.M., VAN LOON L.C., VAN ROSSUM C.M.A., 1990. Analysis of acidic and basic chitinases from tobacco and petunia and their constitutive expression in transgenic tobacco. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 3(4) : 252-258.
- LIS J.T., SIMON J.A., SUTTON C.A., 1983. New heat-shock puffs and beta-galactosidase activity resulting from transformation of *Drosophila* with an hsp70-lacZ hybrid gene. *Cell*, 35 : 403-410.
- LLOYD A.M., BARNASON A.R., ROGERS S.G., BYRNE M.C., FRALEY R.T., HORSCH R.B., 1986. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science*, 234 : 464-466.
- LOGEMANN J., JACH G., TOMMERUP H., MUNDY J., SCHELL J., 1992. Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *Biotechnology*, 10(3) : 305-308.
- LOHE A.R., BRUTLAG D.L., 1987. Identical satellite DNA sequences in sibling species of *Drosophila*. *J. Mol. Biol.*, 194 : 161-170.
- LU Y., NADALA J.R., BROCK J.A., LOH P.C., 1991. A new virus isolate from infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) infected penaeid shrimps. *J. Virol. Meth.*, 31 : 189-196.
- LUCAS W.J., LANSING A., DE WET J.R., WALBOT V., 1990. Introduction of foreign DNA into walled plant cells via liposomes injected into the vacuole: a preliminary study. *Physiologia Plantarum*, 79 : 184-189.
- LUO Z.X., WU R., 1989. A simple method for the transformation of rice via the pollen tube pathway. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 7 : 69-77.
- MACHY P., LEWIS F., MCMILLAN L., JONAK Z. L., 1988. Gene transfer from targeted liposomes to specific lymphoid cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 8027-8031,
- MACIAS M.T., SASTRE L., 1990. Molecular cloning and expression of four actin isoforms during *Artemia* development. *Nucleic Acids Research*, 18(17) : 5219-5225.
- MADAULE P., AXEL R., MYERS A.M., 1987. Characterization of two members of the *rho* gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 779-783.

- MAHON K. A., CHEPELINSKY A. B., KHILLAN P. S., OVERBEEK P. A., PIATIGORSKY J., WESTPHAL H., 1987. Oncogenesis of the lens in transgenic mice. *Science*, 235 : 1622-1628.
- MALONE R.W., 1989. mRNA transfection of cultured eukaryotic cells and embryos using cationic liposomes. *Focus*, 11 (4) : 61-66.
- MANNINO R.J., GOULD-FOGERITE S., 1988. Liposome mediated gene transfer. *Biotechniques*, 6(7) : 682-690,
- MANSOUR S.L., THOMAS K.R., CAPECCHI M.R., 1988. Disruption of the proto-oncogene *int.2* in mouse embryo derived stem cells : a general strategy for targeting mutations to non selectable genes. *Nature*, 336 : 348-352,
- MARCHESI M.L., CASTIGLIONE S., SALA F., 1989. Effect of repeated DNA sequences on direct gene transfer in protoplasts of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Theor. Appl. Genet.*, 78 : 113-118.
- MARCUS-SEKURA C.J., 1988. Techniques for using antisense oligodeoxyribonucleotides to study gene expression. *Analytical Biochemistry*, 172 : 289-295.
- MARKERT C.L., 1983. Fertilization of mammalian eggs by sperm injection. *J. Exper. Zool.*, 228 : 195-201.
- MARTINEZ-ZAPATER J.M., FINKELSTEIN R., SOMERVILLE C.R., 1988. Drosophila P-element transcript are incorrectly processed in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 11, p. 601-607.
- MARTON L., 1984. Transformation of tobacco cells by coculture with *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 1 : 514-521.
- MARYON A., CARROLL D., 1991. Characterization of recombination intermediates from DNA injected into *Xenopus Laevis* oocytes - Evidence for a nonconservative mechanism of homologous recombination. *Mol. Cell. Biol.*, 11(6) : 3278-3287.
- MASCHIO A., BRICKELL P.M., KIOUSSIS D., MELLOR A.L., KATZ D., CRAIG R.K., 1991. Transgenic mice carrying the guinea-pig alpha-lactalbumin gene transcribe milk protein genes in their sebaceous glands during lactation. *Biochem J*, 275 : 459-467.
- MASSOUD M., BISCHOFF R., DALEMANS W., POINTU H., ATTAL J., SCHULTZ H., CLESSE D., STINNAKRE M.G., PAVIRANI A., HOUDEBINE L.M., 1991. Expression of active recombinant human alpha 1-antitrypsin in transgenic rabbits. *J. Biotechnol.*, 18 : 193-203.
- MATHI S.K., WALKER V.K., WYATT G.R., 1991. Expression from two Drosophila promoters in embryos of the migratory locust. Gene transfer into locusts. *Insect Biochem.*, 21(6) : 623-629.
- MATSUURA E.T., CHIGUSA S.I., NIKI Y. 1990. Differences in the modes of transmission of foreign mitochondrial DNA in heteroplasmic lines for intra and interspecific combinations in *Drosophila melanogaster*. *Japanese J. Genet.*, 65 : 87-93.
- MAUREL P., GUALANDRIS-PARISOT L., TEISSIE J., DUPPRAT A.M., 1989. Electric-field-induced permeabilization and fusion of embryonic amphibian cells. *Exper. Cell Res.*, 184 : 207-218.

- MAURER R.A., 1989. Cationic liposome mediated transfection of primary cultures of rat pituitary cells. *Focus*, 11 (2) : 25-27,
- McCONNELL J., PICKERING S.J., JOHNSON M.H., 1990. A technique for quantifying the amount of macromolecule injected into cells of the early mouse embryo. *J. Reproduction & Fertility*, 88 : 375-381.
- McCORMICK, S., YAMAGUCHI, J., TWELL, D., 1991. Deletion analysis of pollen-expressed promoters. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 27 : 15-20.
- McCOWN B.H., MCCABE D.E., RUSSELL D.R., ROBISON D.J., BARTON K.A., RAFFA K.F., 1991. Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Reports*, 9 : 590-594.
- McEVOY T., STACK M., KEANE B., BARRY T., SREENAN J., GANNON F., 1988. The expression of a foreign gene in salmon embryos. *Aquaculture*, 68 : 27-37.
- McGRANNE V., CARLSON J.O., MILLER B.R., BEATY B.J., 1988. Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 39 : 502-510
- McGREGOR G.R., CASKEY C.T. 1989. Construction of plasmids that express *E. coli* β -galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 12 :2365.
- McGREGOR, G.M., NOLAN, G.P., FIERING, S., ROEDERER, M., HERZENBERG, L. A., 1991. Use of *E. coli lacZ* (β -galactosidase) as a reporter gene. In: Murray, E.J. (ed.), *Methods in Molecular Biology, Gene transfer and expression protocols.*, 7 : 217-235.
- McLEAN N., PENMAN D., 1990. The application of gene manipulation to aquaculture. *Aquaculture*, 85 : 1-20.
- McLENNAN A.G., MILLER D., 1990. A biological role for the heat shock response in crustaceans. *J. Therm. Biol.*, 15, 1 : 61-66.
- McMAHON A.P., FLYTZANIS C.N., HOUGH-EVANS B.R., KATULA K.S., BRITTEN R.J., DAVIDSON E.H., 1984a. Gene transfer in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. In "Transfer & Expression of Eukaryotic Genes", Academic Press : 113-121.
- McMAHON A.P., FLYTZANIS C.N., HOUGH-EVANS B.R., KATULA K.S., BRITTEN R.J., DAVIDSON E.H., 1985. Introduction of cloned DNA into Sea Urchin egg cytoplasm : Replication and persistence during embryogenesis. *Develop. Biol.*, 108 : 420-430.
- McMAHON A.P., NOVAK T. J., BRITTEN R. J., DAVIDSON E. H., 1984b. Inducible expression of a cloned heat shock fusion gene in sea urchin embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 7490-7494.
- McMAHON G., HUBER L.J., STEGEMAN J.J., VOGAN G.N., 1988. Identification of the *K-ras* oncogene in a neoplasm isolated from winter flounder. *Mar. Environn. Res.*, 24 : 345-350.
- McNAB A.R., ANDRUS P., WAGNER T.E., 1990. Hair-specific expression of chloramphenicol acetyltransferase in transgenic mice under the control of an ultra high sulfur keratin promoter. *Proc. Natl. Acad. sci. USA*, 87 : 6848-6852.
- McNEIL J.A., JOHNSON C.V., CARTER K.C., SINGER R.H., LAWRENCE J.B., 1991. Localizing DNA and RNA within nuclei and chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. *Genet. Anal-Tech. Appl.*, 8(2) : 41-58.

- McNELLY M. A., LEBKOWSKI J. S., OKARMA B., LERCH L. B., 1988. Optimizing electroporation parameters for a variety of human hematopoietic cell lines. *Biotechniques*, 6(9) : 882-885.
- MECHALI M., EVAN G., GUSSE M., 1989. Rôle de la protéine c-myc dans le développement embryonnaire précoce chez le xénope. *C. R. Acad. Sci.*, 308 : 213-218.
- MELTON D.A., 1985. Injected anti-sense RNAs specifically block messenger RNA translation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 144-148.
- MELTON D.W., 1991. The use of gene targeting to develop animal models for human genetic diseases. *Biochem. Soc. Trans.*, 18 : 1035-1039,
- MENDEL R.R., MULLER B., SCHULZE J., KOLESNIKOV V., ZELENIN A., 1989. Delivery of foreign genes to intact barley cells by high velocity microprojectiles. *Theor. Appl. Genet.*, 78 : 31-34.
- METCALFE C.D., SONSTEGARD R.A., 1984. Microinjection of carcinogens into rainbow trout embryos: an *in vivo* carcinogenesis assay. *J.N.C.I.*, 73 : 1125-1132.
- MIALHE E., BOULO V., BACHERE E., HÉRVIO D., COUSIN K., NOEL D., NOEL T., OHRESSER M., LE DEUFF R. M., GENDREAU S., 1992a. Development of new methodologies for diagnostic of infectious diseases in molluscs and shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 107.
- MIALHE E., LAUGHINGHOUSE A., MILLER L.H., 1992b. Biolistic for gene transfer to mosquito embryos. Congress Vienne 16-20 october 1992.
- MILLER L.H., 1989. Strategies for malaria control: realities, magic and science. *An. N. Y. Acad. Sci.*, 569 : 118-126.
- MILLER L.H., SAKAI L.K., ROMANS P., GWADZ R.W., KANTOFF P., COON H.G., 1987. Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 237 : 779-781.
- MILNE C.P., 1991. Honey bee sperm binds DNA, and may be suitable for gene transfer. *Am. Bee J.*, 131 : 188-189.
- MINDEN J.S., AGARD D.A., SEDAT J.W., ALBERTS B.M., 1989. Direct cell lineage analysis in *Drosophila melanogaster* by time-lapse, three-dimensional optical microscopy of living embryos. *Journal of Cell Biology*, 109 : 505-516.
- MINHAS , VOELKEL, 1989. Transgenic animals. In: Biotechnology, 7B, Rehm & Reed eds., Weinheim, Gene Transfer Technologies.
- MIRON M.J., LANOIX J., PAIEMENT J., 1990. Cytological effects of the microinjection of antibody to ras p21 in early cleavage *Xenopus* embryos. *Molecular Reproduction & Development*, 25 : 317-327.
- MISKIMINS WK, BROWN DB, 1990. Analysis of cis-acting promoter elements using microinjected synthetic oligonucleotides. *Exp. Cell. Res.*, 191(2) : 328-331.
- MISRA S., GEDAMU L., 1989. Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* and *Nicotiana tabacum* plants. *Theor. Appl. Genet.*, 78 : 161-168.

- MOFFAT A.S., 1992. High-tech plants promise a bumper crop of new products. *Science*, 256 : 770-771.
- MOL J.N.M., STUITJE A.R., VAN DER KROL A., 1989. Genetic manipulation of floral pigmentation genes. *Plant Molecular Biology*, 13 : 287-294.
- MORIKAWA H., IIDA A., YAMADA Y., 1988. Electric gene transfer into plant protoplasts and cells. *Biotechnology in Agriculture* : 175-202.
- MORRIS A.C., SCHAUB T.L., JAMES A.A., 1991. FLP-mediated recombination in the vector mosquito *Aedes aegypti*. *Nucl. Acid. Res.*, 19 : 5895-5900.
- MOUNIER N., COULON M., PRUDHOMME J.C., 1991. Expression of a cytoplasmic actin gene in relation to the silk production cycle in the silk glands of *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 21 : 292-301.
- MULLER F., IVICS, Z., ERDELYI, F., PAPP, T., VERADI, L., HORVATH, L., McLEAN N., 1992. Introducing foreign genes into fish eggs by electroporated sperm as a carrier. in press in *Mol. Marine Biol. Biotech.*
- MULLINEAUX P.M., GUERINEAU F., ACCOTTO G.P., 1990. Processing of complementary sense RNAs of *Digitaria* streak virus in its host and in transgenic tobacco. *Nucleic Acids Research*, 18(24) : 7259-7265.
- MUNIR M.I., ROSSITER B.J.F., CASKEY C.T., 1990. Antisense RNA production in transgenic mice. *Somatic Cell And Molecular Genetics*, 16(4) : 383-394.
- MURNANE J.P., YEZZI M.J., YOUNG B.R., 1990. Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells. *Nuc. Acids Res.*, 18 : 2733-2738.
- NANCARROW C.D., MARSHALL J.T.A., CLARKSON J.L., MURRAY J.D., MILLARD R.M., SHANAHAN C.M., WYNN P.C., WARD K.A., 1991. Expression and physiology of performance regulating genes in transgenic sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 43 : 277-291.
- NAPOLI C., LEMIEUX C., JORGENSEN R., 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 2 : 279-289.
- NEJIDAT A., BEACHY R.N., 1990. Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 3(4) : 247-251.
- NELLES L., FANG B.L., VOLCKAERT G., VANDENBERGHE A., DE WACHTER R., 1984. Nucleotide sequence of a crustacean 18S ribosomal RNA gene and secondary structure of eucaryotic small subunit ribosomal RNAs. *Nucl. Acids Res.*, 12 : 8749-8768.
- NELSON R.S., MACCORMICK S.M., DELANNAY X., DUBE P., LAYTON J., ANDERSON E.J., KANIEWSKA M., PROKSCH R.K., HORSCH R.B., ROGERS S.G., RALEY R.T., BEACHY R.N., 1988. Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Biotechnology*, 6 : 403-409.
- NEUHAUS G., SPANGENBERG G., MITTELSTEN-SCHIED O., SCHWEIGER H.G., 1987. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore derived embryoids. *Theor. Appl. Genet.*, 75 : 30-36.

- NGUYEN V.T., MORANGE M., BENSUADE O., 1988. Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells. *Analytic. Biochem.*, 171 : 404-408.
- NIELSEN L.L., PEDERSEN R.A., 1991. *Drosophila* alcohol dehydrogenase – a novel reporter gene for use in mammalian embryos. *J. Exp. Zool.*, 257(1) : 128-133.
- NISHIDA H., SATOH N., 1983. Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme up to the eight-cell stage. *Dev. Biol.*, 99 : 32-394.
- O'KEEFE S.J., WOLFES H., KIESSLING A.A., COOPER G.M., 1989. Microinjection of antisense *c-mos* oligonucleotides prevents meiosis II in the maturing mouse egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 7038-7042.
- OGORMAN S., FOX D.T., WAHL G.M., 1991. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science*, 251(4999) : 1351-1355.
- OPPENHEIM A., PELEG A., FIBACH E., RACHMILEWITZ E. A., 1986. Efficient introduction of plasmid DNA into human hemopoietic cells by encapsidation in simian virus 40 pseudovirions. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 83 : 6925-6929.
- OSTERYOUNG KW, TOENJES K, HALL B, WINKLER V, BENNETT AB, 1990. Analysis of tomato polygalacturonase expression in transgenic tobacco. *Plant Cell*, 2(12) : 1239-1248.
- OVERSTREET R. M., VAN DEVENDER T., 1978. Implication of an environmentally induced hamartoma in commercial shrimps. *J. Invertebr. Pathol.*, 31 : 234-238.
- OWENS L.D., SMIGOCKI A.C., 1989. Transfer of phytohormone genes to induce morphogenesis in plants. In : *Advances in Cell Culture*, 7.
- OZATO K., INOUE K., WAKAMATSU Y., 1989. Transgenic fish : biological and technical problems. *Zoological Sci.*, 6(3) : 445-457.
- OZATO K., KONDOH H., INOHARA H., IWAMATU T., WAKAMATSU Y., OKADA T. S., 1986. Production of transgenic fish : introduction and expression of chicken crystallin gene in medaka embryos. *Cell Differentiation*, 19 : 237-244.
- OZIL J.P., MODLINSKI J.A., 1986. Effects of electric field on fusion rate and survival of 2-cell rabbit embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 96 : 211-228.
- PALMITER R.D., 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300 : 611-615.
- PARKER B.A., STRAK G.R., 1979. Regulation of simian virus 40 transcription : sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or viral DNA. *J. Virol.*, 31 : 360-369.
- PASZTY C.J.R., LURQUIN P.F., 1990. Inhibition of transgene expression in plant protoplasts by the presence in cis of an opposing 3'promoter. *Plant Science*, 72 : 69-79.
- PATTERSON B. D., 1988. Gene for cold resistance from wild tomatoes. *Hortscience*, 23(5) : 794.
- PEETERS L., 1990. Essai d'induction de la polyploïdie par traitement chimique chez la crevette *Penaeus indicus*. Rapport de D.E.A. Université Française du Pacifique.

- PELHAM H.R.B., 1982. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. *Cell*, 30 : 517-528.
- PETITTE J.N., CLARK M.E., LIU G., GIBBINS A.M.V., ETCHES R.J., 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development*, 108 : 185-189.
- PETREY D., BUSTER D., DONATO K.K., ANDERSON H., 1989. Injection of antibodies into Grasshopper eggs as a method for studying embryonic development. *Develop. Growth & Differ.*, 31, 3 : 299-305.
- PHILLIPS J.P., XIN J.H., KIRBY K., 1990. Transfer and expression of an organophosphate insecticide degrading gene from *Pseudomonas* in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 8155-8159.
- PICAUD T., GOUDET J.L., 1986. Cryoconservation chez les Pénéides. IFREMER-COP, rapport final AQUACOP.
- PINKERT C.A., 1990. A rapid procedure to evaluate foreign DNA transfer into mammals. *Biotechniques*, 9(1) : 38-39.
- POTRYKUS I., 1990. Gene transfer to cereals : an assessment biotechnology, June 1990, P. 535-542,
- POTRYKUS I., 1991. Gene transfer to plants : assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42 : 205-225.
- POTTER H., 1988. Electroporation in biology : methods, applications, and instrumentation. *Analytical Biochemistry*, 174 : 361-373.
- PRATHER R.S., 1990. Nuclear transplantation as a method for cloning embryos. Minireview : Cloning by nuclear transfer. *Soc. Exp. Biol. Med.*, 7-12.
- PRATHER R.S., SIMS M.M., 1990. Nuclear transplantation in the pig embryo: nuclear swelling. *Journal of Experimental Zoology*, 255 : 355-358.
- PRIMAVERA J.H., 1984. A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids.
- PUCHALSKI RB, FAHL WE, 1992. Gene transfer by electroporation, lipofection, and DEAE-dextran transfection - compatibility with cell-sorting by flow cytometry. *Cytometry*, 13(1) : 23-30.
- PUCHTA H., HOHN B., 1991. The mechanism of extrachromosomal homologous DNA recombination in plant cells. *Mol. Gen. Genet.*, 230(1-2) : 1-7.
- PURSEL V.G., HAMMER R.E., BOLT D.J., 1990. Integration, expression and germ-line transmission of growth related genes in pigs. *J. Reproduction & Fertility*, Suppl 41 : 77-87.
- PURSEL V.G., REXROAD C.E., BOLT D.J., 1989. Gene transfer for enhanced growth of livestock. In *Animal Growth Regulation*. Ed. D.R. Campion, G.J. Hausman, R.J. Martin : 359.
- RANCOURT D.E., PETERS I.D., WALKER V.K., DAVIES P.L., 1990. Wolffish antifreeze protein from transgenic *Drosophila*. *Biotechnology*, 8 : 453-457.

- RANCOURT D.E., WALKER V.K., DAVIES P.L., 1987. Flounder antifreeze protein synthesis under heat shock control in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Molecular & Cellular Biology*, 7(6) : 2188–2195.
- RASSOULZADEGAN M., PAQUIS V., VIDAL F., LOUBKIERE R., CUZIN F., 1991. Immortalization of male germ cells Polyoma Virus large T-antigen. *Medecine/Science*, 7 (4) : R12.
- REED S. M., WERNSUAN E. A., BURNS J. A., KRAMER M. G., 1988. An evaluation of the use of irradiated pollen for gene transfer in *Nicotiana*. *Plant Science*, 56 : 155–160.
- REICH T.J., IYER V.N., HAFFNER M., HOLBROOK L.A., MIKI B.L., 1986. The use of fluorescent dyes in the microinjection of alfalfa protoplasts. *Can. J. Bot.*, 64 : 1259–1267.
- REICHHART J.M., MEISTER M., DIMARCO J.L., ZACHARY D., HOFFMANN D., RUIZ C., RICHARDS G., HOFFMANN J.A., 1992. Insect immunity: developmental and inducible activity of the *Drosophila* dipterin promoter. *EMBO Journal*, 11(4) : 1469–1477.
- RENART J., CRUCES J., DIAZ-GUERRA M., DOMINGUEZ E., FRANCO E., GIL I., MACIAS M.T., PALMERO I., SASTRE L., 1989. Structure and expression of ribosomal RNA genes from *Artemia*. In: Cell and Molecular Biology of Artemia Development ; Alden H. Warner, Th.H. MacRae & J.C. Bagshaw, (Eds) ; Plenum Publ. Co, 1989, : 287–293.
- REVEILLAUD I, NIEDZWIECKI A, BENSCH KG, FLEMING JE, 1991. Expression of bovine superoxide dismutase in *Drosophila melanogaster* augments resistance to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.*, 11(2) : 632–640.
- REXROAD C.E., MAYO K., BOLT D.J., ELSASSER T.H., MILLER K.F., BEHRINGER R.R., PALMITER R.D., BRINSTER R.L., 1991. Transferrin-directed and albumin-directed expression of growth-related peptides in transgenic sheep. *J Anim Sci*, 69(7) : 2995–3004.
- REXROAD C.E., JR, HAMMER R.E., 1990. Insertion, expression and physiology of growth regulating genes in ruminants. *J. of Reproduction & Fertility*, Suppl 41 : 119–124,
- RICHARDSON P. T., GILMARTIN P., COLMAN A., ROBERTS L. M., LORD J. M., 1988. Expression of functional ricin B chain in *Xenopus* oocytes. *Biotechnology*, 6 : 565–570.
- RICHTER H.P., CHEURICH P., ZIMMERMANN U., 1981. Electric field induced fusion of the sea urchin eggs. *Develop. Growth and Differ.*, 23 : 479–486.
- RIGGS C.D., HUNT D.C., LIN J., CHRISPEELS M.J., 1989. Utilization of luciferase fusion genes to monitor differential regulation of phytohemagglutinin and phaseolin promoters in transgenic tobacco. *Plant Science*, 63 : 47–57.
- ROBERSON S.M., 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 L.S., DONALDSON P.A., LADAIQUE C., 1990. Antisense RNA inhibition of glucuronidase (Beta-) gene expression in transgenic tobacco can be transiently overcome using a heat inducible glucuronidase gene construct. *Biotechnology*, 8 : 459–464.
- ROGERS S.O., BENDICH A.J., 1988. Extraction of DNA from plant tissues. In : *Plant Molecular Biology Manual*, 6 : 1–10.

- ROLLING F., 1992. Vecteurs dérivés du Densovirus de *Junonia coenia* (JcDNV) exprimant sous forme épisomale ou intégrée des gènes étrangers dans des cellules d'insectes. Thèse de 3ème cycle. Univ. Aix-Marseille II. Spécialité Biol. Cell. et Microbiol.
- ROLS M.P., 1989. Electroperméabilisation de cellules animales. Approche biophysico-chimique des mécanismes dans le cas des cellules de la lignée CHO. Th. Doct. Univ. Toulouse, 1989, pp. 214.
- ROSCHLAU K, 1991. Gene transfer studies in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 43 : 293-295.
- ROTTMANN O.J., ANTES R., HOFER P., MAIERHOFER G., 1992. Liposome mediated gene transfer *via* spermatozoa into avian egg cells. *J. Anim. Breed. Genet.*, 109(1) : 64-70.
- ROVINSKI B., BENCHIMOL S., 1988. Immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. *Oncogene*, 2 : 445-452.
- ROZENBERG U.B., PREISS E., STRAND M., RICE D., 1985. Production of phenocopies by kruppel antisense RNA into *Drosophila* embryos. *Nature*, 313 : 703-706.
- RUSCONI S., 1991. Transgenic regulation in laboratory animals. *Experientia*, 47 : 866-877.
- RUSSELL J.A., ROY M.K., SANFORD J.C., 1992. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol*, 98(3) : 1050-1056.
- RUTHER U., KOMITOWSKI D., SCHUBERT F.R., WAGNER E.F., 1989. C-*fos* expression induces bone tumors in transgenic mice. *Oncogene*, 4 : 861-865.
- SAKANARI J.A., STAUNTON C.E., EAKIN A.E., CRAIK C.S., McKERROW J.H., 1989. Serine proteases from nematode and protozoan parasites : isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 4863-4867.
- SAMAKOVLIS Ch., KIMBRELL D.A., KYLSTEN P., ENGSTROM A., HULTMARK D., 1990. The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity. *The EMBO J.*, 9(9) : 2969-2976.
- SAMARUT J., 1990. La coopération d'oncogènes dans la transformation cellulaire. *Reprod. Nutr. Dev.*, 30 : 361-378.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T., 1989. Molecular cloning, a laboratory manual., 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANDERS B.M., 1988. The role of the stress proteins response in physiological adaptation of marine molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 24 : 207-210.
- SANDFORD J.C., JOHNSTON S. A., 1985. The concept of parasite derived resistance. Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J. Theor. Biol.*, 113 : 395-405.
- SANGER F., NIKLEN S., COULSON A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA*, 74 : 5463-5465.
- SASAKI K., MIZUSAWA H., ISHIDATE M., TANAKA N., 1991. Gene transfer into mammalian cells by rapid freezing. *In Vitro. Cell. Dev. Biol.*, 27(1) : 86-88.
- SASTRE L., CRUJES J., DIAZ-GUERRA M., DOMINGUEZ E., FRANCO E., GIL I., MACIAS M.T., PALMERO I., QUINTANILLA M., RENART J., 1989. cDNA cloning of

developmentally regulated *Artemia* genes. In : Cell and Molecular Biology of Artemia Development ; Alden H. Warner, Th.H. MacRae & J.C. Bagshaw, (Eds) ; Plenum Publ. Co, 1989, 319–327.

- SAUNDERS J.A., SMITH C.R., KAPER J.M., 1989. Effects of electroporation pulse wave on the incorporation of viral RNA into tobacco protoplasts. *Biotechniques*, 7(10) : 1124–1131.
- SAUTTER C., WALDNER H., NEUHAUSURL G., GALLI A., NEUHAUS G., POTRYKUS I., 1991. Micro-targeting – high efficiency gene transfer using a novel approach for the acceleration of micro-projectiles. *Biotechnology*, 9(11) : 1080–1085.
- SAWA M., FUKUNAGA A., NAITO T., OISHI K., 1989. Studies on the sawfly, *Athalia rosae* (insecta, Hymenoptera, tenthredinidae). 1 : General biology. *Zoological Science*, 6 : 541–547.
- SAWA M., OISHI K., 1989. Delayed sperm injection and fertilisation in parthenogenetically activated insect egg (*Athalia rosae*, Hymenoptera). *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 198 : 242–244.
- SCHARF S.J., HORN G.T., ERLICH H.A., 1986. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, 233 : 1076–1078.
- SCHLESINGER M.J., 1990. Heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 (21) : 12111–12114.
- SCHMULLING T., BEINSBERGER S., DEGREEF J., SCHELL J., VAN ONCKELEN H., SPENA A., 1989. Construction of a heat-inducible chimaeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue. *FEB*, 249(2) : 401–406.
- SCHNEIDER M., OW D.W., HOWELL S.H., 1990. The *in vivo* pattern of firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 14 : 935–947.
- SCHOFFL F., RIEPING M., BAUMANN G., BEVAN M., ANGERMULLER S., 1989. The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric genes in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.*, 217 : 246–253.
- SCHWEISGUTH F., YANICOSTAS C., PAYRE F., LEPESANT J.A., VINCENT A., 1989. *Cis*-regulatory elements of the *Drosophila* blastoderm-specific *Serendipity α* gene : ectopic activation in the embryonic PNS promoted by the deletion of an upstream region. *Dev. Biol.*, 136 : 181–193.
- SCZAKIEL G., DOFFINGER R., PAWLITA M., 1989. Testing for electrotransfection parameters by use of the fluorescent dye lucifer yellow CH. *Anal. Biochem.*, 181 : 309–314.
- SENARATNA T., MCKERSIE B.D., KASHA K.J., PROCUNIER J.D., 1991. Direct DNA uptake during the imbibition of dry cells. *Plant Science*, 79 : 223–228.
- SERRAS F., BUULTJENS T.E.J., FINBOW M.E., 1988. Inhibition of dye-coupling in *Patella* (Mollusca) embryos by microinjection of antiserum against *Nephrops* (Arthropoda) gap junctions. *Experimental Cell Research*, 179 : 282–288.
- SEVERSON D.W., WILLIAMSON J.L., AIKEN J.M., 1991. Nucleotide sequence of a middle repetitive DNA from honey bees. *Gene*, 97 : 313–314.
- SHAPIRO I. M., STEVENSON M., SIMANGIL F., VOLSKY D. J., 1986. Transfection of lymphoblastoid cells using DNA-loaded reconstituted sendai virus envelopes :

- expression of transfected DNA and selection of transfected cells. *Somatic Cell & Molecular Genetics*, 12(4) : 351–356.
- SHEN N.L.L., SOFER W.H., 1991. Introduction of single stranded *adh* genes into *Drosophila* results in tissue specific expression. *biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174(3) : 1300–1305.
- SHEN R.F., CLIFT S.M., DEMAYO J.L., DE MAYO J.L., 1989. Tissue specific regulation of human antitrypsin (alpha-1) gene expression in transgenic mice. In : *DNA*, 8 (2) : 101–108.
- SHIGEKAWA K., DOWER W. J., 1988. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes : a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques*, 6(8) : 742–751.
- SHIGENAGA T., MUTA T., TOH Y., TOKUNAGA F., IWANAGA S., 1990. Antimicrobial tachyplesin peptide precursor. *J. of Biol. Chem.*, 265 : 21350–21354.
- SHIMADA K., 1988. Expression of tissue-specific genes in transgenic mice.
- SILHOL M., HUEZ G., LEBLEU B., 1986. An antiviral state induced in hela cells by microinjected poly(ri) poly(rc). *J. Gen. Virol.*, 67 : 1867–1873.
- SINN E., MULLER W., PATTENGAL P., TEPLER I., WALLACE R., LEDER P., 1987. Coexpression of MMTV/*v-ha-ras* and MMTV/*c-myc* genes in transgenic mice : synergistic action of oncogenes *in vivo*. *Cell*, 49 : 465–475.
- SKALA H., GARAPIN A. C., COLBERE-GARAPIN F., 86. The transient expression of genes following DNA transfection : dependence on the cell line. *Ann. Inst. Pasteur/Virol*, 137E : 13–26,
- SKERLAVAJ B., ROMEO D., GENNARO R., 1990. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gram-negative bacteria by Bactenecins. *Infection & Immunity*, 58(11) : 3724–3730.
- SLAVIK T., PAVLOK A., FULKA J., 1989. Penetration of intact bovine ova with ram sperm *in vitro*. *Molecular Reproduction & Development*, 25 : 345–347.
- SMITH C.J.S., WATSON C.F., MORRIS P.C., BIRD C.R., SEYMOUR G.B., 1990a. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Molecular Biology*, 14 : 369–379.
- SMITH L.C., 1990. Improvement of embryonic electrofusion techniques to produce genetically identical mammals. In Report of International Conference on Electroporation and Electrofusion, Woods Hole, USA ; october 28–31. pp 18.
- SMITH R.C., BEMENT W.M., DERSCH M.A., 1990b. Nonspecific effects of oligodeoxynucleotide injection in *Xenopus* oocytes : a reevaluation of previous d7 mRNA ablation experiments. *Development*, 110 : 769–779.
- SORGELOOS P., BOSSUYT E., LAVINA E., BAEZA-MESA M., PERSOONE G., 1977. Decapsulation of *Artemia* cysts : a simple technique for the improvement of the use of the brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture*, 12 : 311–315.
- SPARKS, A. K. AND LIGHTNER, D. V., 1973. A tumorlike papilliform growth in the brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *J. Invertebr. Pathol.*, 22 : 203–212.

- SPIETH J., MACMORRIS M., BROVERMAN S., GREENSPOON S., BLUMENTHAL T., 1988. Regulated expression of a vitellogenin fusion gene in transgenic nematodes. *Developmental Biology*, 130, : 285–293.
- SPORLEIN B, KOOP HU, 1991. Lipofectin – Direct gene transfer to higher plants using cationic liposomes. *Theor. Appl. Genet.*, 83(1) : 1–5.
- SPRADLING A. C., RUBIN G. M., 1982. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germs line chromosomes. *Science*, 218 : 341–347,
- STAEHELI P, 1991. Intracellular immunization – a new strategy for producing disease-resistant transgenic livestock. *Trends Biotech.*, 9(3) : 72–73.
- STARK D.M., BEACHY R.N., 1989. Protection against potyvirus infection in transgenic plants : evidence for broad spectrum resistance. *Biotechnology*, 7 : 1257–1262.
- STEHELIN D., 1988. Dissection moléculaire des cancers. *Bull. Inst. Pasteur*, 86 : 225–242.
- STEHELIN D., VARMUS M.E., BISHOP J.M., 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.
- STEINERT S.A., PICKWELL G.V., 1988. Expression of heat shock proteins and metallothionein in mussels exposed to heat stress and metal ion challenge. *Marine Environmental Research*, 24 : 211–214.
- STINCHCOMB D.T., SHAW J., CARR S., HIRSH D., 1987. Extrachromosomal DNA transformation of *C. elegans*. Report n° 20 : genetic manipulation of the early mammalian embryo. Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0–87969–220–0–8/85 251–263.
- STINCHCOMB D.T., SHAW J.E., CARR S.H., HIRSH D., 1985. Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular & Cellular Biology*, 5 : 3484–3496.
- STOCKHAUS J., HOFER M., RENGER G., 1990. Antisense RNA efficiently inhibits formation of the 10 kD polypeptide of photosystem II in transgenic potato plants : analysis of the role of the 10 kD protein. *The EMBO Journal*, 9 (9) : 3013–3021.
- STUART G.W., McMURRAY J.V., WESTERFIELD M., 1988. Replication, integration and stable germ–line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development*, 103 : 403–412.
- SUCOV H. M., HOUGH–EVANS B. R., FRANKS R. R., BRITTEN R. J., DAVIDSON E. H., 1988. A regulatory domain that directs lineage–specific expression of a skeletal matrix protein gene in the sea urchin embryo.
- SUN S.C., LINDSTROM J., BOMAN H.G., FAYE I., SCHMIDT O., 1990. Hemolin – an insect–immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science*, 250(4988) : 1729–1732.
- SWEZEY R.R., EPEL D., 1989. Stable, resealable pores formed in sea urchin eggs by electric discharge (electroporation) permit substrate loading for assay of enzymes *in vivo*. *Cell Regulation*, 1 : 65–74.
- SZYBALSKI W, 1991. Protection of plants against viral diseases by cloned viral genes and anti–genes. *Gene*, 107(2) : 177–179.

- TAKAYAMA K.M., INOUE M., 1990. Antisense RNA. *Biochemistry & Molecular Biology*, 25(3) : 155-184.
- TAKAYAMA K.M., KURIYAMA S., WEISS S., CHADA K. INOUE S., INOUE M., 1989. Antisense RNA-mediated inhibition of viral infection in tissue culture and transgenic mice. In "Molecular Biology of RNA", A.R. Liss (ed.), 299-310.
- TAMIYA E., MASAKI, K.H., SUGIYAMA, T., KARUBE, I., 1989. Highly sensitive detection system for luciferase gene in transgenic fish. In Current topics in Marine Biotechnology. Ed. Miyachi, S. *et al.*, 281-284.
- TAMIYA E., SUGIYAMA T., MASAKI K., HIROSE A., OKOSHI T., KARUBE I., 1990. Spatial imaging of luciferase gene expression in transgenic fish. *Nucleic Acids Research*, 18(4) : 1072.
- TAMURA T., KANDA T., TAKIYA S., 1990. Transient expression of chimeric CAT genes injected into early embryos of the domesticated silkworm *Bombyx mori*. *Jpn. J. Genet.*, 65 : 401-410.
- TEISSIE J., ROLS M. P., 1986. Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electropermeabilization. *Biochemical & Biophysical Res. Commu.*, 140(1) : 258-266.
- TEPFER M., CASSE-DELBART F., 1987. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. *Microbiological Sciences*, 4(1) : 24-28.
- THADANI V.M., 1980. A study of hetero-specific sperm-egg interactions in the rat, mouse and deer mouse using *in vitro* fertilization and sperm injection. *J. Exper. Zool.*, 212 : 435-453.
- TOMITA M., TSONG T.Y., 1990. Selective production of hybridoma cells - antigenic-based preselection of B lymphocytes for electrofusion with myeloma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1055 : 199-206.
- TRAN H.T.T., METCALF D., CHEERS C., 1990. Antibacterial activity of peritoneal cells from transgenic mice producing high levels of GM-CSF. *Immunology*, 71 : 377-382.
- TSONG T.Y., 1991. Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.*, 60 : 297-306.
- TSUKIMURA B., KAMEMOTO F.I., 1991. *In vitro* stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 92 : 59-66.
- VAN DER KROL A.R., MOL J.N.M., STUITJE A.R., 1988. Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques*, 6(10) : 958-975.
- VAN DER KROL A.R., MOL J.N.M., STUITJE A.R., 1988c. Antisense genes in plants : an overview. *Gene*, 72 : 45-50.
- VAN DUIJN G., LANGEGIJK J.P.M., DE BOER M., TAGER J.M., 1989. High yields of specific hybridomas obtained by electrofusion of murine lymphocytes immunized *in vivo* or *in vitro*. *Experimental Cell Research*, 183 : 463-472.
- VAUGHN J.C., 1975. DNA reassociation kinetics and chromosome structure in the crabs *Cancer borealis* and *Libinia emarginata*. *Chromosoma*, 50 : 243-257.

- VENKATESWARLU K., NAZAR R.N., 1991. Evidence for T-DNA mediated gene targeting to tobacco chloroplasts. *Biotechnology*, 9(11) : 1103-1105.
- VICKERS J.E., SPRADBROW P.B., LESTER R.J.G., PEMBERTON J.M., 1990. Detection of baculoviral DNA in infected prawns using polymerase chain reaction. Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. Bali, Indonesia. Asian Fisheries Society.
- VIENKEN J., ZIMMERMANN U., 1985. An improved electrofusion technique for production of mouse hybridoma cells. *FEBS*, 182 : 278-280.
- VOELKER T.A., MORENO J., CHRISPPEELS M.J., 1990. Expression analysis of a pseudogene in transgenic tobacco : a frameshift mutation prevents mRNA accumulation. *The Plant Cell*, 2 : 255-261.
- WAGNER P., KUNZ J., KOLLER A., 1990. Active transport of proteins into the nucleus. *FEBS*, 275(1-2)1-5.
- WALKER S.K., HEARD T.M., VERMA P.J., ROGERS G.E., BAWDEN C.S., SIVAPRASAD A.V., 1990. *In vitro* assessment of the viability of sheep zygotes after pronuclear microinjection. *Reprod. Fert. Develop.*, 2 (6) : 633-640.
- WALKER V., 1989. Gene transfer in insects. *Advanc. in Cell Culture*, 7 : 87-124.
- WALL R.J., PURSEL V.G., SHAMAY A., MCKNIGHT R.A., PITTIUS C.W., HENNIGHAUSEN L., 1991. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(5) : 1696-1700.
- WANG Y. C., KLEIN T. M., FROMM M., CAO J., SANFORD J. C., WU R., 1988. Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. *Plant Molecular Biology*, 11 : 433-439.
- WEBB L., CARL M., MALLOY D.C., DASCH G.A., AZAD A.F., 1990. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 28(3) : 530-534.
- WEBER G., MANAJEMBASHI S., WOLFRUM J., GREULICH K.O., 1990. Genetic changes induced in higher plant cells by a laser microbeam. *Physiologia Plantarum*, 79 : 190-193.
- WEBER G., MANAJEMBASHI S., GREULICH K.O., WOLFRUM J., 1989. Uptake of DNA in chloroplasts of *Brassica napus* (L.) facilitated by a UV-laser microbeam. *Eur. J. Cell Biol.*, 49 : 73-79.
- WEIDLE U.H., LENZ H., BREM G., 1991. Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbits and pigs. *Gene*, 98 : 185-191.
- WEISING K., SCHELL J., KAHL G., 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression, and applications. *Annu. Rev. Genet.*, 22 : 421-477.
- WILLIAMS R.S., JOHNSTON S.A., RIEDY M., DEVIT M.J., MCELLIGOTT S.G., SANFORD J.C., 1991. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(7) : 2726-2730.
- WILLIAMS T. M., BURLEIN J. E., OGDEN S., KRICKA L. J., KANT J. A., 1989. Advantages of firefly luciferase as a reporter gene: application to the interleukin-2 gene promoter. *Analytical Biochemistry*, 176 : 28-32.

- WILMUT I., ARCHIBALD A.L., McLENAGHAN, SIMONS J.P., WHITELAW C.B.A., CLARK A.J., 1991. Production of pharmaceutical proteins in milk. *Experientia*, 47(9) : 905–912.
- WILSON C., CROSS G. S., WOODLAND H. R., 1986. Tissue-specific expression of actin genes injected into *Xenopus* embryos. *Cell*, 47 : 589–599.
- WIRGIN I., CURRIE D., GARTE S.J., 1989. Activation of the K-ras oncogene in liver tumors of Hudson River tomcod. *Carcinogenesis*, 10 : 2311–2315.
- WISNIEWSKI L.A., POWELL P.A., NELSON R.S., 1990. Local and systemic spread of tobacco mosaic virus in transgenic tobacco. *Plant Cell*, 2 : 559–567.
- WOLFF J.A. *et al.*, 1990. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 247 : 1465–1468.
- WORMINGTON W.M., 1986. Stable repression of ribosomal protein L1 synthesis in *Xenopus* oocytes by microinjection of antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 8639–8643.
- YAMAMURA K. I., WAKASUGI S., IWANAGA T., INOMOTO T., MAEDA S., 1987. Tissue specific and developmental expression of human transthyretin gene in transgenic mice. *Devpt. Genetics*, 8: 195–205.
- YANAGIDA K., YANAGIMACHI R., PERREAULT S.D., KLEINFELD R.G., 1991. Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biol. Reprod.*, 44 : 440–447.
- YANG N.S., BURKHOLDER J., ROBERTS B., MARTINELL B., McCABE D., 1990. *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(24) : 9568–9572.
- YOON S. J., HALLERMAN E. M., GROSS M. L., 1990. Transfer of the gene for neomycin resistance into goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 85 : 21–33.
- ZAMBRYSKI P., 1988. Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annu. Rev. Genet.*, 22 : 1–30.
- ZASLOFF M., 1987. Magainins a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* : skin : isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *J. Virol Methods Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(15) : 5449–5453.
- ZHANG P., HAYAT M., JOYCE C., 1990. Gene transfer, expression and inheritance of p-rsv rainbow trout GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (linnaeus). *Molecular Reproduction and Development*, 25 : 3–13.
- ZHAO X, WONG T., 1991. Production of transgenics by baekonisation. *J. of Cell Biol.*, 115 : 83a.
- ZIMMERMANN U., 1986. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 105 : 175–256.
- ZIMMERMANN U., VIENKEN J., HALFMANN J., EMEIS C.C., 1985. Electrofusion: a novel hybridization technique. *Advances in Biotechnological Processes*, 4 : 79–150.
- ZIMMERMANN U., VIENKEN J., 1982. Electric-field-induced cell-to-cell fusion. *J. Membrane Biol.*, 67 : 165–182.

ZINKERNAGEL R.M., COOPER S., CHAMBERS J., 1990. Virus induced autoantibody response to a transgenic viral antigen. *Nature*, 345 : 68-71.

ANNEXES

Principales espèces de crevettes tropicales marines commercialisées

Origine	Nom international	Espèce
Indo-Pacifique	Green tiger prawn	semisulcatus
	Banana prawn	merguiensis
	Indian white prawn	indicus
	Giant tiger prawn	monodon
	Kuruma prawn	japonicus
	Fleshy prawn	orientalis
	Western king prawn	latisulcatus
	Brown tiger prawn	esculentus
Océan indien ouest	Indian white prawn	indicus
	Giant tiger prawn	monodon
	Green tiger prawn	semisulcatus
Atlantique est	Southern pink shrimp	notialis
Atlantique ouest	Northern white shrimp	setiferus
	Northern pink shrimp	duorarum
	Southern pink shrimp	notialis
	Northern brown shrimp	aztecus
	Southern brown shrimp	subtilis
	Southern white shrimp	schmitti
	Redspotted shrimp	brasiliensis
Pacifique est	Yellow leg shrimp	californiensis
	White leg shrimp	vannamei
	Blue shrimp	stylirostris
	Crystal shrimp	brevirostris
	Western white shrimp	occidentalis

Type du virus	Maladie	Hôte	Stade d'infection	Organe cible	Forme du virus	Taille du virion (nm)	Références
Baculovirus	Baculovirus penaei (BP)	<i>P. vannamei</i> <i>P. stylirostris</i> <i>P. duorum</i> <i>P. setiferus</i> <i>P. aztecus</i>	larve post-larve tous	hépatopancréas et intestin antérieur hépatopancréas et intestin antérieur hépatopancréas hépatopancréas et intestin antérieur	bâtonnet	70 x 270	Lightner, 1983 Couch, 1974 ; Lightner, 1983
	Monodon Baculovirus (MBV) "Baculoviral midgut gland necrosis" (BMN)	<i>P. monodon</i> <i>P. japonicus</i>	tous	hépatopancréas et intestin antérieur hépatopancréas et intestin antérieur	bâtonnet	69 x 275 72 x 310	Lightner, 1983 ; Nash et al., 1988 Sano et al., 1981
Picorna-like virus	"Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis" (IHHN)	<i>P. monodon</i> <i>P. stylirostris</i> <i>P. vannamei</i>	post-larve juvénile	hypoderme, cuticule, hémocytes organe hématopoïétique, tissu connectif	icosaèdre	16-28	Lightner et al., 1981 Bell et Lightner, 1984 ; Bonami et al., 1990
Parvo-like virus		<i>P. merguensis</i> <i>P. semisulcatus</i>	larve et post-larve	hépatopancréas	icosaèdre	22-24	Lightner et Redman, 1985 ; Owens et al., 1991
Réo-like virus	induction expérimentale par BP	<i>P. monodon</i> <i>P. vannamei</i>	post-larve larve	hépatopancréas hépatopancréas	icosaèdre icosaèdre	50-70 40-60	Nash et al., 1988 Krol et al., 1990
Rhabdovirus	chez les organismes infectés par IHHNV	<i>P. vannamei</i> <i>P. stylirostris</i>			demi-bâtonnet	19-20	Lu et al., 1991

ANNEXE 2

Différents types de virus
rencontrés en pénéculture

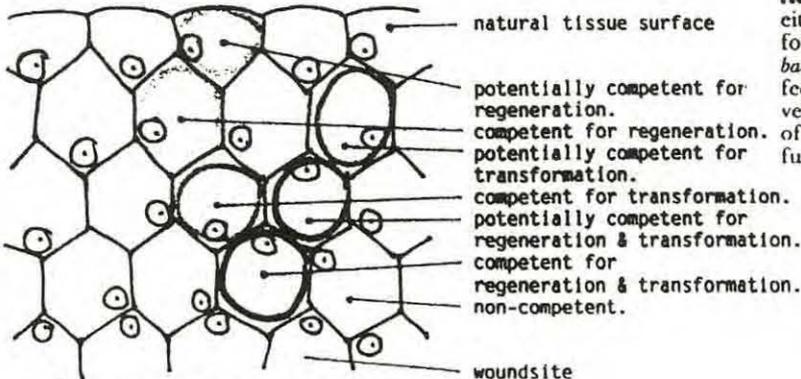
Applications de la microinjection autres que la transformation génétique

Gr.	Noms latins et communs (français et anglais)		Champ d'études		"Molécules" injectées	
						Références
	<i>Ascidia ahodori</i>	ascidie	a	développement	enzyme	Nishida et Satoh, 1983
a	<i>Xenopus laevis</i>	crapaud	bm	anti-sens	ARN s	Melton, 1985
a	<i>Xenopus laevis</i>	crapaud	bm	anti-sens	ARN s	Wormington, 1986
a	<i>Xenopus laevis</i>	crapaud	bm	maturation protéique	ARN m	Ikeda et al., 1989
a	<i>Xenopus laevis</i>	crapaud	o	cycle cellulaire	mab	Méchali et al., 1989
a	<i>Xenopus laevis</i>	crapaud	o	cycle cellulaire	mab	Miron et al., 1990
a	<i>Xenopus laevis</i>	crapaud	a	développement	protéine	Kamata et Kung, 1990
a	<i>Xenopus laevis</i>	crapaud		traduction	ARN m	Richardson et al., 1988
a	<i>Xenopus laevis</i>	crapaud	o		ADN o	Jessus et al., 1988
a	<i>Xenopus laevis</i>	crapaud	bm	maturation ovocytaire	ADN o	Smith et al., 1990
a	<i>Xenopus laevis</i>	crapaud		traduction	ARN m	Hitchcock et al., 1987
a	<i>Xenopus laevis</i>	crapaud		traduction	ADN a	Cazenave et al., 1989
c	<i>Armadillidium vulgare</i>	oniscoïde		croissance/reproducti	bactérie	Juchault et Mocquard, 1989
e	<i>Marthasterias glacialis</i>	étoile de	a	cycle cellulaire	cytopl	Labbe et al., 1987
e	<i>Xenopus laevis</i>	crapaud	a	méthodologie	ARN m	Giladi et Spindel, 1991
e	<i>Lytechinus sp.</i>	oursin	a	activation méiotique	sucre	Crossley et al., 1988
i	<i>Drosophila melanogaster</i>	mouche	bm	filiation cellulaire	histone	Minden et al., 1989
i	<i>Athalia rosae</i>	sawfly	a	développement	spz	Sawa et al., 1989
i	<i>Athalia rosae</i>	sawfly		fertilisation	spz	Sawa et Oishi, 1989
i	<i>Schistocerca americana</i>	grasshop	a	développement	mab	Petrey et al., 1989
i	<i>Drosophila sp.</i>	mouche		hétéroplasmie	mito	Matsuura et al., 1990
i	<i>Drosophila melanogaster</i>	mouche	bm		ARN s	Rozenberg et al., 1985
i	<i>Drosophila melanogaster</i>	mouche	bm		ARN s	Boulay et al., 1987
i	<i>Drosophila melanogaster</i>	mouche	bm		ARN s	Cabrera et al., 1987
mm	<i>Bos sp.</i>	vache		hybridation	spz	Slavik et al., 1989
mm	<i>Homo sapiens</i>	homme	p	stérilité	spz	Lanzendorf et al., 1988
mm		hamster	a	thermostabilité	spz	Yanagida et al., 1991
mm	<i>Mus musculus</i>	souris		méthodologie	ARN m	McConnell et al., 1990
mm	<i>Mus musculus</i> (lignée)	souris	bm	étude promoteur	ADN o	Miskimins et Brown, 1990
mm	<i>Ratus ratus</i>	rat		hybridation	spz	Thadani, 1980
mm	<i>Mus musculus</i>	souris	o		ADN o	O'Keefe et al., 1989
mm	<i>Mus musculus</i>	souris	a	fertilisation	spz	Iritani, 1991
mm	<i>Homo sapiens</i>	homme	a	stérilité	spz	Gordon et al., 1988
mm	<i>Mus musculus</i>	souris	a		spz	Markert, 1983
mm	<i>Mus musculus</i>	souris	a	développement	noyau	Kono et al., 1991
mm			a	clonage	noyau	Prather, 1990
mm	<i>Homo sapiens</i> (lignée)	homme	p	antiviral	ARN s	Silhol et al., 1986
mm	<i>ovis sp</i>	mouton			noyau	Walker et al., 1990
mm	<i>Mus musculus</i>	souris	a	méthodologie	es	Smith, 1990
mm	<i>Sus sp</i>	cochon	a		noyau	Prather et al., 1990
mo	<i>Patella vulgata</i>	patelle	a	développement	pab	Serras et al., 1988
pl	<i>Medicago sativa</i>	luzerne	a	méthodologie	traceur	Reich et al., 1985
pl	<i>Nicotiana tabacum</i>	tabac		méthodologie	traceur	McNeil, 1989
pl	Quatre espèces	riz...		méthodologie	liposom	Lucas et al., 1990
po	<i>Salmo gairdneri</i>	truite	a	embryopathologie	carcino	Metcalfe et Sonstegarg, 1984
po	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	saumon	a	embryopathologie	bactérie	Brown et al., 1990

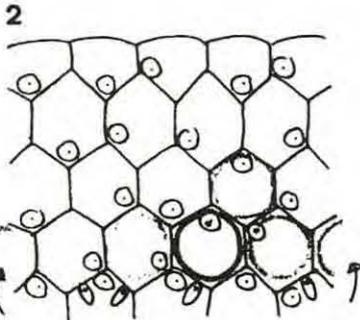
Variété des approches méthodologiques pour le transfert de gènes chez les plantes.

1 TISSUES ARE POPULATIONS OF CELLS NON COMPETENT, POTENTIALLY COMPETENT, AND COMPETENT FOR REGENERATION & TRANSFORMATION.

(extrait de Potrykus, 1990)

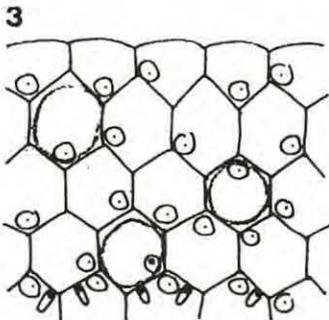


Tissues are populations of cells which are either non-competent, potentially competent, or competent for regeneration and/or integrative transformation.



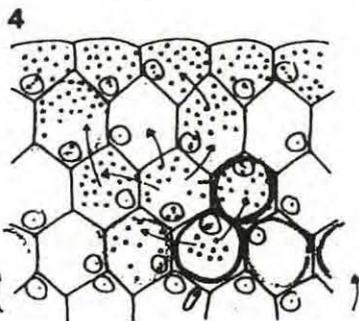
Wound response makes potentially competent cells competent

AgroTi + Dicotylédones



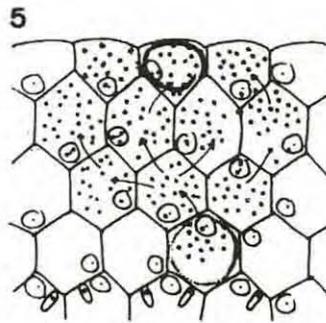
No competent cells because wound response is missing.

AgroTi + Céréales



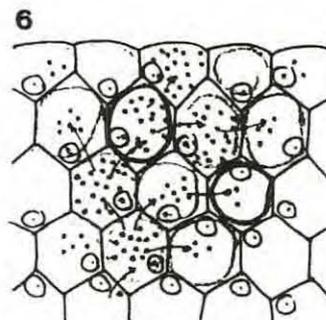
Virus spreads systemically, but does not integrate.

Agroinfection + Dicotylédones



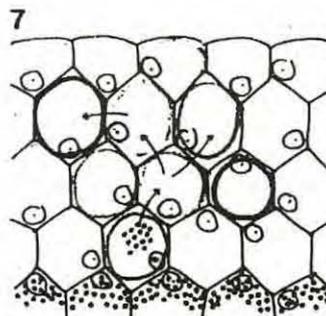
Virus spreads systemically, but does not integrate.

Agroinfection + Céréales



Systemic spread, no integration. no transmission to offspring.

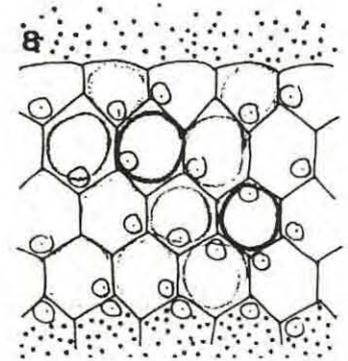
Virus



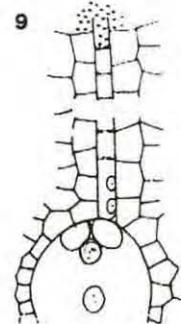
Viral DNA spreads, does not integrate. Non-viral DNA does not enter tissue.

Incubation virus/embryos

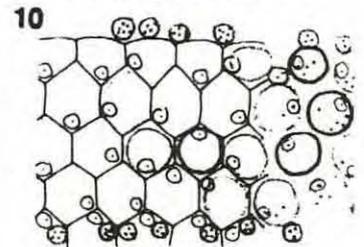
FIGURES 1-11 (1) Tissues are populations of cells which are either non-competent, potentially competent, or competent for regeneration and/or integrative transformation. (2) *Agrobacterium* and dicots. (3) *Agrobacterium* and cereals. (4) Agroinfection and dicots. (5) Agroinfection and cereals. (6) Viral vectors. (7) Incubation of dry seeds/embryos. (8) Incubation of tissues/cells in DNA. (9) Pollentube pathway. (10) Liposome fusion. (11) Liposome injection.



Incubation cellules/ADN

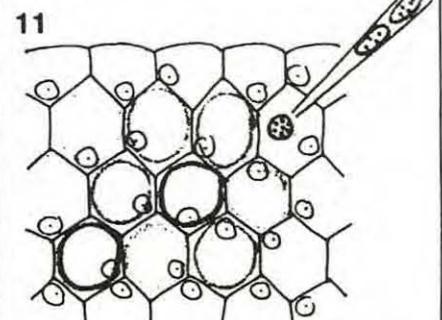


No open pipes to the egg cell DNA adhesion to cell walls; nuclease...
Tube pollinique



Transfers DNA into protoplasts but not into cells with cell walls.

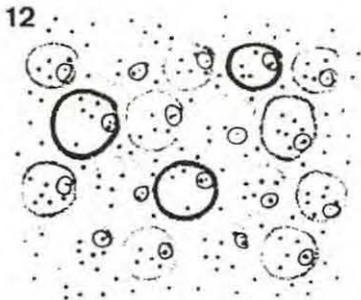
Liposomes



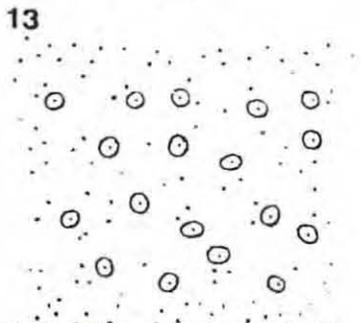
Transfers DNA into cells avoiding the vacuole.

Injection de liposomes

FIGURES 12-23 (12) Protoplasts and direct gene transfer. (13) Protoplasts from cereal plants. (14) Microlaser. (15) Electrophoresis into tissues. (16) Biolistics or particle gun. (17) Biolistics and cell cultures. (18) Microinjection into tissues. (19) Microinjection into proembryos. (20) *Agrobacterium* and zygotic proembryos. (21) Macroinjection. (22) Pollen incubation. (23) Electroporation.

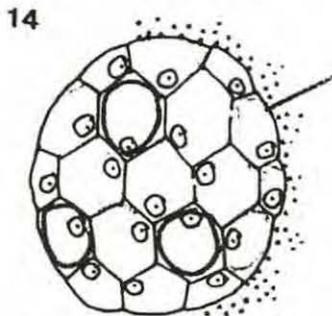


12
Transfert direct
en protoplastes

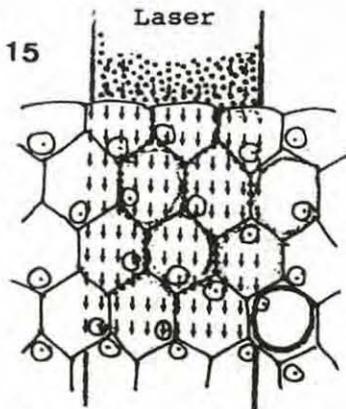


13
Probably efficient uptake, but no competent protoplasts.

Protoplastes de Céréales

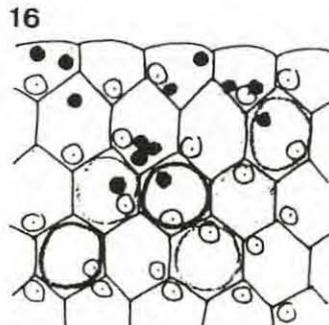


14
Opens holes in cell walls and membranes; DNA adhesion to cell walls.



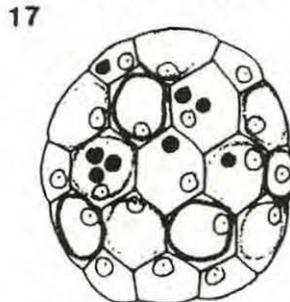
15
Probably no DNA transport across walls, no transgenic clones so far.

Electrophorèse



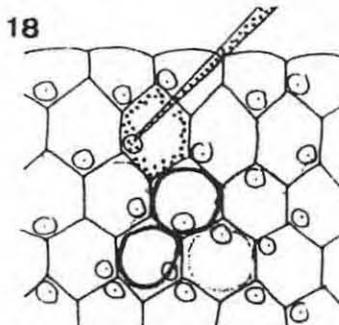
16
Multiple DNA transfers; efficient in transient, inefficient in integrative transformation.

Biolistique



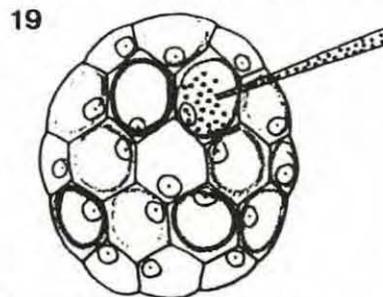
17
Transgenic clones at low frequency; no transgenic cereals, but promising.

Biolistique + Céréales



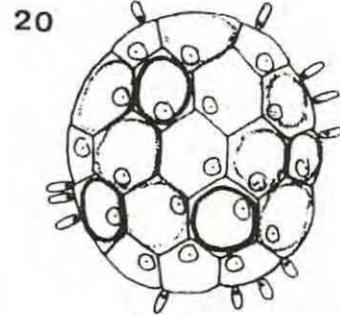
18
Precise delivery of DNA quantities; Transgenic clones from protoplasts.

Microinjection dans tissus



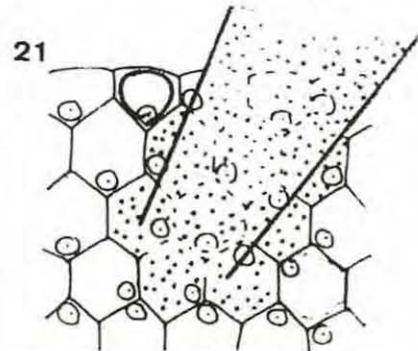
19
Transgenic chimeras at low frequency; no transgenic cereals, but promising.

Microinjection dans l'embryon



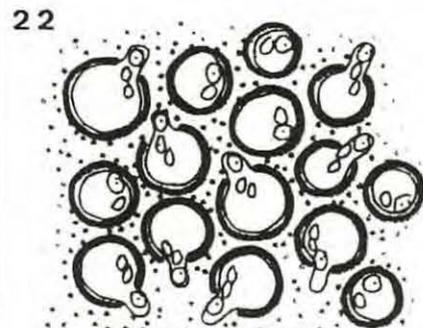
20
So far no transgenic tissue even in tobacco.

AgroTi + embryon



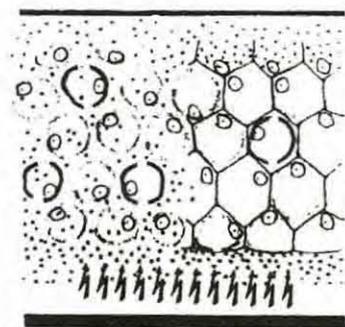
21
Injection destroys cells which receive DNA; no DNA transport to competent cells.

Macroinjection



22
Probably no uptake across pollentube wall; nucleases; no integration into sperm cells.

Incubation pollen/ADN



23
Efficient DNA transfer to protoplasts. No transport across cell walls.

Electroporation

Liste des 83 séquences extraites de la base de données d'acides nucléiques de l'EMBL (version 29) correspondant au mot clef CRUSTACEA.

Référence dans la base	descriptif	taille
ANFAA	A.nobilis 18S rRNA.	=1843 bp
AS5SRN01	Artemia ribosomal protein 5S gene 5' end.	=120 bp
ASACT205	Artemia mRNA for actin (clone pARAct205)	=1758 bp
ASACT211	Artemia mRNA for actin (clone pARAct211)	=1729 bp
ASACT302	Artemia mRNA for actin (clone pARAct302)	=1833 bp
ASACT403	Artemia mRNA for actin (clone pARAct403)	=1303 bp
ASCAATPASE	Brine shrimp mRNA for Na,K-ATPase alpha subunit (EC 3.6.1.37)	=3299 bp
ASCAATPAS	Artemia RNA for Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum	=3299 bp
ASEFF1A	Brine shrimp (Artemia) mRNA for elongation factor EF-1 alpha	=624 bp
ASEFF1A1G	Artemia salina gene for elongation factor EF-1 (alpha) exon 1	=624 bp
ASEFF1A2G	Artemia salina gene for elongation factor EF-1 (alpha) exon 2	=624 bp
ASEFF1A3G	Artemia salina gene for elongation factor EF-1 (alpha) exon 3	=624 bp
ASEFF1A4G	Artemia salina gene for elongation factor EF-1 (alpha) exon 4	=624 bp
ASEFF1A5G	Artemia salina gene for elongation factor EF-1 (alpha) exon 5	=624 bp
ASEFF1B	Artemia salina mRNA for elongation factor 1(beta)	=624 bp
ASEFF1BA	A.salina elongation factor 1-beta mRNA, complete cds.	=624 bp
ASEFF1CA	Artemia salina mRNA for ribosomal protein e12	=1208 bp
ASEFF1CB	Artemia salina mRNA for ribosomal protein e12	=1208 bp
ASGRP	A.salina glycine-rich protein mRNA, complete cds	=1208 bp
ASIGS1	Artemia ribosomal DNA type I intergenic spacer 3' region between 25S and 17S rRNA coding regions.	=277 bp
ASRASPA	Shrimp p21 ras-like protein mRNA..	=844 bp
ASRGA	Brine shrimp 5.8S ribosomal RNA gene.	=409 bp
ASRN15A	Artemia gene for 5S rRNA (pART5H-b), II	=613 bp
ASRN15B	Artemia gene for 5S rRNA (pART5H-b), I	=1428 bp
ASRN15C	Artemia gene for 5S rRNA (pART5H-a)	=1069 bp
ASRN15H	Artemia histone H1-H2B intergenic region with 5S rRNA gene	=571 bp
ASRRB	A.salina (brine shrimp) 5.8S rRNA.	=162 bp
ASRRN18A	Artemia 18S rRNA upstream region	=270 bp
ASRRN18B	Artemia 18S rRNA gene/spacer boundary and upstream spacer control region	=1779 bp
ASRRN18S	Artemia salina 18S ribosomal RNA gene	=2020 bp
ASRNA	Artemia salina 5S ribosomal RNA (complete sequence).	=120 bp
ASSATD1	Artemia salina (brine shrimp) satellite DNA, clone BMW002.	=113 bp
ASSATD2	Artemia salina (brine shrimp) satellite DNA, clone BMW003.	=113 bp
ASSATD3	Artemia salina (brine shrimp) satellite DNA, clone BMW103.	=113 bp
ASSATD4	Artemia salina (brine shrimp) satellite DNA, clone BMW115.	=113 bp
ASSATD5	Artemia salina (brine shrimp) satellite DNA, clone BMW116.	=113 bp
CFRRN285	Calanus finmarchicus DNA for 23S and 5S rRNA	=1485 bp
CMCHHM	C.maenas mRNA for crustacean hyperglycemic hormone (CHH)	=1851 bp
CSRRE	C.sapidus 18S rRNA.	=1861 bp
ESM1	Euphausia sperba initiator Met-tRNA-i	=75 bp
GLSATEXA	Land crab (G.lateralis) complex satellite DNA variant EXT (extended by a 5-fold amplification of a 142 bp segment)	=2639 bp
GLSATGL	Bermuda land crab (G.lateralis) "gc" rich satellite DNA.	=312 bp
GLSATRUA	Land crab (G.lateralis) complex satellite DNA variant RU (full length repeat units)	=2089 bp
GLSATTRV	Land crab (G.lateralis) complex satellite DNA variant TRU (truncated).	=1674 bp
GQREP1	Repetitive DNA fragment from Geryon quinquedens (crab).	=85 bp
GQRSSCA	Hermit crab (Pagurus pollicaris) major cryptic satellite very highly repeated (VHR) DNA, consensus sequence.	=156 bp
GQRSSCB	Hermit crab (Pagurus pollicaris) minor cryptic satellite very highly repeated (VHR) DNA, variant 1, consensus sequence.	=89 bp
GQRSSCC	Hermit crab (Pagurus pollicaris) minor cryptic satellite very highly repeated (VHR) DNA, variant 2, consensus sequence.	=88 bp
GQRSSCD	Hermit crab (Pagurus pollicaris) minor cryptic satellite very highly repeated (VHR) DNA, variant 3, consensus sequence.	=86 bp
GQSATEXT	Land crab extended variant (ext) satellite dna.	=1130 bp
GQSATRU	Land crab satellite dna (ru, repeat unit)	=429 bp
GQSATTRU	Land crab truncated variant (tru) satellite dna	=433 bp
HAHYPHORB	H.americanus mRNA for hyperglycemic hormone B	=218 bp
HALCP1	H.americanus mRNA for cysteine proteinase preproenzyme.	=1123 bp
HALCP2	H.americanus mRNA for cysteine proteinase preproenzyme.	=1173 bp
HALCP3	H.americanus mRNA for cysteine proteinase preproenzyme.	=1147 bp
HSYHYPHORA	H.americanus mRNA for hyperglycemic hormone A	=218 bp
MIAS01	Artemia mitochondrial 16S ribosomal RNA gene	=110 bp
MIAS02	Artemia mitochondrial ND1 gene for NADH dehydrogenase subunit (part.)	=162 bp
MIAS03	Artemia mitochondrial ND1 gene 3'end and cyt-B gene 3'end for NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome B	=369 bp
MIAS04	Artemia mitochondrial ND6 gene for NADH dehydrogenase subunit (part.)	=170 bp
MIAS05	Artemia mitochondrial ND-4L gene for NADH dehydrogenase subunit 4 (part.)	=300 bp
MIAS06	Artemia mitochondrial ND4 gene for NADH dehydrogenase subunit 4	=117 bp
MIAS07	Artemia mitochondrial ND-5 (3'end), tRNA-Phe and tRNA-Glu genes	=117 bp
MIAS08	Artemia mitochondrial ND3 gene for NADH dehydrogenase subunit (part.)	=93 bp
MIAS09	Artemia mitochondrial ND3 gene for NADH dehydrogenase subunit 3 (part.)	=93 bp
MIAS10	Artemia mitochondrial gene for cytochrome oxidase subunit III (part.)	=345 bp
MIAS11	Artemia mitochondrial ATPase 6 gene 3'region	=138 bp
MIAS12	Artemia mitochondrial ATPase 6 gene	=168 bp
MIAS13	Artemia mitochondrial COI gene for cytochrome oxidase subunit 1	=161 bp
MIAS14	Artemia mitochondrial ND2 gene for NADH dehydrogenase subunit (part.)	=249 bp
MIAS15	Artemia mitochondrial ND2 gene for NADH dehydrogenase subunit 2 (part.)	=249 bp
MIASRR16	Artemia mitochondrial 16S ribosomal RNA	=1137 bp
PA18SRRE	P.aztecus 18S rRNA.	=1902 bp
PARRE	P.ascensionis 18S rRNA.	=1874 bp
PC14BRPT	Crayfish 14bp repetitive DNA sequence	=763 bp
PKRRE	P.kadiakensis 18S rRNA.	=1877 bp
PLRRE	P.leonensis 18S rRNA.	=1862 bp
SHRRE	S.hispidus 18S rRNA.	=1885 bp
TCH1234A	Tigriopus californicus histone H1 gene, complete cds, histone H3 gene, putative cds, histone H4 gene, complete cds, and histone H2A gene, complete cds.	=7431 bp
TCH2B2A	Tigriopus californicus histone H2B-2 gene, complete cds.	=598 bp
TCH2B3A	Tigriopus californicus histone H2B-3 gene, complete cds.	=829 bp
TCH3H4	Tigriopus californicus DNA for histone H3 and histone H4	=1560 bp

ESPECES UTILISEES

Arthropodes	Embranchement	Arthropodes
Mandibulates	Sous embranchement	Mandibulates
Crustacés	Classe	Crustacés
Branchiopodes	Sous -classe	Malacostracés
Eubranchiopodes	Superordre	Eucarides
Anostracés	Ordre	Décapodes
Artemiidés	Famille	Pénéidés
<i>Artemia</i>	Genre	<i>Penaeus</i>
<i>franciscana</i> (San Francisco Bay)	Espèce	* <i>indicus</i> * <i>monodon</i> * <i>japonicus</i>

TAMPONS ET MILIEUX

Tampon de réaction PCR 10X

Tris-HCl 10mM pH 8,3
gélatine 0,01% (p/v)
KCl 50 mM
MgCl₂ 100mM

Alsever

citrate de sodium 27 mM
glucose 115 mM
NaCl 371 mM (850 mOsm final)
pH 6,9

Tampon de lavage kit ECL Amersham

urée 360 g
SDS 4 g
20X SSC 25 ml
H₂O qsp 1 litre

Bleu trypan 10X

bleu trypan 400mg + 90 ml H₂O distillée
NaCl 810 mg
K₂HPO₄ 3H₂O 78,62 mg
pH 7,2 et compléter à 100 ml

Glycogène pour précipitation d'acides nucléiques

500 mg de glycogène en poudre
diluer dans 20 ml d'eau distillée en congelant (-80°C) et décongelant 3 ou 4 fois
3 extractions au phénol (1 vol)
3 extractions au chloroforme (1 vol)
précipitation 30 min à -80°C à l'éthanol absolu (2 vol)
centrifugation
reprise du culot dans 50 ml d'eau distillée stérile et mise en aliquots stockés à -20°C

Tampon TE

Tris-HCl pH 8 10 mM
EDTA pH 8 1 mM

Tampon de lyse 5X pour luminométrie

Tris, pH 7,8 avec H₃PO₄ 125 mM
CDTA 10 mM
DTT 10 mM
glycérol 50%
Triton X-100 5%
BSA 5 mg/ml

PMSF 10 mM

Solution RF1

RbCl 100 mM
MnCl₂, 4H₂O 50 mM
acétate de potassium 30 mM
CaCl₂, 2H₂O 10 mM
glycérol 15 %
pH ajusté à 5,8 avec une solution de CH₃CO₂H 0,2 M
stérilisation par filtration sur 0,22 µm.

Solution RF2

MOPS 10 mM
RbCl 10 mM
CaCl₂ 2H₂O 75 mM
glycérol 15 %
pH ajusté à 6,8 avec NaOH
stérilisation par filtration sur 0,22 µm.

Milieu STET

Tris-HCl pH 8 10 mM
EDTA pH 8 1 mM
NaCl 100 mM
Triton X-100 5 %.

Milieu SOB liquide

bactotryptone 20 g/l
extrait de levure 5 g/l
NaCl 10 mM
KCl 0,5 mM
autoclavage 120°C 20 min
ampicilline sodique 100 mg/l filtrée sur 0,22µm et ajoutée après
autoclavage.

Milieu SOB agar

milieu SOB liquide 1000 ml
agar 12 g.

Milieu SOB pour transformation

milieu SOB liquide 1000 ml
ampicilline 100 mg/1 ml H₂O
IPTG 0,2 mM 47,6 mg/1 ml H₂O

X-Gal 80 mg/1 ml DMF

Ces solutions (sauf le X-Gal) sont stérilisées par filtration (0,22 μ m) avant d'être ajoutées au milieu SOB stérile.

Milieu LB

bactotryptone 1 %
extrait de levure 0,5 %
NaCl 100 mM.

Fixateur pour coloration X-Gal

pour 100 ml:
paraformaldéhyde 4% 50 ml
phosphate de sodium 0,1M pH 7,3 49,2 ml
glutaraldéhyde 25% 0,8 ml
+ NaCl 325 mM pour hémocytes *P. japonicus* (850 mOsm final)

Solution de coloration X-Gal

Phosphate de sodium 100 mM pH 7,3
(77 mM Na₂HPO₄, 23 mM NaH₂PO₄)
MgCl₂ 1,3 mM
K₃Fe(CN)₆ 3 mM
K₄Fe(CN)₆ 3 mM
X-Gal 1 mg/ml
+ NaCl 191,55 mM pour hémocytes *P. japonicus* (850 mOsm final)

PBS pour coloration X-Gal

Phosphate de sodium pH 7,3 15 mM
NaCl 150 mM pour cellules Sf9
ou NaCl 395 mM pour hémocytes *P. japonicus* (850 mOsm final)

Tampon d'extraction I

Tris-HCl pH 8 10 mM
EDTA pH 8 100 mM
SDS 0,5 %
ARNase pancréatique à 10 mg/ml 20 μ g/ml final

Tampon d'extraction II

Sucrose 0,32 M
Tris-HCl pH 7,6 10mM
MgCl₂ 5 mM
Triton X-100 1%
Sodium Azide 0,02 %

Tampon d'extraction III

isothiocyanate de guanidine 5M 10 ml
acétate d'ammonium 5 M 2 ml
sarkosyl 10 % 4 ml
protéinase K à 10 mg/ml 50 μ l

Solution I

Tris-HCl pH 8 50 mM
EDTA pH 8 5 mM
sucrose 25 %

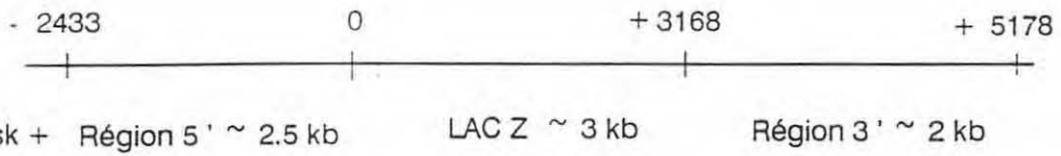
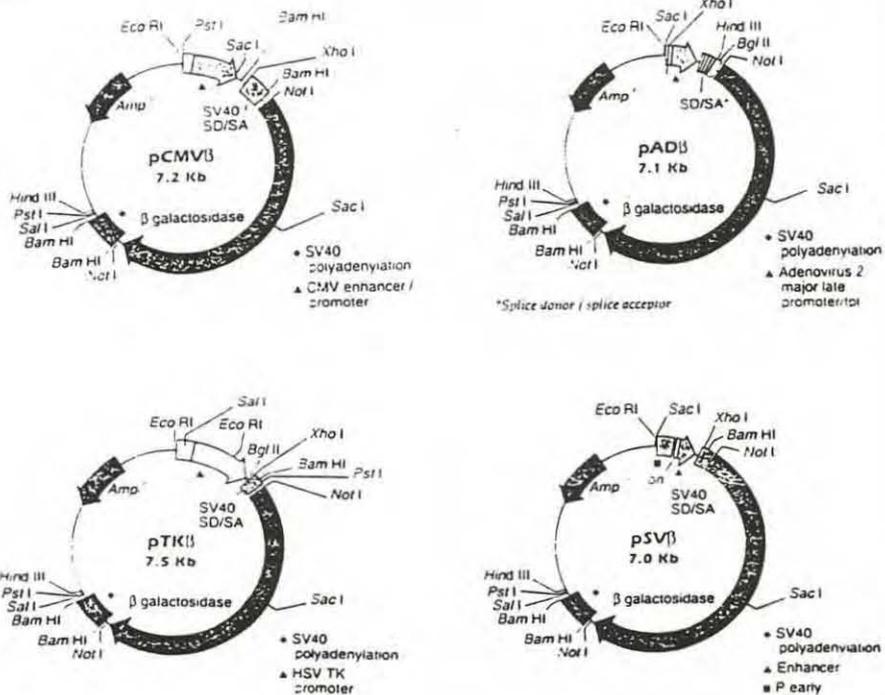
Solution II

Tris-HCl pH 8 50 mM
EDTA pH 8 5 mM
Triton-X100 5 %

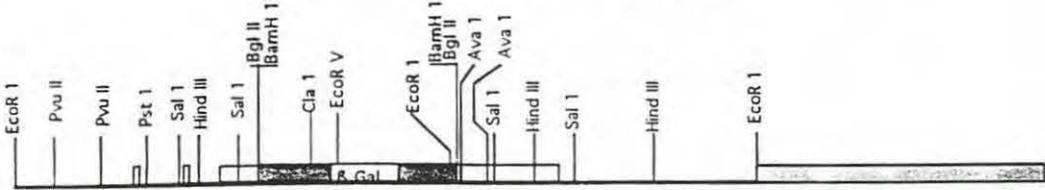
Milieux de culture des lignées cellulaires d'insectes

Drosophila melanogaster: milieu Schneider (GIBCO) + 7% SVF (GIBCO)
préalablement décomplémenté par chauffage (1h, 56°C).
Spodoptera frugiperda: milieu TC100 (GIBCO) + 7% SVF.

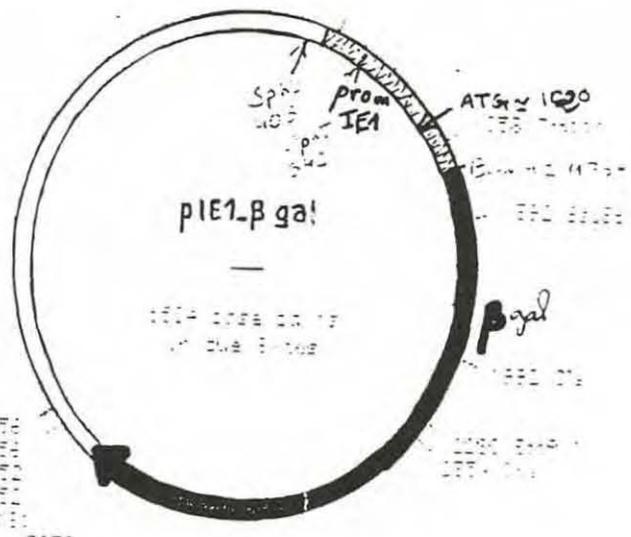
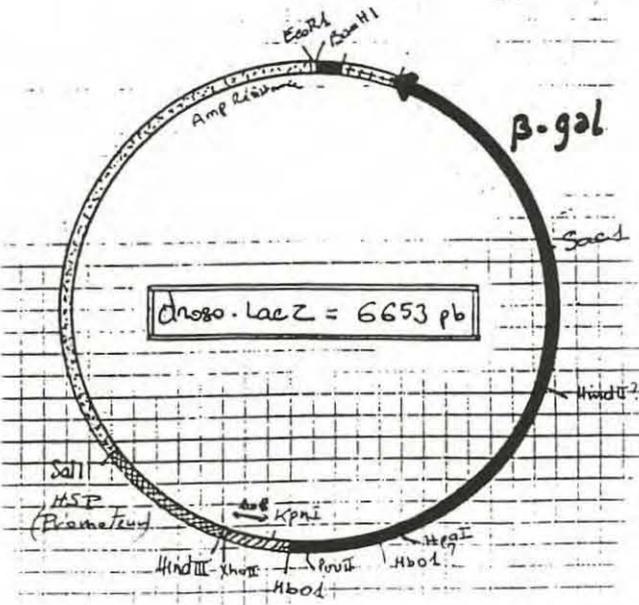
carte des plasmides utilisés comme vecteur d'expression dans des cellules de crustacés



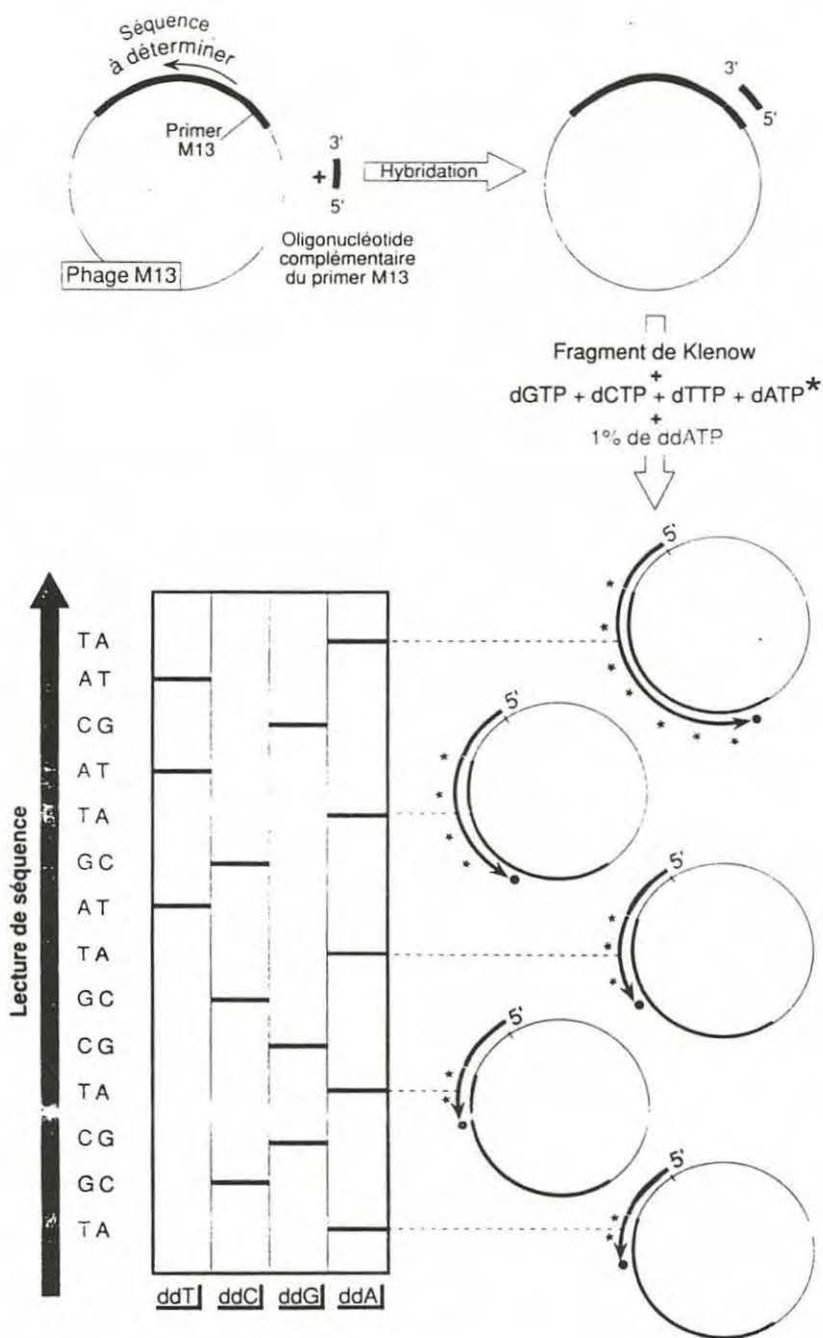
SK + - A3 LAC Z 7.6 KPB



ACTINE-BGAL-11A



Principe du séquençage d'ADN selon la technique de Sanger



MICROINJECTION OF CRUSTACEAN EMBRYOS AND TRANSIENT EXPRESSION OF INJECTED DNA

S. Gendreau*, J. M. Delecheneau, R. S. Lee, J. P. Cadoret
and E. Mialhe.

IFREMER Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins. Unité de Recherche en Pathologie, Immunologie et Génétique Moléculaire. BP 133. 17390 La Tremblade. FRANCE

key-words: microinjection, embryopathology, transgenic crustaceans, disease-resistance.

(*) To whom proofs are to be sent

ABSTRACT

Gendreau S.*, Delecheneau J.M., Lee R. S., Cadoret J. P. and Mialhe E., 1992. A detailed procedure for the microinjection of penaeid shrimp embryos (*Penaeus indicus* and *Penaeus monodon*) and brine shrimp embryos (*Artemia franciscana*): a possible new technique for crustacean pathology and genetics. A technique was developed for microinjection of penaeid shrimps, *Penaeus indicus* and *Penaeus monodon*, and of brine shrimp, *Artemia franciscana*, 1-cell and 2-cell embryos. A kinetic of early embryonic development is described and survival rates appear greatly dependant of the spawn quality (10 to 100%). Fluorescent dye and plasmids containing the bacterial β -galactosidase reporter gene were introduced into crustacean by the present microinjection protocol. A specific qualitative technique was developed for protein detection in embryonic nauplius stage. This microinjection technique may be suitable for introducing particles (e.g. spermatozoa, mitochondria, pathogens) into the embryo and for manipulating crustaceans, specially for obtention of disease-resistant strains.

INTRODUCTION

From a few decades, penaeid shrimp aquaculture has continuously grown because of numerous zootechnical improvements, specially about hatchery productions. For several penaeid species, all the rearing steps are now routinely practiced, from broodstocks which are artificially matured, to embryos hatched in hatcheries and post-larvae reared outside in ponds. Shrimp embryos are thus easily produced and consequently constitute a largely available biological material.

Among the different future fields of research on embryonic stages, the chief interests are related to pathology and genetics. Different kinds of infectious diseases are effectively known for early affecting the larval productions. The indubitably most fatal pathogens, before bacteria are viruses belonging to Baculoviridae, Parvoviridae and Picornaviridae families (Lightner, 1984). However, these viruses are relatively wrongly studied, essentially because of the lack of shrimp cell lines or any other permissive cell cultures. Like for insects, in particular hemimetaboles, whose cell lines failed to be established, an alternative well-adapted system may consist to use embryos for *in vitro* culture of pathogens (Vago and Quiot, 1982). As soon as virus replication could be demonstrated in embryos, numerous applied and fundamental researches may be intended such as diagnostic, molecular biology of viral

replication and attempts of inhibition of replication by using specific antisense oligonucleotides.

Elsewhere, from a strategical point of view, there are three basic approaches to prevent these large yield losses due to virosis in many species. Firstly, the source of virus infection could be removed by use of virus-free brooding stock or by eradication schemes. However, eradication schemes are actually never completely successful and in some species, the only available virus-free breeders come from the wild at very high cost. Secondly, attempts can be made by cultural techniques such as killing their vectors. Thirdly, pathogen-resistant varieties can be used. This latter approach is thought to be the most effective control measure in the long term. However, spontaneous pathogen-resistant individuals are not always available in a population of diseased animal and, moreover, the gene involved in the disease-resistance may be tightly linked to undesirable traits, or the resistance may be multigenic and difficult to select by conventional genetic techniques. Complementary to these approaches, generation of transgenic crustaceans, through recombinant DNA technology, will have to be considered because of its large potential in genetic control and particularly in virus resistance application. Indeed, enhanced resistances to bacterial and viral disease have already been obtained in transgenic organisms such as plants (Beachy et al., 1988 ; Cuzzo et al., 1988 ; Hemenway et al., 1988 ; Nelson et al., 1988 ; Nejidat and Beachy, 1990), mammals (Chen et al., 1988 ; Arnheiter et al., 1990), birds (Salter and Crittenden, 1989), and more recently, this approach has been considered for insect vectors (O'Brochta, 1990 ; Eggleston, 1991) and fishes (Anderson and Leong, 1991). Now, the transgenic technology must be developed for crustaceans, simultaneously with immunological and virological studies for the identification and the characterization of targeted proteins and genes. In the purpose to obtain pathogen-resistant crustacean strains, genes of particular interest are (i) immune genes coding for antimicrobial proteins such as the cecropins, magainins, dipterocins, lysozymes and hemolin (Christensen and Nappi, 1988 ; Huang et al., 1990 ; Sun et al., 1990 ; Matton and Brisson, 1989 ; Grinde, 1989 ; Dimarcq et al., 1988 ; Nakajima et al., 1987 ; Hultmark et al., 1983) to inhibit microbial infection and (ii) related viral-DNA sequences (capsid gene or antisense) to switch off the normal expression of crucial gene involved in the virus replication (Grinde et al., 1990 ; Takayama et al., 1989 ; Rezaian et al., 1988)

The development of such investigations in crustacean pathology and genetics requires the establishment of appropriate techniques for introducing foreign molecules. The microinjection technique of embryos, based on the use of a glass capillary as the vector, air pressure as the catalyst and micromanipulator to inject, is now classic in many zoological groups and is considered highly reliable and efficient.

In this paper, we describe a revised technique for microinjecting molecules, such as DNA, in the cytoplasm of crustaceans eggs/embryos. This was firstly established with *Penaeus indicus* embryos then applied to *P. monodon* embryos. Experiments were also performed with brine shrimp embryos, *Artemia*

franciscana, for its suitability for laboratory research crustacean model species and particularly in genetic studies (Sorgeloos et al., 1987).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Penaeus shrimps were ripened and induced to spawn as described in Aquacop paper (1983). The shrimps *P. indicus* were maintained in experimental tanks (3-m³ or 8-m³) without sand at the bottom and supplied with a constant 28±1°C sea water flow. The shrimps were twice daily fed alternatively with fresh mussels and maturation shrimp feed for broodstock. The photoperiod was inverted by artificial lighting (LD 12:12) in order to obtain the spawns during the day. The maturation of females was not induced by ablation of ocular peduncle but daily monitored by eye examination of ova development through the cuticle. After spawning, the subsequent development of eggs up to nauplius stage was performed under light in small 100 µm mesh net floating on circulating sea water or aerated static sea water maintained at 28°C. Slightly similar methods were used for egg and embryo obtention from the other shrimp species, *P. monodon*.

The brine shrimp embryos were obtained from commercially dormant cysts hatched within 36 h at 20±1°C in 30‰ sea water. Larvae were then raised in 2-l plastic boxes, firstly on algal diet and latter on yeasts (D'Agostino, 1980). Regarding of the ovoviviparity reproductive route, we reared the larvae under environmental factors inhibiting cyst formation (Berthelemy-Okazaki and Hedgecock, 1987). The production route of live nauplii within the uterus were obtained according to the following protocol: hatching and rearing until 8 mm juveniles were performed in 30‰, 0.22 µm, 20±1°C sterilized filtered sea water (FSW). The juveniles were then gradually acclimated to a salinity of 120‰ while water temperature was gradually lowered to 16±1°C. The culture media were completely replaced every 2-3 days, normally aerated with bubblers and maintained under a photoperiod with 24h. of light. Under binocular microscope, the gravid females were daily identified and collected for further dissection.

Recovery, preparation and culture of eggs

The ripe penaeid females were individually transferred to spawning tanks, supplied with a reduced sea water flow and specially designed for monitoring emission of newly fertilized oocytes. The females were then closely watched in order to gently collect the eggs on a 160 µm plankton mesh 8 to 10 min after spawning. At this time, the jelly coat was removed either by two successive treatments with acidified 0.22 µm FSW (30 sec. pH:4.5 and 30 sec. pH:6) or by gentle stirring of the eggs in the collecting screen for 2 min. The microinjected or control shrimp embryos were maintained in FSW.

The *A. franciscana* eggs or embryos were extracted from the incubation cavity of the females by dissection in a modified culture medium of De Chaffoy et al. (1978). Adult *A. franciscana* females were carefully washed then dissected in a sterile culture medium consisting of 20 mM HEPES (pH:7.3), 9.55 g/l sea-salts (e.g., 350 mOsm), 0.1 mg/ml bacitracine, 200 U/ml penicillin G and 4 mg/ml bovine serum albumin to avoid sticking. The manipulated or control embryos were allowed to incubate in small Petri dishes at 16±0.5°C.

Timing of shrimp embryo development

These two experiments were performed with newly spawned eggs obtained from single fertilized penaeid females, and a sample of each defined batch was fixed in formol fixative every 5 min (exp.I) or 10 min (exp.II) up to 115 min after spawning time (t_0) for further binocular observation.

Experiment I

The embryological development was described using newly fertilized eggs of *P. indicus* and *P. monodon* placed in 1-l beaker filled with aerated 28°C sea water.

Experiment II

Newly spawned eggs of *P. indicus* were distributed among six miniscreen net (100 μm) floating in 250 ml beakers (filled with $28 \pm 0.2^\circ\text{C}$ sea water to a final volume of 250 ml) respectively placed in 20-l tanks at desired lower temperatures ($26 \pm 0.2^\circ\text{C}$, $24 \pm 0.2^\circ\text{C}$, $22 \pm 0.2^\circ\text{C}$, $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$ and $18 \pm 0.2^\circ\text{C}$). A control batch was placed in a 28°C 20-l tank. When the first four-cell stage embryos appeared in the batch placed at $16 \pm 0.2^\circ\text{C}$ (table x), all the 250 ml beakers were transferred in the $28 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 20-l tank for 24 h. looking after their subsequent development up to nauplius stage. The survival rates were estimated by counting 100 individuals when hatched nauplius stage was reached in 18°C batch.

Microinjection

Manufacture of pipettes

Injection pipettes ranging in outside of about 0.5-1.0 μm tip diameter were formed with a commercial puller (Narishige, Greenvale, NY, Model PN-3) using thick-wall borosilicate capillary tubing (Clark Electrical Instruments, GC100TF-10).

Holding pipettes, made from borosilicate tubing (Clark Electrical Instruments, GC150T-10), were first manually pulled to a diameter ranging from 150 to 250 μm and broken in this section. Using a microforge (Alcatel), a straight break in the capillary was then generated by a brief fusion between the capillary and a small bead of glass previously melted onto the filament of the forge. Finally, the hole was melted until the internal diameter of the holder reached one third of the egg diameter (60-70 μm) to avoid drawing the egg into the tube.

Microinjection equipment

Chambers for microinjection were constructed from 8-compartment LabTek slide culture chambers (Nunc) by unsticking the plastic wells. Apertures were opened between wells traces corresponding to the glue traces. The embryos were placed in a drop of FSW, overlaid with paraffin oil preventing medium evaporation and reducing the rate of heat loss.

Pipettes were placed each side of an inverted microscope (Olympus IMT2) fitted with differential interference contrast optic (4x, 10x and 20x). On one side, holding pipette, controlled by three-dimensional hydrolic micromanipulator (Narishige MO202), was connected to a scuw-syringe (Alcatel) for aspirating and releasing embryos. On the other side, the injection pipette, controlled by electrical micromanipulator (Narishige MM88), was supplied in compressed nitrogen gas by a commercial microinjector (Eppendorf EC 5242).

Microinjected solutions

Dye injection

Lucifer Yellow CH (Sigma Chemical Co, Li salt, 10% in H₂O) was injected and the spread of fluorescence was observed after injection under a microscope equipped with an epifluorescent excitation beam at 540 nm.

Preparation of linear plasmid DNA molecules.

The DNA used in the microinjection experiments was a plasmid which contained the major cytomegalovirus promoter fused to the *E.coli lacZ* gene (pBR-CMV- β -gal). The structure of this construction has been described by McGregor (1989). The DNA was prepared according to standard methods as described by Sambrook et al. (1982). The DNA to be injected, linearized by digestion with the restriction enzyme *EcoRI*, was resuspended in TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) at a concentration of 0.92 μ g/ μ l (65000 copies of a 7 kb plasmid in 0.5 pl).

β -galactosidase assay

The presence of β -galactosidase enzyme in embryos was studied in order to determine whether or not the foreign genetic material was expressed in the microinjected ova. The β -galactosidase assay was carried out with an indirect immunofluorescent assay (IIFA). 9-12 h. post-fertilization, individual trisegmented stage microinjected (treatment) and not injected or TE injected (controls) embryos were quickly rinsed in distilled water to remove sea salts and placed on a histological slide. After draining water around the embryos, they were gripped with fine pliers and cautiously squashed on a histological slide of the microprint type. These cell preparations were rinsed 2 times with distilled water, and permeabilized with acetone (5 min), then overlaid with a solution of mouse monoclonal antibody specific for β -galactosidase (1 μ g/ml ; Boehringer:ref.1083104) in phosphate buffer saline (PBS ; Diagnostic Pasteur: ref. 74901) (15 min at room temperature). The slides were washed with the same buffer and incubated for 15 min with FITC-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin antiserum (Diagnostic Pasteur), diluted in the same buffer containing 0.01% Evans blue. After washing in PBS before mounting with glycerin-buffer fluid, the preparations were examined with an epifluorescent microscope.

RESULTS

Timing of events in early penaeid embryogenesis

In preliminary experiments, it was tried to place ripe *P. indicus* females in five 20-l tanks, filled with aerated sea water kept respectively at 28 \pm 0.2 $^{\circ}$ C and lowered temperatures (26 \pm 0.2 $^{\circ}$ C, 24 \pm 0.2 $^{\circ}$ C, 22 \pm 0.2 $^{\circ}$ C and 20 \pm 0.2 $^{\circ}$ C). However, it appeared that the spawning process was strongly disturbed by such thermal treatments applied on the females. Thus, in the further experiments, spawning tank temperature was maintained to 28 \pm 1 $^{\circ}$ C.

Experiment I

The timing of embryonic development of *P. indicus* and *P. monodon* had to be firstly specified in standard conditions (28 $^{\circ}$ C) in order to know exactly the time duration of early stages, available for microinjection. The early developmental stages of *P. indicus* are presented in Fig. 1 and kinetic is schematized in Fig. 2.

Experiment II

In standart conditions of temperature, first mitotic division occurs massively 30 min post-fertilization in both *Penaeus* species. In practice, this time duration was relatively short time for performing successively preparation of eggs and microinjections. A second experiment was then performed in order to find the best compromise in terms of high survival ratios and low development speed. This last criterion was all the more important as the microinjection had to be performed at 1-cell stage and because the number of these embryos which can be microinjected was directly dependant of the duration of this stage. Indeed, the *in vitro* fertilization is not an evident process for penaeid shrimps and led to work only with naturally fertilized eggs, obtained from a spontaneous spawn. The 250 ml beakers containing the batches of eggs were transferred to several tanks at different temperatures in order to avoid thermal shock and to create a reproductive decay of the incubating temperature. The timing of embryonic development at different varying temperatures and subsequent hatching ratios are presented in Fig. 3. The durations of early embryonic stages were significantly increased up to the 2-cell stage, but subsequent hatching was strongly disturbed in batches (20°C) where the 2-cell stage duration was lengthened. Regarding to this very slightly advantageous in term of time saving, further treatments and injections were performed at 28±2°C.

Development of brine shrimp embryos outside of the incubation cavity

Before to attempt to microinject *A. franciscana* embryos, a previous step consisted to experiment the conditions for external development of the embryos of this larviparous species. When extracted from the incubation cavity, the 1-cell and 2-cell embryos incubated under the conditions described in Methods, developed in nauplius. However, none were able to undergo metamorphosis. The malformation of nauplius larvae was systematically observed in *in vitro* culture unless embryos had reached the gastrula stage *in utero* at the excision time. These excised gastrula were able to develop into normal nauplii under our conditions and undergo metamorphosis.

Microinjection procedure

In preliminary experiments, the manufacture of micropipettes was considered. The shape of the hole and the internal diameter of the holder were established for a good detaining of the embryo without risk of aspiration. This last was reduced by filling the holding pipette with paraffin oil as an inert fluid before aspirating embryos.

Several assays were necessary to manufacture well-adapted microinjection needles in terms of flexibility and penetrability of their tip. As a matter of fact, the embryonic envelopes of shrimp embryos are immediately hardened after the spawn and, consequently, difficult to pierce. The parameters of the programmable micropipette puller were then established for routine-making of micropipettes suitable for embryos of all the experimented penaeid and brine shrimp embryos.

During the microinjection, the opening of the needles was frequently choked by the gel coat still surrounding the embryos. Moreover, this material had a

tendency to cause sticking of embryos on the microinstruments. Two kinds of embryo treatments were successfully tried to dejelly the eggs without disturbing the embryonic development (M&M). Finally, bovine serum albumin (BSA) was added (1%) to the sea water-based microinjection medium because this protein was proved efficient to strongly decrease the adherence of embryos to the micropipettes. In practice, the opening of the microinjection needle had to be frequently controlled under the microscope and it was sometimes necessary to increase the output of the solution by bevelling the tip against the holder.

The solution flux, controlled with the microinjector (850 to 1600 hPa), was directly observed for adjusting the injection time on the basis of precise diameter (10 μm) of an expelled drop in oil, corresponding approximately to 0.5 pl.

Microinjection of lucifer yellow

Preliminary microinjection experiments were performed with TE, the actuality of the needle introduction being visually guaranteed (Fig. 4). However, the tip of the microneedle was not visible in the cytoplasm and it was impossible to control the expulsion of the solution which had to be microinjected. The use of Lucifer Yellow fluorescent solution permitted to verify at 2-cell stage (Fig. 5A) and gastrula stage (Fig. 5B) the actuality of the ejection of the solution into the 1-cell stage. Survival rates were subsequently estimated by observable biological reactions of the zygote-implanted material following microinjection. The results are summarized in Table 1.

Analysis of embryos for β -galactosidase production

Samples prepared from penaeid embryos (not injected, TE injected and DNA injected) 9-12 h. post fertilization corresponding to the embryonic nauplius stage, were assayed for β -galactosidase presence. Whereas all the control larval tissues were negative (fig 6A), a green fluorescence was observed in several microinjected individuals only in a few cells (fig. 6B). The detectable enzyme level in the DNA injected embryos compared to controls, is presumably due to the expression of the microinjected β -galactosidase gene fragment.

DISCUSSION - CONCLUSION

Microinjection of embryos has been successfully employed in numerous zoological groups such as echinoderms (Flytzanis *et al.*, 1984 ; McMahon *et al.*, 1984), nematods (Stinchcomb *et al.*, 1985), molluscs (Serras *et al.*, 1988 ; Cadoret *et al.*, 1992), amphibians (Hitchcock *et al.*, 1980), insects (Germeraad, 1976 ; Miller *et al.*, 1987 ; Spradling and Rubin, 1982), fishes (McLean *et al.*, 1987 ; Chourrout *et al.*, 1986 ; Ozato, 1989), birds (Crittenden and Salter, 1990) and mammals such as pigs and rabbits (Massoud *et al.*, 1991 ; Iritani *et al.*, 1988) cattle (Roschlau, 1989) hamster (Yanagida *et al.*, 1991) bovine (Slavik *et al.*, 1990) and human (Gordon *et al.*, 1988). The level of sophistication being normally closely related to the size of the embryos, the microinjection procedure presently established reveals very similar to the most sophisticated ones, as described for example for echinoderms.

Despite difficulties related to hardness and stickiness of crustacean embryo envelopes, serially microinjections can be performed with the same microneedle. This point is very important because any operation of microneedle change is time consuming and limits dramatically the number of embryos which can be microinjected at a precise stage.

In practice, the chief limit for shrimp embryo microinjection is a quantitative aspect because of the speed of the embryonic development. However, this importance for 1-cell embryo microinjection had only to be considered in the experiments of genetic transformation, in order to maximise the probability of early integration of foreign DNA and reducing the risk of mosaic animal obtention. Another difficulty is linked to the dependence on more or less foreseeable spawns. Attempt for altering spawning time by different temperature of the spawning water failed and strongly disturbed the spawning process. A very significative improvement would be to become able to routinely perform *in vitro* fertilization, like it is the common case with marine bivalve molluscs (Gendreau and Grizel, 1990), and since this has yet been proved feasible for *P. aztecus* (Clark, 1973). Thus, the time and the duration of microinjection experiments could be respectively chosen and lengthened.

For brine shrimp, the development *in utero* of the embryos makes the experimental work more delicate since females dissections must be previously performed, but the easy permanent availability of gravid females in small aquaria partially compensates this difficulty. However, because of the failure of external development of embryos collected at early stages, microinjection can only be performed from 4-cell or 8-cell stages.

The establishment of a microinjection procedure for crustacean embryos was essentially owing to its applications in infectious pathology and gene transfer.

Crustacean pathology is chiefly related to viruses and the microinjection procedure described in this paper may strongly modify virological studies since 1-cell embryos or blastomeres can be directly injected with virus suspensions. In that respect, it may be noticed that microinjection can be performed on a relatively large number of embryos, since non necessarily limited to the 1-cell stage. The delivered volumes of approximately 0.5 pl are sufficient for injecting viruses from high titer suspensions. The undifferentiated state of the early embryonic cells may be advantageous in term of permissiveness to viruses, but the chief interest of using embryos as host cellular system consists in their subsequent perfect development and, consequently, the normal metabolism and functions of their cells. This feature is particularly important to underline and to compare with infections of primary cultures of shrimp cells from dissociated organs which were tried for supporting replication of viruses (Hu, 1990). Indeed, like for marine bivalve molluscs (Mialhe et al., 1988), such primary cultures are difficult to prepare without microbial contamination and another chief limitation concerns the metabolic activity of these *in vitro* maintained cells, which are never able to divide and quickly degenerate (Ellis, 1987).

Such an embryonic cellular system is also theoretically particularly suitable for studying the virus replication according to the cell differentiation as well as transovarial transmission. Indeed, epidemiological data from hatcheries suggest that vertical transmission is possible for several kinds of shrimp viruses belonging to virus families where such a transmission has yet been suspected (Bell and Lightner, 1984).

Evidence of microinjection procedure of *P. monodon*, initially established for *P. indicus*, is particularly interesting since *P. monodon* is sensitive to a *Baculovirus*, involved in recent dramatic epidemics in South East Asia (Chen, 1990). Moreover, the lack of any modification of the microinjection procedure for applying to another shrimp species may indicate that it will be largely suitable for other economically important shrimp species which also suffer viral diseases (Lightner, 1984).

As yet proved for several kinds of pathogens of insects (Quiot and Vago, 1983), it may be hoped that embryocultures will permit replication of crustacean viruses, or other intracellular pathogens, and thus will constitute an alternative to bypass the lack of cell lines.

Such an alternative would immediately open the way to researches on the inhibition of virus replication by specific complementary oligonucleotide antisense sequences (Crum et al., 1988 ; Leiter et al., 1989). Indeed, simultaneously with the virus microinjection, some determined antisense sequences could be easily, directly and massively introduced using modified oligonucleotides (Hélène et al., 1989). This is a very well-adapted methodology for identifying sequences which could be used for antisense strategy and extrapolated to transgenic organisms (Van der Krol et al., 1988 ; Grumet, 1990). Transgenic technology represents the other field of interest for embryo microinjection. As a matter of fact, shrimp productions are now an essential part of world aquaculture, but the steadiness and durability of this activity depends, on one hand on the development of prophylactic measures of the infectious diseases, based on zootechnical improvements, diagnostic techniques developments (Mialhe et al., in press) but also on selection of resistant strains. Among the different possible strategies of research for resistance selection in crustaceans, gene transfer presents potential advantages known from data acquired from transgenic plants (Yamaya et al., 1988 ; Mc Cown et al., 1991) and vertebrates (Chen et al., 1988) and yet considered for insects (Eggleston, 1991). Indeed, genetically engineered virus resistant strains is possibly obtained by expressing viral genes or sequences which could be previously identified, isolated and cloned. Heterologous immune genes, known in other groups such as insects, are also candidates for gene transfer (Jaynes et al., 1987), that is a very promising alternative for shrimps for which the knowledge of defense mechanisms are quite limited compared to other arthropods (Boman and Hultmark, 1987 ; Johansson and Soderhall, 1989), and so there will be a long work to identify and isolate homologous immune or resistance genes in these species.

The suitability of this microinjection procedure for 1-cell shrimp embryo is to notice with regard to genetic transformation in so far as it lies within a

larger probability of early DNA integration. However, the number of embryos which were possibly injected at this stage being extremely limited, it will be necessary to also experiment 2-cell and 4-cell stage embryos and to consider that eventual transgenic animals would be mosaic. This may not be a major limitation if germ line cells are transformed (Petitte *et al.*, 1990).

The good survival rates of microinjected penaeid and brine shrimp embryos are an advantageous feature of this procedure for genetic transformation experiments. Taking into account the low transformation frequencies generally observed after DNA microinjection (Inoue, 1991), it will be necessary to develop programs on crustacean transgenesis, either in countries where shrimp hatcheries produce year in year out, or in laboratories with brine shrimp rearing fittings.

At short term, microinjection will be very useful for analysing the transitory expression of reporter genes under the control of heterologous promoters which have yet been proved efficient in other groups of animals (Tamura *et al.*, 1990). The preliminary results presented in this paper suggest that promoter of cytomegalovirus work in crustacean embryos by inducing the transcription process of *lacZ* gene with a subsequent production of β -galactosidase. In effect, control squashes have been carefully analysed versus experimental squashes because of spontaneous galactosidase activity reported in some animal tissues, for instance in the intestinal cells of fish embryos. Thus, the expression seems to be mosaic and may well be transient. For ulterior transient expression assay, other reporter genes such as luciferase and chloramphenicol acetyl transferase will be used in our laboratory as supercoiled plasmids as a potentially more replicative form of plasmid after injection (Tamura *et al.*, 1990).

At more long term, this microinjection procedure could be modified for specific alteration of the crustacean genome by re-injection of genetically altered embryonic cells (blastomeres) into blastula where they could colonize all tissues of animals. Such a procedure, currently practised for increasing frequency of chimeric embryos giving rise to transgenic offspring and thus transformation rate (Nilson and Cloud, 1989 ; Gossler *et al.*, 1986), would be particularly suitable for the same aims in crustaceans. Another method, the electroporation, has been recently applied to marine embryos (Inoue, 1991) and will have also to be experimented for DNA introduction directly into the treated embryos or in the sperm cells as vectors (Gagné *et al.*, 1991 ; Müller *et al.*, 1991) because high number of eggs can be quickly treated at the same time.

In other respects, this evolution of researches in genetics of *A. franciscana* and penaeid species would be furthered by the possibility to microinject embryonic stages with different kinds of molecules such as proteins (purified proteins, Minden *et al.*, 1989 ; antibodies, Petrey *et al.*, 1989), oligonucleotides (Smith *et al.*, 1990) ; RNA (messenger, oligonucleotides antisense, Jesus *et al.*, 1988), egg activation substances (Crossley *et al.*, 1988), carcinogens (Metcalf and Sonstegard, 1984), tracers (various fluorescent dyes, Gimlich and Braun, 1985 ; enzyme, Nishida and Satoh, 1983) or organites (mitochondria, Matsuura *et al.*, 1990).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by SANOFI-AQUACULTURE Grant and by IFREMER. The authors are indebted to J.P. Ozil, M. Massoud, M.G. Stinnakre, N. Bordas, J. Jami, D. Bucchini, M.-A. Ripoche and P. Loes for technical advice. We thank Dr J.-A. Lepesant for helpfull discussions, and Dr. N. McLean for his critical reading of the manuscript. We acknowledge Dr McGregor for providing CMV-lacZ construct and teams of IFREMER Brest and IFREMER Tahiti who maintained ripened penaeids.

REFERENCES

- Anderson, E.D. and Leong, J.C. (1991). Reduction of IHN induced CPE by transgene expression of the nucleocapsid gene. Poster presented at the International Marine Biotechnology Conference, 13-16 October 1991, Baltimore, USA.
- Aquacop (1983). Constitution of broodstock, maturation, spawning and hatching systems for penaeid shrimps in the centre oceanologique du pacifique. In: Handbook of mariculture, vol.1. J.P. McVey (eds.), 1: 104-121.
- Arnheiter, H., S., Skuntz, S. and Noteborn, M. (1990). Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus. *Cell*, 62: 51-61.
- Beachy, R. N., Stark D. M., Deom C. M., Oliver M. J. and Fraley R. T. (1987). Expression of sequences of tobacco mosaic virus in transgenic plants and their role in disease resistance. In: G. Bruening, J. Harada, T. Kosuge and A. Hollaender (Editors), Tailoring Genes for Crop Improvement, pp. 169-180.
- Berthélémy-Okazaki, N.J., and Hedgecock, D. (1987). Effect of environmental factors on cyst formation in the brine shrimp *Artemia*. In: *Artemia Research and its Applications*. Vol. 3, 167-182.
- Boman, H. and Hultmark, D. (1987). Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.*, 41: 103-26.
- Cadoret, J.P., Delecheneau, J.M., Gendreau, S. and Mialhe, E., 1992. Protocols for microinjection of 1-cell embryos of bivalve molluscs and for detection of injected molecules. Submitted to *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*
- Chen, L.C. (1990). Aquaculture in Taiwan. In: Fishing news books, Blackwell Sci. Pub., ISBN:0-85238-165-4, oltr277.
- Chen, X. Z., Yun, J. S. and Wagner, T. E. (1988). Enhanced viral resistance in transgenic mice expressing the human beta 1 interferon. *J. of Virology*: 62: 3883-3887.
- Chourrout, D., Guyomard, R. and Houdebine, L. M. (1986). High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri* rich.) by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture*, 51: 143-150.
- Christensen, E. M. and Nappi, A. J. (1988). Immune responses of arthropods. In: *ISI Atlas of Sciance, Animal and Plant Science*, 15-19.

- Clark, W. H., Talbot, P., Neal, R. A., Mock, C. R. and Salser, B. R. (1973). *In vitro* fertilization with non-motile spermatozoa of the brown shrimp *Penaeus aztecus*. *Marine Biology*, 22: 353-354.
- Crittenden, L.B. and Salter, D.W. (1990). Expression of retroviral genes in transgenic chickens. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 41: 163-171.
- Crossley, I., Swann, K., Chambers, E. and Whitaker, M. (1988). Activation of sea urchin eggs by inositol phosphates is independent of external calcium. *Biochem. J.*, 252: 257-262.
- Crum, C., Johnson, J. D., Nelson, A. and Roth, D. (1988). Complementary oligodeoxynucleotide mediated inhibition of tobacco mosaic virus rna translation *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, 16: 4569-4581.
- Cuozzo, M., O'connell, K. M., Kaniewski, W., Fang, R. X., Chua, N. H. and Tumer, N. E. (1988). Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Biotechnology*, 6: 549-557.
- D'agostino, A. (1980). The vital requirements of *Artemia*: physiology and nutrition. *The Brine Shrimp Artemia*, 2: 55-82.
- De Chaffoy, D., De Maeyer-Criel, G. and Kondo, M. (1978). On the permeability and formation of the embryonic cuticle during development *in vivo* and *in vitro* of *Artemia salina* embryos. *Differentiation*, 12: 99-109.
- Dimarcq, J. L., Keppi, E., Dunbar, B., Lambert, J., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Rankine, S. M., Fothergill, J. E. and Hoffmann, J. A. (1988). Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipteracin A. *Eur. J. Biochem.*, 171:17-22.
- Eggleston, P., (1991). The control of insect-borne disease through recombinant DNA technology. *Heredity*, 66: 161-172.
- Ellis, L. L. (1987). Mitotic activity of oyster cell cultures supplemented with embryo extracts and liposomes. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 23: 39A, abstract.
- Flytzanis, C. N., McMahon, A. P., Hough-Evans, B. R., Katula, K. S., Britten, R. J. and Davidson, E. H. (1984). Gene transfer in the sea urchin. In: *Molecular Biology of Development*, A. R. Liss (ed.), 621-532.
- Gagne, M., Pothier, F. and Sirard, M. (1991). Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign dna in oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 29: 615.
- Gendreau, S. and Grizel, H. (1990). Induced triploidy and tetraploidy in the european flat oyster, *Ostrea edulis* l. *Aquaculture*, 90: 229-238.
- Germeraad, S. (1976). Genetic transformation in drosophila by microinjection of DNA. *Nature*, 262: 229-231.
- Gimlich, R.L. and Braun, J. (1985). Improved fluorescent compounds for tracing cell lineage. *Dev. Biol.*, 109: 509-514.

- Gordon, J.W., Grunfeld, L., Garrisi, G.J., Talansky, B.E., Richards, C. and Laufer, N. (1988). Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertility & Sterility*, 50, (1): 68-73.
- Grinde, B., Hungnes, O. and Tjotta, E. (1990). Modified oligopeptides designed to interact with the HIV-1 proteinase inhibit viral replication. *Arch. Virol.*, 114: 167-173.
- Grumet, R. (1990). Genetically engineered plant virus resistance. *Hort Science*, 25: 508-513.
- Helene, C., Thuong, N.T., Behmoaras, T.S. and Francois, J.CH. (1989). Sequence specific artificial endonucleases. *Trends In Biotechnology*, 7: 310-315.
- Hemenway, C., Fang, R. X., Kaniewski, W. K., Chua, N. H. and Tumer, N. E. (1988). Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus x coat protein or its antisense rna. *The EMBO J.*, 7: 1273-1280.
- Hitchcock, M. J. M., Ginns, E. I. and Marcus-sekura, C. J. (1987). Microinjection into *Xenopus* oocytes: equipment. In: *Methods In Enzymology*: 152, Chap. 28: 276-289.
- Hu, K., Liping, W. and Yumei, D. (1990). Studies on a cell culture from the hepatopancreas of the oriental shrimp, *Penaeus orientalis* kishinouye. *Asian Fisheries Science*, 3: 299-307.
- Huang, C.M., Chen, H.C. and Zierdt, C.H. (1990). Magainin analogs effective against pathogenic protozoa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34: 1824-1826.
- Inoue, K. (1991). Expression of reporter genes introduced by microinjection and electroporation in fish embryos and fry. Communication presented at the International Marine Biotechnology Conference, 13-16 October 1991, Baltimore, USA.
- Iritani, A., Utsumi, K., Miyake, M., Hosoi, Y. and Saeki, K. (1988). *In vitro* fertilization by a routine method and micromanipulation. In H. Jones, C. Schrader (eds): "In vitro fertilization and other assisted reproduction". *Ann. New York Acad. Sci.*, 541: 583-590.
- Jaenisch, R. (1988). Transgenic animals. *Science*, 240: 1468-1474.
- Jaynes, J. M., Xanthopoulos, K. G., Destefano-beltran, L. And Dodds, J. H. (1987). Increasing bacterial disease resistance in plant utilizing antibacterial genes from insects. *Bioessays*, 6: 263-270.
- Jessus, C., Cazenave, C., Ozon, R. and Helene, C. (1988). Specific inhibition of endogenous tubulin synthesis in *xenopus* oocytes by anti-messenger oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Research*, 16: 2225-2233.
- Johansson, M. W. and Soderhall, K. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today*, 5: 171-176.
- Leiter, J. M. E., Krystal, M. and Palese, P. (1989). Expression of antisense rna fails to inhibit influenza virus replication. *Virus Research*, 14: 141-160.

- Lightner, D. V. (1984). A review of the diseases of cultured penaeid shrimp and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. In Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Schrimps, Iloilo City, Philippines, pp 79-103.
- Matsuura, E.T., Chigusa, S.I. and Niki Y. (1990). Differences in the modes of transmission of foreign mitochondrial DNA in heteroplasmic lines for intra and interspecific combinations in *drosophila melanogaster*. Japanese J. Genet., 65: 87-93.
- Matton, D.P. and Brisson, N. (1989). Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis related gene transcripts of potato. Molecular Plant-microbe Interactions, 2: 325-331.
- McCown, B. H., McCabe, D. E., Russell, D. R., Robison, D. J., Barton, K. A. and Raffa, K. F. (1991). Stable transformation of populus and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. Plant. Cell. Rep., 9: 590-594.
- McGregor, G. R., Nolan, G. P., Fiering, S., Roederer, M. and Herzenberg, L. A. (1989). Use of *E. coli* LacZ (β -galactosidase) as a reporter gene. In: Methods in Molecular Biology, E.J. Murray, J. M. Walker (eds.), Humana Press, Chifton, N. J., U. S. A.
- McLean, N., Penman, D. and Zhu, Z. (1987). Introduction of novel genes into fish. Biotechnology, 5: 257-261.
- McMahon, A. P., Novak, T. J., Britten, R. J. and Davidson, E. H. (1984). Inducible expression of a cloned heat shock fusion gene in sea urchin embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 7490-7494.
- McVey, J.P. and Moore, J.R. (1983). CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture. CRC series in Marine Science. ed. McVey and Moore, CRC press:1, ISBN 084930220x, 1tr00266, 442p.
- Metcalfe, C.D. and Sonstegard, R.A. (1984). Microinjection of carcinogens into rainbow trout embryos: an *in vivo* carcinogenesis assay.. J.N.C.I., 73:1125-1132.
- Mialhe, E., Boulo, V. and Grizel, H. (1988). Bivalve mollusc cell culture. Amer. Fish. Soc., 18: 311-315.
- Mialhe, E., Boulo, V., Bachere, E., Hervio, D., Cousin, K., Noel, D., Noel, T., Orhesser, M., Le Deuff, R. M. and Gendreau, S.. Development of new methodologies for diagnostic of infectious diseases in molluscs and shrimp aquaculture. Aquaculture, in press.
- Miller, L. H., Sakai, R. K., Romans, P., Gwadz, R. W., Kantoff, P. and Goon, H. G. (1987). Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *anopheles gambiae*. Science, 237: 779-781.
- Minden, J.S., Agard, D.A., Sedat, J.W. and Alberts, B.M. (1989). Direct cell lineage analysis in *drosophila melanogaster* by time-lapse, three-dimensional optical microscopy of living embryos. J. Cell Biol., 109: 505-516.

- Müller, F., Ivics, Z., Erdelyi, I., Varadi, L., Horvath, L., MacLean, N. and Orban, L. (1991). Introducing foreign genes into fish eggs using electroporated sperm as a carrier. Poster presented at the International Marine Biotechnology Conference, 13-16 October 1991, Baltimore, USA.
- Nejdat, A. and Beachy, R.N. (1990). Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 3: 247-251.
- Nelson, R. S., McCormick, S. M., Delannay, X., Dube, P., Layton, J., Anderson, E. J., Kaniewska, M., Proksch, R. K., Horsch, R. B. and Rogers, S. G. (1988). Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Biotechnology*, 6: 403-409.
- Nilsson, E. and Cloud, J.G. (1989). Production of chimeric embryos of trout (*Salmo gairdneri*) by introducing isolated blastomeres into recipient blastulae. *Biol. Reprod.*, 40: p. 109, abstract.
- Nishida, H. and Satoh, N. (1983). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. *Dev. Biol.*, 99: 382-394.
- Obrochta, D.A. (1990). Genetic transformation and its potential in insect pest control. *Bull. Entomol. Res.*, 80: 241-244.
- Ozato, K., Inoue, K. and Wakamatsu, Y. (1989). Transgenic fish: biological and technical problems. *Zoological Science*, 6: 445-457.
- Pachmann, K. (1987). *In situ* hybridization with fluorochrome-labeled cloned DNA for quantitative determination of the homologous mRNA in individual cells. *J. Mol. Cell. Immunol.*, 3: 13-19.
- Petitte, J.N., Clark, M.E., Liu, G., Gibbins, A. M. V. and Etches, R.J. (1990). Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development*, 108: 185-189.
- Petrey, D., Buster, D., Donato, K.K. and Anderson, H. (1989). Injection of antibodies into grasshopper eggs as a method for studying embryonic development. *Develop. Growth and Differ.*, 31: 299-305.
- Quiot, J. M. and Vago, C. (1983). Infection expérimentale d'embryocultures de lépidoptères par des baculovirus de polyhédroses nucléaires. *C. R. Soc. Biol.*, 177: 657-662.
- Rezaian, M. A., Skene, K. G. M. and Ellis, J. G. (1988). Anti-sense RNAs of cucumber mosaic virus in transgenic plant assessed for control of the virus. *Plant Molecular Biology*, 11: 463-471.
- Roschlau, K (1991). Gene transfer studies in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 43: 293-295.
- Salter, D. W. and Crittenden, L. B. (1989). Artificial insertion of a dominant gene for resistance to avian leukosis virus into the germ line of the chicken. *Theor Appl Genet*, 77: 457-461.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, laboratory manual*. 2nd edit., vol. 1, 2 and 3, C. S. H. Laboratory Press, U. S. A.

- Serras, F., Buultjens, T. E. J. and Finbow, M. E. (1988). Inhibition of dyecoupling in *patella* (mollusca) embryos by microinjection of antiserum against nephrops (arthropoda) gap junctions. *Experimental Cell Research*, 179: 282-288.
- Slavik, T., Pavlok, A. and Fulka, J. (1990). Penetration of intact bovine ova with ram sperm *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 25: 345-347.
- Smith, R.C., Bement, W.M. and Dersch, M.A. (1990). Nonspecific effects of oligodeoxynucleotide injection in *Xenopus* oocytes: a reevaluation of previous d7 mRNA ablation experiments. *Development*, 110: 769-77.
- Stinchcomb, D. T., Shaw, J. E., Carr, S. H. and Hirsh, D. (1985). Extrachromosomal DNA transformation of *caenorhabditis elegans*. *molecular & cellular biology*, 5: 3484-3496.
- Sun, Sc., Lindstrom, I., Boman, Hg., Faye, I. and Schmidt, O. (1990). Hemolin - an insect- immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science*, 250: 1729-1732.
- Takayama, K. M., Kuriyama, S., Weiss, S., Chada, K., Inouye, S. and Inouye, M. (1989). Antisense RNA-mediated inhibition of viral infection in tissue culture and transgenic mice. *Molecular Biology of RNA*, 299-310.
- Tamura, T., Kanda, T., Takiya, S., Okano, K. and Maekawa, H. (1990). Transient expression of chimeric CAT genes injected into early embryos of the domesticated silkworm *Bombyx mori*. *Jpn. J. Genet.*, 65: 401-410.
- Van Der Krol. (1988). Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques*, 6: 958-975.
- Yamaya, J., Yoshioka, M., Meshi, T., Okada, Y. and Ohno, T. (1988). Cross protection in transgenic tobacco plants expressing a mild strain of tobacco mosaic virus. *Mol Gen Genet*, 215: 173-175.
- Yanagida, K., Yanagimachi, R., Perreault, S.d. and Kleinfeld, R.G. (1991). Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biol. Reprod.*, 44: 440-447.

FIGURES

Fig. 1. Embryonic development of *Penaeus indicus*.

- A. Jelly layer formation.
- B. Extrusion of the first and second polar bodies (pb) in the perivitelline space (ps) and hatching envelope (he) formation.
- C. Two-cell stage.
- D. Newly hatched nauplius.

Fig. 2. Events in early *Penaeus indicus* embryogenesis at 28°C.

Fig. 3. Embryological development-time temperature-dependant in *Penaeus indicus* (18°C to 28°C) and *Penaeus monodon* (28°C).

X-abcisse represents observation time post-spawning (10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 70, 80, 90 and 100 min).

Y-abcisse represents percentage of embryos.

* Missing value

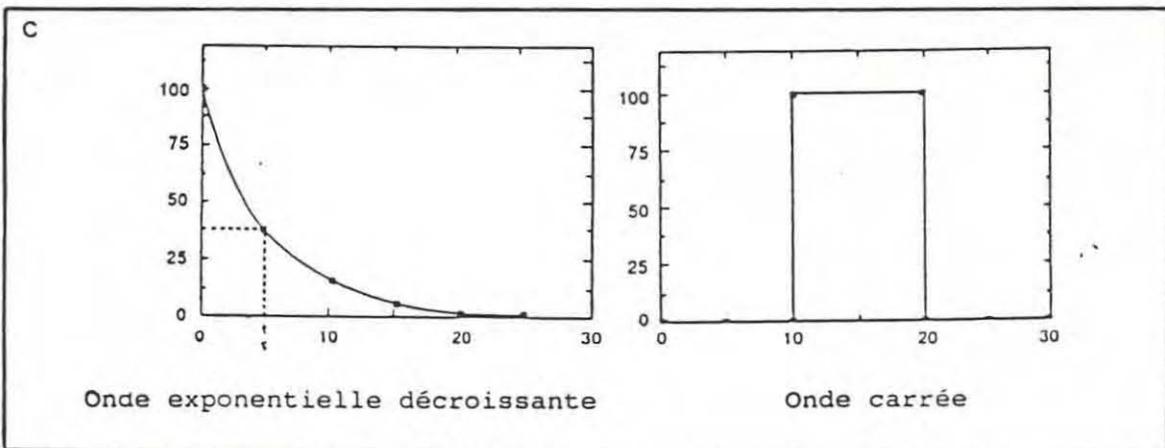
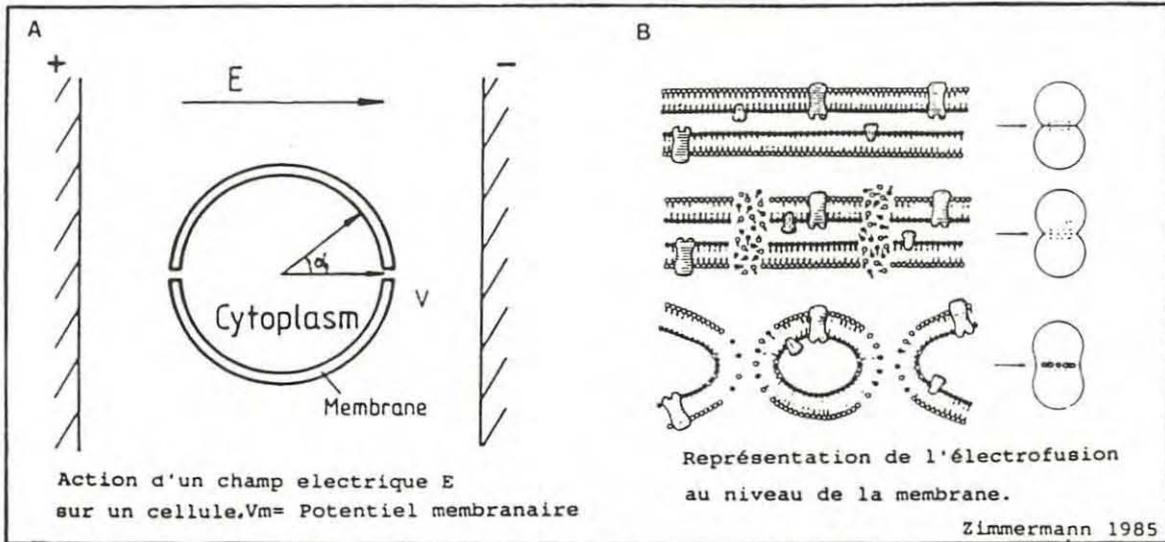
Fig. 4. Microinjection procedure with the holding pipette (hp) maintaining a newly fertilized *Penaeus indicus* embryo and injection microneedle (im).

Fig. 5. *Penaeus indicus* 1-cell embryos injected with Lucifer Yellow and observed at 2-cell and 4-cell stage (A) at gastrula stage (B).

Fig. 6. Immunological assay of β -galactosidase presence on squashed *Penaeus indicus* embryonic nauplius. (A) control TE-injected or not-injected. (B) linearized plasmid (CMV-lacZ) injected at 1-cell stage.

TABLES

Table 1. Survival of microinjected 1-cell and 2-cell crustacean embryos, *Penaeus indicus* (P.i.) and *Penaeus monodon* (P.m.).



TRANSIENT EXPRESSION OF LUCIFERASE REPORTER GENE AFTER BIOLISTIC INTRODUCTION
INTO ARTEMIA FRANCISCANA (CRUSTACEA) EMBRYOS.

Sylvain GENDREAU (1), Vinca LARDANS (2), Jean-Paul CADORET (1) and
Eric MIALHE (1,2)

(1) IFREMER, Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins, Unité
de Recherches en Pathologie, Immunologie et Génétique Moléculaire

BP 133, 17390 La Tremblade, France

(2) National Institutes of Health, NIAID, Laboratory of Malaria Research,
Bethesda, MD, 20892, USA.

ABSTRACT

According to the biolistic process, *Artemia* embryos were bombarded with high velocity gold microparticles coated with circular plasmid DNA. This plasmid contains sequences of luciferase reporter gene placed under the control of *Drosophila* hsp 70 promoter. Biolistic parameters were optimized in terms of embryo survival and luciferase transient expression. The data indicate that biolistic is suitable with crustaceans to study promoter efficiency and to undertake experiments of genetic transformation.

INTRODUCTION

In aquaculture, more and more research is currently directed towards infectious diseases, genetics and particular aspects of physiology.

A promising approach based on genetic transformation has been developed for understanding these processes in fish. Transgenic fish of several species have been produced with the integrated genetic material expressed in several instances (Fletcher and Davies, 1991). Current procedures for introduction of DNA into fish eggs require time-consuming microinjection techniques. Recently, the biolistic technique (Sanford, 1988) was applied for the delivery of foreign DNA into fertilized eggs (Zelenin et al., 1991). This process employs high velocity DNA-coated microprojectiles. The primary benefit of this method is the possibility of delivering DNA directly into embryo nuclei and thereby limiting the cytoplasmic DNA degradation. Another potential advantage of this technique is to simultaneously transfect DNA into a large number of eggs. The biolistic technique could have broad application for the development of transgenic fish.

Genetic transformation of invertebrates economically important for aquaculture is yet at a preliminary stage limited to the establishment of procedures for microinjection of shrimp (Gendreau, pers. comm.), oyster or mussel embryos (Cadoret, pers. comm.). Because of the limited number for injected embryos, transient expression of microinjected DNA is difficult to analyse. Furthermore, microinjection appears unsuitable for the development of transgenic animals because of the low integration rate of the exogenous DNA. Electric treatment of embryos (Cadoret, 1992) may be a better-adapted process for the introduction of DNA into large numbers of embryos. However, using this technique, the transfected DNA may be exposed to the action of cytoplasmic nucleases. In this context, the biolistic technique would be considered for the transfection of marine invertebrates embryos as well as fish. Support for this idea comes from previous studies with insect embryos which have demonstrated

successful introduction and transient expression of the exogenous DNA (Baldarelli and Lengyel, 1991; Mialhe et al., 1992).

Biolistic experiments have been undertaken on the *Artemia* brine shrimp because availability and ease of working with the embryonic cyst stages. *Artemia* species are a valuable model for genetic transformation because of the increasing availability of genetic informations and its overall importance in aquaculture as a food supply. Considerations is presently being given to the transfer of genes coding for antimicrobial or hormonal proteins.

This paper reports the characterization and the optimization of biolistic parameters allowing transient expression of luciferase reporter gene placed under the control of the promoter of *Drosophila* heat shock proteins (hsp 70).

MATERIALS AND METHODS

Artemia cysts and embryos

Artemia franciscana cysts (San Francisco Bay strain) are commercially available in aquariology shops. Some experiments were carried out with partially dechorionated cyst (). Several experiments were performed with 20 hour-old embryos protruding from the cyst. Before the bombardment, cysts or embryos (about 3000 to 10000) were placed on a disk of Whatman paper inside a 1-inch circle. The bombarded cysts or embryos were kept until heat stress application (12 to 48 hours) on the disk wet with an antibiotic solution (penicillin, 10000U/ml; ampicillin, streptomycin and kanamycin, 10 mg/ml; dilution in reconstituted sea water). Survival rates were estimated 24 hours after bombardment by examination under binocular microscope. At this time, the cysts or the embryos were heat-shocked (41°C, 30-60 min) and then kept for 2 hours at 27°C before to be washed once with the antibiotic solution, then with distilled water and finally processed for luciferase assay.

Preparation of DNA-coated microprojectiles

Biolistic transfection experiments were performed with plasmid pDrLuc constructed and given by N. Guyen (Institut Pasteur, France). This plasmid contains the luciferase reporter gene placed under the control of the *Drosophila* promoter for gene of 70 kD heat shock protein (hsp 70). Plasmid DNA was prepared using the Qiagen kit for DNA maxi-prep. After extraction and precipitation, the DNA was resuspended in T.E. buffer (Tris, ; EDTA, ; pH=7.9) at a final concentration ranging from 1 to 3 µg/µl.

Gold microparticles 1 µm in diameter were coated with plasmid DNA according to the protocol of Sandford et al (). Finally, 10 µg of DNA added to 1 mg of gold particles were taken per shot.

Bombardment

The biolistic experiments were performed with the particle delivery system PDS1000/He supplied by Bio-Rad. The biolistic technology, with a special emphasis on the parameter analysis related to PDS1000/He, has been recently reviewed by Sandford et al. (). Several biolistic parameters were arbitrarily selected on the basis of previous studies for transfection of mosquito embryos (). The vacuum inside the biolistic enclosure was 18". The distance between the rupture disk and the launch assembly was 9 mm. The distance between the macrocarrier and the stopping screen was also 9 mm. On the other hand, the parameters the most influential on particle velocity were investigated and optimized: rupture disks (450, 650, 900, 1100, 1550, 1800 psi); distance (D) between the stopping screen and the sample (35, 65, 95, 125 mm).

Analysis of luciferase activity

The activity of luciferase was detected using the kit of Promega (E1500), the assay being performed according to the protocol recommended by the supplier.

The washed cyst or embryo samples were disrupted with a Dounce homogeneizer in lysis buffer. This last was added with BSA (1mg/ml) and PMSF (2 mM) which was proved efficient to protect luciferase from endoproteases. The analyzes were made with a LKB 1215 luminometer using the continuous record mode and a delay of 5 secondes. When this mode is used, the instantaneous light output is measured and recorded, the results being given in mV. The values measured for control samples (distilated water, lysis buffer, homogenate of non-bombarded embryos) were around 0.250 mV. Based on serial dilutions of a solution of luciferase, specific activities were considered for measured values superior to 0.300 mV.

RESULTS

Bombardments of dechorionated cysts

Two series of cyst bombardment were performed to investigate the effect of rupture disks, the distance (D) between the shopping screen and the sample being 35 mm. Whatever the rupture disk (450-18000 psi), no luciferase activity was detected. The direct examination of cysts showed no alteration, that suggested that particle velocity was insufficient to penetrate cyst shell.

Bombardments of protuded embryos

For this embryonic stage, the effects of rupture disk and of the distance (D) between the stopping screen and the sample were investigated.

A first expérimet showed specific luciferase activities (*) with several samples (about 3000 embryos) heat-shocked 12 hours after the bombardment (table 1).

Table 1: Luciferase activities in heat-shocked embryo homogenates according to the rupture disk and the distance (D) between the stopping screen and the sample

Rupture disk	450 psi	650 psi	900 psi
D = 35 mm	0.385*	0.253	0.397*
D = 65 mm	0.255	0.485	0.318*
D = 95 mm	0.247	0.371*	0.323*
D = 125 mm	0.255	0.309*	0.269

These data indicated a possible transfection of DNA by biolistic and subsequent transient expression of the introduced DNA in the *Artemia* embryos. A second series of bombardments was performed with about 5000 embryos per sample. The survival rates of bombarded embryos were estimated 1-day later before to heat-shock. The values of luciferase activites are showed in table 2.

Table 2: Survival rates of bombarded embryos (values in brackets) and specific luciferase activities (*) in heat- shocked embryo homogenates according to the rupture disk and the distance (D) between the stopping screen and the sample

Disque de rupture	450 psi	650 psi	900 psi
D = 35 mm	0.640*(40%)	0.361*(20%)	0.485*(10%)
D = 65 mm	0.250 (80%)	0.275 (60%)	0.290 (10%)
D = 95 mm	0.261 (99%)	0.259 (99%)	0.273 (80%)
D = 125 mm	0.250 (99%)	0.243 (99%)	0.254 (99%)

The analysis for luciferase activity 1 day after bombardment showed that positive results were obtained for the shortest distance between the stopping screen and the sample. Taking into account the survival rates, it may be assumed that the 450 psi rupture disk is the best adapted although a relatively high luciferase activity was observed with the 900 psi rupture disk whereas the survival embryos were less numerous. On the basis of the transient expression of luciferase, the effect of the distance (D) covered by the microprojectiles before to reach the sample appeared crucial in terms of survival and transfection.

In order to better determine the effect of rupture disk on the transfection and the expression of DNA into the *Artemia* embryos, several bombardments were made for 450 psi-, 650 psi- and 900 psi-rupture disks (table 3). The samples were in all the cases placed at 35 mm of the stopping screen. Every sample contained about 10000 embryos.

Table 3: Specific luciferase activities (*) in homogenates of embryos heat-shocked 1 day after the bombardment.

Rupture disk-	450 psi	650 psi	900 psi
sample 1	4.165*	1.277*	0.846*
sample 2	2.383*	3.385*	1.788*
sample 3	1.737*	2.737*	1.599*
sample 4	1.854*	1.168*	2.087*
mean value (SD)	2.535(±1.122)	2.141(±1.095)	1.580(±0.529)

Parallely to the luminometry analyzes, bacteriological controls of the embryos were made before the homogeneization to verify the lack of transfected microorganisms. The specific luciferase activities of transfected embryos by biolistic are variable from a sample to the other, revealing the heterogeneity of the macrocarrier supporting the DNA coated microprojectiles. However, all the samples were positive for luciferase activity, the relative high values being explained by the high density and the large number of the embryos used for each bombardment.

Cinetic analyze of luciferase transient expression

On the basis of the precedent results, an experiment was devoted to the cinetic analyze of the luciferase expression. Twelve samples (each about 3000 embryos) were bombarded, the rupture disk being 450 psi and the distance D being 35 mm. At respectively 12, 24 and 48 hours after the bombardment, four samples were heat-shocked and then analysed for luciferase activity. The results are showed in table 4.

Table 4: Cinetic analyze of luciferase transient expression

Time post-bombardment	12 hours	24 hours	48 hours
sample 1	0.404*	0.341*	0.215
sample 2	0.416*	0.426*	0.219
sample 3	0.373*	0.333*	0.216
sample 4	0.278	0.266	0.224

Whereas a specific luciferase expression (*) was detected in the majority of samples analyzed 12 and 24 hours after the bombardment, luciferase activity lacked in all the 48 hours samples. These results indicated the transient nature of the expression of the DNA introduced by biolistic.

DISCUSSION - CONCLUSIONS

The researches related to aquaculture marine invertebrates are always strongly motivated by the improvement and the increase of productions. After a time essentially devoted to the breeding techniques, upstream studies are progressively developed. Physiology of reproduction, endocrinology, immunology or embryology as well as pathology and genetics become new important fields of investigations, all being largely approached in molecular perspectives. Like for vertebrates and plants, it will be soon necessary to study the expression of identified genes and the regulatory activity of specific promoters, such studies being specially performed on the basis of *in vivo* experiments. However, for marine invertebrates, a chief limitation to *in vivo* experiments corresponds, on one hand, to the lack of cell line and the yet possible long time before first establishment, on the other hand, to the lack of method for reliable transfection of embryos and subsequent analyze of transient expression of introduced DNA. Although microinjection protocols have been established for shrimp and molluscs embryos, this time consuming technique only permit to introduce DNA in a few tens of embryos. Thus, it is difficult to analyze construct expression and practically impossible to undertake large scale experiments or to attempt genetic transformation. Indeed, because of the lack of transposable element such as the P of *Drosophila*, the integration rate of exogenous DNA will be probably very low and only compatible with a "en masse" technique like biolistic.

Biolistic experiments were undertaken with *Artemia* embryos by supposing the possible efficiency of the heterologous hsp 70 promoter of *Drosophila*. The luciferase reporter gene was selected because of the lack of endogenous activity and the easiness of very sensitive measures (Giguere, 1991).

The cysts, even after treatment to dechorionate the shell, revealed impossible to transfect on the basis of the lack of subsequent luciferase expression.

The 20 hour-old embryos protruding from the shell constituted a very attractive material because of the simplicity of their massive obtention. The relative softness of the envelope was proved compatible with the microprojectile velocity since, in accordance to the rupture disk and the distance covered by the particles, some embryos were killed by the bombardment. The efficiency of biolistic to introduce DNA into embryos was demonstrated by the specific luciferase activity measured subsequently to the bombardment. In the same way, the efficiency of *Drosophila* hsp promoter was established. This result is non surprising because of the large range of animal species in which this promoter has been used. At the scale of crustaceans, this new information is very useful because it will permit later comparison with other heterologous identified promoters. Moreover, it become possible to study homologous sequences supposed to be promoter or involved in the regulation of gene expression. The relative reproductibility of the biolistic shoots was showed been the similarity of luciferase activities measured for similar samples. In fact the most variable biolistic parameter was related to the macrocarrier preparation because of the gold particle tendency to aggregate.

The expression of luciferase revealed to be transient as showed by the quick decrease after one day. It may be assumed that introduced DNA was essentially deteriorated. Taking into account that bombardments were performed on late embryonic stage and that integration is a scarce phenomenon, only some cells could eventually be transformed. In the perspective of genetic transformation of *Artemia*, it could be attempted to use selective marker gene and to select at the next generation for individual issued from a transformed

gamete. Such a strategy has already successfully applied to obtain transgenic mosquitoes by using microinjection (Miller *et al.*, 1987) and experiments are in progress by using biolistic (Mialhe *et al.*, pers. comm.). An alternative approach would be to bombard very early embryos in order that microprojectiles can reach pronuclei. In such a case the probability would be increased to obtain a large number of transformed cells in a mosaic animal or even a fully transgenic animal. Because of the reproduction biology of *Artemia*, biolistic cannot be applied to early embryos which develop inside the female. The obtention of transgenic *Artemia* will necessarily need to select at the second generation that is not problematic taking into account its cycle time. The potential of biolistic for germ line transformation is obviously non limited to this crustacean species and will have to be tested with shrimp and also mollusc embryos.

ACKNOWLEDGEMENTS

But for Dr Louis Miller, chief of the laboratory of malaria research at the National Institutes of Health (National Institute of Allergy and Infectious Diseases), this work was not possible. The authors are sincerely grateful to him and they thank all the colleagues of his team who were helpful somehow or other, specially Steeve Dolan for correcting the manuscript.

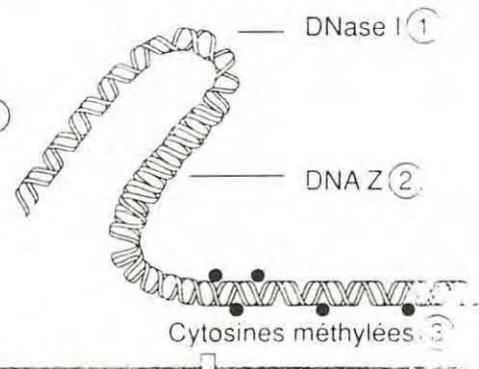
REFERENCES

- Baldarelli R.M., Lengyel J. A., 1991. Transient expression of DNA after ballistic introduction into *Drosophila* embryos, *Nucl. Acids Res.*, 18: 5903-5904.
- Cadoret J.P., 1992. Electric field-induced polyploidy in mollusc embryos. *Aquaculture*, 106: 127-139.
- Fletcher G. L., Davies P.L., 1991. Transgenic fish for aquaculture. In "Genetic Engineering", Plenum Press, Ed. Setlow J.K., 13: 331-370.
- Giguere V., 1991. Application of the firefly luciferase reporter gene. In "Methods in molecular biology; Gene transfer and expression protocols", Humana Press, Ed. Murray E.J., 7: 779-241.
- Miller L. H., Sakai R. K., Romans P., Gwadz R.W., Kantoff P., Coon H. G., 1987. Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 237: 770-781.
- Sanford J.C. 1988. the biolistic process. *Trends in biotechnology*, 6: 299-302.
- Zelenin A.V., Alimov A.A., Barmintzev V.A., Beniumov A.O., Zelenina I.A., Krasnov A.M., Kolesnikov V.A., 1991. The delivery of foreign genes into fertilized eggs using high-velocity microprojectile. *FEBS*, 287: 118-120.

Différentes possibilités de régulation de l'expression chez les eucaryotes d'après Kaplan et Delpuch (Biologie moléculaire et médecine)

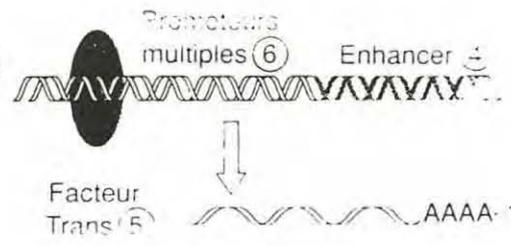
I Niveau Chromatinien

- DNase I et sites hypersensibles ①
- DNA Z ②
- Méthylation des cytosines ③
- Reconfiguration



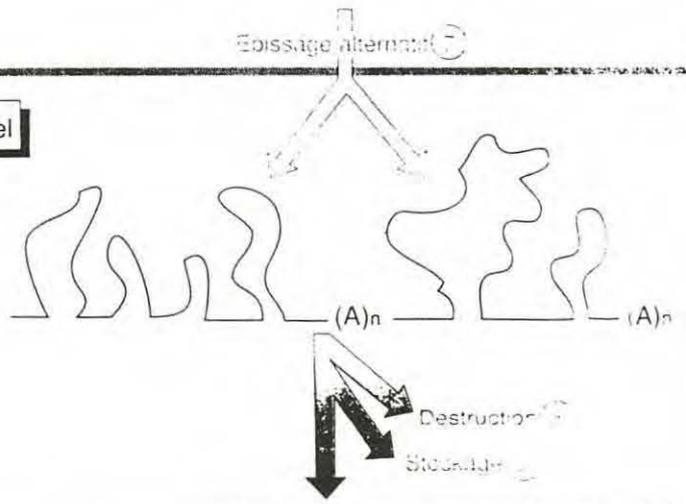
II Niveau Transcriptionnel

- Régulation en cis (Enhancer) ④
- Régulation en trans ⑤
- Choix de promoteur ⑥
- Atténuation



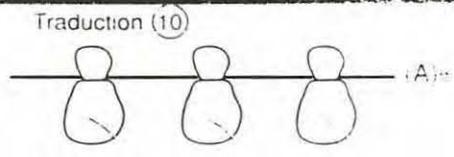
III Niveau Post-Transcriptionnel

- Epissage alternatif ⑦
- Site de polyadénylation
- Mutation dans le mRNA
- Durée de vie ⑧
- Stockage ⑨



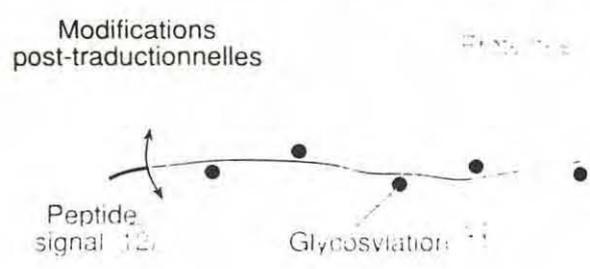
IV Niveau Traductionnel

- Modification des facteurs d'initiation ⑩



V Niveau Post-Traductionnel

- Glycosylation etc... ⑪
- Peptide signal ⑫



Alignement des portions de séquences nucléiques du gène hsp70 chez différentes espèces à partir duquel les amorces A et B (annexe 16) de PCR ont été déterminées.

	N	R	T	T	P	S	Y	(acides aminés)
Drosophile	AC	CGC	ACC	ACG	CCG	TCC	TAC	
Coenorhabditis	AC	AGA	ACC	ACT	CCC	AGC	TAT	
Hydre	AT	CGC	ACC	ACT	CCA	AGT	TAC	
Homme	AC	CGC	ACC	ACG	CCC	AGC	TAC	
Leishmania	AC	CGC	ACG	ACA	CCG	TCG	TAC	
Amorce A	ac	ggt	acc	aci	cci	tca	ta(ct)	3'

	D	F	Y	T	K	(acides aminés)
Drosophile	GAC	TTC	TAC	ACC	AAA	
Homme	GAC	TTC	TAC	ACG	TCC	
Poulet	GAC	TTC	TAG	ACG	TCC	
Amorce B	ctg	aag	atg	tgg	ttg	tag cta gc 5'
				c		
Amorce B complémentaire	gac	ttc	tac	acc	aac	atc gat cg 3'
				g		

Séquences des trois amorces de PCR utilisées pour amplifier deux portions de la séquence du gène inductible hsp70 chez *Penaeus*. Les amorces sont placées ici vis à vis de la séquence du gène hsp70 de drosophile (Référence GENBANK: DROHSP7A2)

gc: mélange équimolaire au cours de la synthèse de l'oligonucléotide

ggt acc: site de restriction

GAATATTCTAGA: séquence Pelham

TCGATTATCTCTAACATAATTAAGCAGCCGTTATTTATAAAGAAATTTCCAAAATAAAGTATATATAT -505

Amorce C (site *EcoRI*) gag

AAATAAGAATATTCTAGAATCCCAAACAAACCTGGTTGTTGCGCGAGGCATTTGTTGCCAGAAAGAAA -433

aattctggaatittctagaii

CTCGAGAAATTTCTCTGGCCGTTATTCTCTATTTCGTTTTGTGACTCTCCCTCTGTACTATTGCTCTCTCA -361

CTCTGTGCGCACAGTAAACGGCACTCTATTCTCGTTGCTTCGAGAGAGCGCGCCTCGAATGTTCCGCGAAAAGA -289

r ARNm

GCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGTCGACGGAGCGTCAATTCAATTCAAACAAGCAAAGTGAACACAT -217

CGCGAAGCAAGCTGAGCAAACAACAAGCGCAGCGAACAAGCTAAACAATCTGCAATAAAGTGAAGTTAAA -145

GTGAATCAATTAAAAGTAACCAACAACCAAGTAATTAAGTAAACTAAAACTGCAACTACTGAAATCAACCAAGAA -73

GTCATTATTGAAGACAAGAAGAGAACTCTGAATACTTTCAACAAGTCGTTACCGAGGAAGAACTCACACACA -1

M P A I G I D L G T T Y S C V G V Y
ATG CCT GCT ATT GGA ATC GAT CTG GGC ACC ACC TAC TCC TGC GTG GGT GTC TAC 54

Q H G K V E I I A N D Q G N R T T P
CAA CAT GGC AAG GTG GAG ATT ATC GCC AAC GAC CAG GGC AAC CGC ACC ACG CCG 108

Amorce A (site *KpnI*) ac ggt acc aci cci

S Y V A F T D S E R L I G E P A K N
TCC TAC GTG GCT TTC ACA GAT TCG GAA CGC CTC ATC GGC GAA CCG GCC AAG AAC 162
tca ta(tc)

Q V A M N P R N T V F D A K R L I G
CAG GTG GCC ATG AAC CCC AGA AAC ACA GTG TTT GAC GCC AAG CGA CTC ATC GGC 216

R K Y D D P K I A E D M K H W P F K
CGA AAA TAC GAC GAC CCC AAG ATC GCA GAG GAC ATG AAG CAC TGG CCT TTC AAG 270

V V S D G G K P K I G V E Y K G E S
GTG GTA AGC GAC GGC GGA AAG CCC AAG ATC GGG GTG GAG TAT AAG GGT GAG TCC 324

K R F A P E E I S S M V L T K M K E
AAG AGA TTT GCC CCC GAG GAG ATC AGC TCG ATG GTG CTG ACC AAG ATG AAG GAG 378

T A A E A Y L G E S I T D A V I T V
ACG GCG GCG GAG GCA TAT CTG GGC GAG AGC ATC ACA GAC GCA GTC ATC ACA GTT 432

P A Y F N D S Q R Q A T K D A G H I
CCA GCC TAC TTC AAC GAC TCC CAG CGC CAG GCT ACC AAA GAC GCC GGT CAC ATC 486

A G L N V L R I I N E P T A A A L A
GCC GGC CTG AAT GTG CTC CGC ATC ATC AAT GAG CCC ACG GCG GCA GCA CTG GCC 540

Y G L D K N L K G E R N V L I F D L
TAC GGA CTG GAC AAG AAC CTC AAG GGT GAG CGC AAT GTG CTT ATC TTC GAC TTG 594

G G G T F D V S I L T I D E G S L F 648
 GGC GGC GGC ACC TTC GAT GTC TCC ATC CTG ACC ATC GAC GAG GGA TCT CTG TTC

E V R S T A G D T H L G G E D F D N 702
 GAG GTG CGC TCC ACC GCC GGA GAC ACG CAC TTG GGC GGC GAG GAC TTT GAC AAC

R L V T H L A D E F K R K Y K K D L 756
 CGG CTA GTC ACT CAT CTG GCG GAC GAG TTC AAG CGC AAG TAC AAG AAG GAT CTG

R S N P R A L R R L R T A A E R A K 810
 CGC TCC AAC CCT CGC GCC CTA CGA CGC CTC AGA ACA GCA GCT GAA CGG GCC AAG

R T L S S S T E A T I E I D A L F E 864
 CGC ACA CTC TCC TCC AGC ACG GAG GCC ACC ATC GAG ATT GAC GCA CTG TTT GAG

G Q D F Y T K V S R A R F E E L C A 918
 GGC CAA GAC TTC TAC ACC AAA GTG AGC CGC GCC AGG TTT GAG GAG CTG TGC GCG
 ctg aag atg tgcqttg tag cta gc Amorce B (site ClaI)

Short description of list: LIST2

APLRAS	A.californica ras protein gene, 3' end.	=248 b	HUMRASKA1	Human lung adenocarcinoma (PR310) K-ras oncogene, exon 1.	=136 b
APLRHOA	Aplysia californica (mollusc) ras-related rho mRNA, complete cds.		HUMRASKA2	Human (lung carcinoma PR310) K-ras oncogene, exon 2.	=563 b
BOVRAS1	Bovine Harvey-ras 1 gene coding for p21 ras protein, exons 1-2		HUMRASKB1	Human lung adenocarcinoma (PR371) K-ras oncogene, exon 1.	=136 b
BOVRAS2P1	Bovine Harvey-ras 2 put. pseudogene, exons 1-3	=964 b	HUMRASKB2	Human (lung carcinoma PR371) K-ras proto-oncogene, exon 2.	=563 b
BOVRAS2P4	Bovine Harvey-ras 2 put. pseudogene, exons 4	=724 b	HUMRASKP	Human c-Ki-ras1 pseudogene.	=865 b
CHKCPS1	Chicken processed pseudogene CPS1 related to the ras oncogene=594 b superfamily.		HUMRASNO1	Human N-ras proto-oncogene, exon 1.	=120 b
CHKHRASR1	Chicken mRNA insertionally activated c-Ha-ras oncogene from nephroblastoma.	=997 b	<RETURN>	key to continue or ST to stop	
CRARAS1	Goldfish gene for ras-related protein exon 1	=366 b	HUMRASNO2	Human N-ras proto-oncogene, exon 2.	=197 b
CRARAS23	Goldfish gene for ras-related protein exon 2 and 3	=984 b	HUMRASNO3	Human N-ras proto-oncogene, exon 3.	=176 b
CRARAS4	Goldfish gene for ras-related protein, exon 4	=280 b	HUMRASNO4	Human N-ras proto-oncogene, exon 4.	=127 b
CRARAS45	Goldfish erythrophoroma ras gene, exon 1.	=245 b	HUMRASN1	Human cellular N-ras proto-oncogene, exon 1.	=151 b
CRARAS46	Goldfish ras gene, exon 1.	=245 b	HUMRASN2	Human cellular N-ras proto-oncogene, exon 2.	=199 b
DDIRASA	D.discoideum ras protein (DdrasG) gene, complete cds.	=585 b	HUMRASN3	Human cellular N-ras proto-oncogene, exon 3.	=160 b
DRORAP1A	Drosophila melanogaster Rap1 gene, complete cds.	=555 b	HUMRASN4	Human cellular N-ras proto-oncogene, exon 4.	=120 b
DRORAS1	D.melanogaster chromosome 3 locus 85D Dras1 gene, complete.	=1102 b	HUMRASNPM	Human N-ras gene DNA fragment.	=328 b
DRORAS1I1	D.melanogaster Dmras85D gene, exon 1.	=328 b	HUMRASR1	Human R-ras gene, exon 1.	=2336 b
<RETURN>	key to continue or ST to stop		HUMRASR2	Human R-ras gene, exons 2 through 6.	=3350 b
DRORAS1I2	D.melanogaster Dmras85D gene, exon 2.	=281 b	HUMRASRP	Human ras-related protein rap1A mRNA, complete cds.	=558 b
DRORAS1I3	D.melanogaster Dmras85D gene, exon 3.	=622 b	HUMRASRPB	Human ras-related protein Rap1B mRNA, complete cds.	=838 b
DRORAS21	D.melanogaster chromosome 3 locus 64B Dras2 gene, exon 1 and flank.	=338 b	HUMRASK2	Human SK2 c-Ha-ras-1 oncogene-encoded protein, exon 1.	=2441 b
DRORAS22	D.melanogaster chromosome 3 locus 64B Dras2 gene, exon 2 and flanks.	=534 b	HUMRHOA	Human ras-related rho mRNA (clone 6), partial cds.	=539 b
DRORAS223	Drosophila ras2 gene exon 2 - intron II - exon 3 region.	=119 b	MSHP21	harvey murine sarcoma virus p21 v-has protein gene.	=997 b
DRORAS2A1	D.melanogaster (Dmras64B) Dras2 gene, exon 1.	=219 b	MSHP21A	Murine sarcoma virus (Harvey-strain) H-ras gene for transforming protein p21 (proviral form).	=1042 b
DRORAS2A2	D.melanogaster (Dmras64B) Dras2 gene, exon 2.	=93 b	MSVP21A	Murine sarcoma virus p21 ras protein, complete cds.	=1078 b
DRORAS2A3	D.melanogaster (Dmras64B) Dras2 gene, exon 3.	=527 b	MUSCRAS	Mouse c-Ki-ras oncogene mRNA on chromosome 6.	=197 b
DRORAS2B1	D. melanogaster ras oncogene (Dmras64B), exon 1.	=93 b	MUSKIRAS1	Mouse Ki-ras cellular oncogene exon 1 from Y1 adrenal tumor cells.	
DRORAS2B2	D. melanogaster ras oncogene (Dmras64B), exon 1.	=93 b	MUSKIRAS2	Mouse Ki-ras cellular oncogene exon 2 from Y1 adrenal tumor cells.	
DRORAS2B3	Drosophila melanogaster ras oncogene.	=450 b	MUSKIRAS3	Mouse Ki-ras cellular oncogene exon 3 from Y1 adrenal tumor cells.	
DRORAS2PR	Drosophila ras2 gene promoter region.	=300 b	<RETURN>	key to continue or ST to stop	
DRORAS3	Drosophila Dras3 gene.	=682 b	MUSKIRAS4	Mouse Ki-ras cellular oncogene exon 4a from Y1 adrenal tumor cells.	
GPINRAS	Guinea pig N-ras oncogene, complete cds.	=570 b	MUSKIRAS5	Mouse Ki-ras cellular oncogene 4B from Y1 adrenal tumor cells.	
HUMBRAFA	Human B-ras oncogene mRNA, 3' end.	=987 b	MUSNRASA2P	Mouse pseudogene Nras-2ps.	=2225 b
HUMCHRAS	Human c-H-ras-1 gene with novel codon 13 mutation	=111 b	MUSNRASG	Mouse N-ras gene, 5' end.	=780 b
HUMCHRAS1	Nucleotide sequence of the 5'-flanking region of the c-H-ras oncogene in plasmid pEJ.	=581 b	MUSNRASR	Mouse mRNA for N-ras protein (exons 1 - 6 part.).	=3026 b
HUMCHRAS2	Humane ras-H-oncogene encoded protein gene, 5' end.	=106 b	MUSRASK	Mouse lymphoma c-K-ras oncogene, exon 1 and flanks.	=231 b
HUMCHSBS	human activated oncogene c-has/bas.	=695 b	MUSRASKI	Mouse c-Ki-ras gene, exon 1 (untranslated).	=1126 b
<RETURN>	key to continue or ST to stop		NEURAS	Neurospora crassa mRNA for 24 kDa ras protein	=1115 b
HUMCRAS2P	Human c-Ha-ras2 oncogene, pseudogene.	=1261 b	RATRASA	Rat ras-related protein mRNA, clone NTRAB1R.	=618 b
HUMHRASA	Human HRAS p21 peptide gene, exon 1.	=145 b	RATRAB	Rat ras-related protein mRNA, clone NTRAB2R.	=639 b
HUMKRASP	Human c-K-ras gene promoter region.	=718 b	RATRASC	Rat rab3 ras-related protein mRNA, clone NTRAB3R.	=743 b
HUMNRASR	Human N-ras mRNA and flanking regions.	=2436 b	RATRASH	Rat rab4 ras-related protein mRNA, clone NTRAB4R.	=711 b
HUMPAWN1	Human PAW-N1 DNA for N-ras exon 2.	=115 b	RATRASH	Rat Ha-ras proto-oncogene, partial cds.	=1309 b
HUMRAB2	Human rab2 mRNA, YPT1-related and member of ras family.	=1148 b	RATRASKI1	Rat (sarcoma 1,8-DNP2) c-Ki-ras proto-oncogene, exon 1.	=122 b
HUMRAP2	Human rap2 mRNA for ras-related protein.	=555 b	RATRASKI2	Rat (sarcoma 1,8-DNP2) c-Ki-ras proto-oncogene, exon 2.	=179 b
HUMRAP2B	Human mRNA for rap2b gene	=552 b	RSVRAS	Rat sarcoma virus (RaSV) v-ras oncogene, p29 transforming protein, proviral form.	=1380 b
HUMRASCMAL	Human leukemic bone marrow transforming ras protein gene, 5' end.		SOERALONC	Marmoset (S.oedipus) ral protein mRNA, complete cds.	=660 b
HUMRASH	Human c-Ha-ras1 proto-oncogene, complete coding sequence.	=6451 b	SYNCHARAS	Synthetic human c-Ha-ras gene encoding p21 protein, complete cds.	
HUMRASK21	Human cellular transforming oncogene c-Ki-ras2, exon 0 and flanks.	=290 b	SYNHRASA	Synthetic N-ras gene, complete cds.	=570 b
HUMRASK22	Human cellular proto-oncogene c-Ki-ras2, exon 1 and flanks.	=290 b	YSCRAS1	S.cerevisiae RAS1 gene, complete coding sequence.	=930 b
HUMRASK23	Human cellular transforming oncogene c-Ki-ras2, exon 2 and flanks.		YSCRAS2	S.cerevisiae RAS2 gene, complete coding sequence.	=969 b
HUMRASK24	Human cellular transforming oncogene c-Ki-ras2, exon 3 and flanks.		<RETURN>	key to continue or ST to stop	
HUMRASK25	Human cellular proto-oncogene c-Ki-ras2, exon 4a and flanks.	=866 b	YSCRASH1R	Yeast (S. cerevisiae) ras-H related gene c-ras-sc-1.	=1229 b
HUMRASK26	Human cellular proto-oncogene c-Ki-ras2, exon 4b and flanks.	=617 b	YSCRASH2R	Yeast (S. cerevisiae) ras-H related gene c-ras-sc-2.	=1242 b
			YSCRHO1X	Yeast (S.cerevisiae) ras-related RHO1 gene, complete cds.	=789 b
			YSCRHO2X	Yeast (S.cerevisiae) ras-related RHO2 gene, complete cds.	=706 b
			YSCYP2ONC	Yeast (S.cerevisiae) YP2 protein proto-oncogene (human c-has/bas).	
			YSPRAS	Yeast (S.pombe) ras gene, complete cds.	=871 b
			YSPRASX	Yeast (Schizosaccharomyces pombe) RAS gene.	=1238 b

A

[IFREMER.BATCH]RHOONCOM.ALN

Gap fixed = 10 Gap vary. = 10

HUMRH0A
HUMRH0B
HUMRH0C9
HUMRH0B6
DOGRH01
BOVBGBRH
APLRH0A
YSCRH01X
RATRH0B
HUMPG25K
GAAT-TCGGGCTACCC---TCGCCCGCC---CCGCGGTCT--CCGTGC---

HUMRH0A
HUMRH0B
HUMRH0C9
HUMRH0B6
DOGRH01
BOVBGBRH
APLRH0A
YSCRH01X
RATRH0B
HUMPG25K
-GTCTC-----T-CATT---AGTCCAGG-----TCTG-GTCTCAGCT--
AGTCTCTG--AGCT-TGCC---ACTCGAGGA-----CAAGCGTCTCAAGCGG

HUMRH0A
HUMRH0B
HUMRH0C9
HUMRH0B6
DOGRH01
BOVBGBRH
APLRH0A
YSCRH01X
RATRH0B
HUMPG25K
-----ACCG-----CCTTCGTCTCCGAGT--T--TGCAGTCCGGGGACC
A-----GAGCGACTCG-----GAGTCTCGCTGAGTGCC--TTTCATCTGAGAAGTC

HUMRH0A
HUMRH0B
HUMRH0C9
HUMRH0B6
DOGRH01
BOVBGBRH
APLRH0A
YSCRH01X
RATRH0B
HUMPG25K
GGCGTCCCCGGCGGA-----AGAGG-----
AGGGCACTTTGTAGAACTTC-----TGCCATACAGG-----

HUMRH0A
HUMRH0B
HUMRH0C9
HUMRH0B6
DOGRH01
BOVBGBRH
APLRH0A
YSCRH01X
RATRH0B
HUMPG25K
-----CTG-GACTCGGATTCOTTGCC-----TGAGCA-ATGGCTGCCATCCGGA
-----ATGGCTGCAATCCGAA-----

HUMRH0A
HUMRH0B
HUMRH0C9
HUMRH0B6
DOGRH01
BOVBGBRH
APLRH0A
YSCRH01X
RATRH0B
HUMPG25K

HUMRH0A
HUMRH0B
HUMRH0C9
HUMRH0B6
DOGRH01
BOVBGBRH
APLRH0A
YSCRH01X
RATRH0B
HUMPG25K

HUMRH0A
HUMRH0B
HUMRH0C9
HUMRH0B6
DOGRH01
BOVBGBRH
APLRH0A
YSCRH01X
RATRH0B
HUMPG25K

HUMRH0A
HUMRH0B
HUMRH0C9
HUMRH0B6
DOGRH01
BOVBGBRH
APLRH0A
YSCRH01X
RATRH0B
HUMPG25K

HUMRH0A
HUMRH0B
HUMRH0C9
HUMRH0B6
DOGRH01
BOVBGBRH
APLRH0A
YSCRH01X
RATRH0B
HUMPG25K

HUMRH0A
HUMRH0B
HUMRH0C9
HUMRH0B6
DOGRH01

AGAAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGGGAAAGAATGCTTGTCTCATAGTCTTCA
AGAAGCTGGTGATCGTTGGGATGGTGCCTGGGAAAGACCTGCCTCCTCATCGTCTTCA
AGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGGGAAAGACCTGCCTCCTCATCGTCTTCA
AGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGGGAAAGACCTGCCTCCTCATCGTCTTCA
AGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGGGAAAGACCTGCCTCCTCATCGTCTTCA
AGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGGGAAAGACCTGCCTCCTCATCGTCTTCA
AGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGGGAAAGACCTGCCTCCTCATCGTCTTCA
AGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGGGAAAGACCTGCCTCCTCATCGTCTTCA
AGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGGGAAAGACCTGCCTCCTCATCGTCTTCA
AGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGGGAAAGACCTGCCTCCTCATCGTCTTCA

-----CGAGTTCGCCAGGTTGACGTGCCACCGTCTTCGAGAACTATGTGGCCGACA
GCAAGGACCAATCCAGAGGTGTATGTCGCCACAGTGTTCGAGAACTATGTCGGGACATA
GCAAGGACCAATCCAGAGGTGTATGTCGCCACAGTGTTCGAGAACTATGTCGGGACATA
GCAAGGACCAATCCAGAGGTGTATGTCGCCACAGTGTTCGAGAACTATGTCGGGACATA
GCAAGGACCAATCCAGAGGTGTATGTCGCCACAGTGTTCGAGAACTATGTCGGGACATA
GCAAGGACCAATCCAGAGGTGTATGTCGCCACAGTGTTCGAGAACTATGTCGGGACATA
GCAAGGACCAATCCAGAGGTGTATGTCGCCACAGTGTTCGAGAACTATGTCGGGACATA
GCAAGGACCAATCCAGAGGTGTATGTCGCCACAGTGTTCGAGAACTATGTCGGGACATA
GCAAGGACCAATCCAGAGGTGTATGTCGCCACAGTGTTCGAGAACTATGTCGGGACATA
GCAAGGACCAATCCAGAGGTGTATGTCGCCACAGTGTTCGAGAACTATGTCGGGACATA

TTGAGGTGGACGGCAAGC-AGGTGGAGCTGGCGCTGTGGGACAGCGGGGCCAGGAGGAC
TCGAGGTGGAGTGGAAAGC-AGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGAGGAGAT
TTGAGGTGGACGGCAAGC-AGGTGGAGCTGGCGCTGTGGGACACAGCTGGGAGGAGAC
TTGAGGTGGACGGCAAGC-AGGTGGAGCTGGCGCTGTGGGACACAGCTGGGAGGAGAC
TTGAGGTGGAGTGGAAAGC-AGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGAGGAGAT
TTGAGGTGGAGTGGAAAGC-AGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGAGGAGAT
TTGAGGTGGAGTGGAAAGC-AGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGAGGAGAT
TTGAGGTGGAGTGGAAAGC-AGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGAGGAGAT
TTGAGGTGGAGTGGAAAGC-AGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGAGGAGAT
TTGAGGTGGAGTGGAAAGC-AGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGAGGAGAT

TACGACCGCTGGCGCGCTCTCCTACCGGACACCGACGTCATCTCATGTGCTTCTCG
TATGATCGCTGGGCGCTCTCCTACCGGACACCGACGTCATCTCATGTGCTTCTCG
TATGATCGCTGGGCGCTCTCCTACCGGACACCGACGTCATCTCATGTGCTTCTCG
TATGATCGCTGGGCGCTCTCCTACCGGACACCGACGTCATCTCATGTGCTTCTCG
TATGATCGCTGGGCGCTCTCCTACCGGACACCGACGTCATCTCATGTGCTTCTCG
TATGATCGCTGGGCGCTCTCCTACCGGACACCGACGTCATCTCATGTGCTTCTCG
TATGATCGCTGGGCGCTCTCCTACCGGACACCGACGTCATCTCATGTGCTTCTCG
TATGATCGCTGGGCGCTCTCCTACCGGACACCGACGTCATCTCATGTGCTTCTCG
TATGATCGCTGGGCGCTCTCCTACCGGACACCGACGTCATCTCATGTGCTTCTCG
TATGATCGCTGGGCGCTCTCCTACCGGACACCGACGTCATCTCATGTGCTTCTCG

GTGGACAGCCCGACTGCTGGAGAACATCCCCGAGAAAGTGGGTCGCCAGGTTGAGGCAC
ATCGACAGCCCTGATGTTAGAAAACATCCGAGAAAGTGGGACCCAGAAAGTCAAGCAT
ATCGACAGCCCTGACAGCCTGGAAAACATCCGAGAAAGTGGGTCGCCAGGTTGAGGCAC
GTGGACAGCCCGACTGCTGGAGAACATCCCCGAGAAAGTGGGTCGCCAGGTTGAGGCAC
ATTGACAGCCCTGATGTTAGAAAACATCCGAGAAAGTGGGTCGCCAGGTTGAGGCAC
ATTGATAGCCCTGATGTTAGAAAACATCCGAGAAAGTGGGTCGCCAGGTTGAGGCAC
ATTGACAGCCCTGACAGCCTGGAGAACATCCGAGAAAGTGGGTCGCCAGGTTGAGGCAC
ATTGATAGCCCTGATGTTAGAAAACATCCGAGAAAGTGGGTCGCCAGGTTGAGGCAC
ATTGACAGCCCTGACAGCCTGGAGAACATCCGAGAAAGTGGGTCGCCAGGTTGAGGCAC
ATTGATAGCCCTGATGTTAGAAAACATCCGAGAAAGTGGGTCGCCAGGTTGAGGCAC

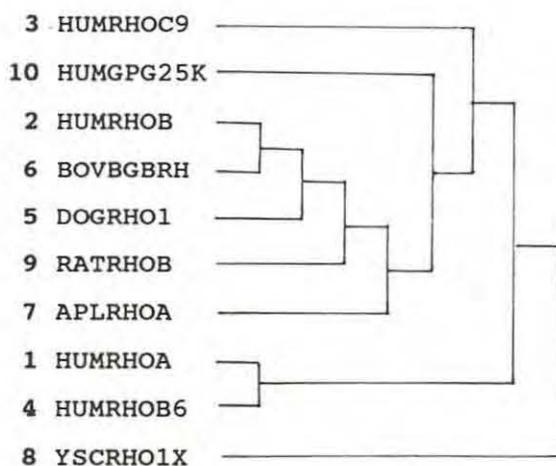
TTCTGTCCCAATGTGCCATCATCTGGTGGCCAAACAAAAAGACTGCGCAGCGAGGAG
TTCTGTCCCAATGTGCCATCATCTGGTGGGAAATAAGAAAGGATCTTCGGAAATGATGAG
TTCTGTCCCAATGTGCCATCATCTGGTGGGAAATAAGAAAGGACTGCGCAGCGAGGAG
TTCTGTCCCAATGTGCCATCATCTGGTGGCCAAACAAAAAGACTGCGCAGCGAGGAG
TTCTGTCCCAATGTGCCATCATCTGGTGGGAAATAAGAAAGGATCTTCGGAAATGATGAG

alignement (A) et dendrogramme (B) de 10 séquences rho

[IFREMER.BATCH] RHOONCOM.DND

B

2	880.00	0	0	0100020000
3	657.00	1	0	0100210000
4	582.67	2	0	0100110020
5	524.50	3	0	0100112010
2	508.00	0	0	1002000000
6	462.40	4	0	0100111012
7	422.17	6	0	0120111011
9	397.43	5	7	1221222022
10	377.22	8	0	1111111211



- 1 HUMRHOA 8/86 Human ras-related rho mRNA (clone 6). p
 2 HUMRHOB 3/88 Human rho mRNA (clone 12). 3/88
 3 HUMRHOC9 6/89 Human rhoC mRNA (clone 9). 6/89
 4 HUMRHOB6 6/89 Human rhoB mRNA (clone 6). 6/89
 5 DOGRHO1 5/91 Canine rho1 mRNA for ras-related GTP-bi
 6 BOVBGBRH 6/90 B.taurus rho mRNA encoding Gb, complet
 7 APLRHOA 8/86 Aplysia californica (mollusc) ras-relat
 8 YSCRHO1X 6/87 Yeast (S.cerevisiae) ras-related RHO1
 9 RATRHOB 8/91 Rat rhoB gene mRNA, complete cds. 8/91
 10 HUMGPG25K 2/91 Human GTP-binding protein G25K mRNA,

[IPREMER.BATCH]RHONACO1.TXT

SHRRHO1 .dat, 102 nt vs @DA:[bisance]nucleic.nam library
using DNA matrix

G E N B A N K release number 71

```

      initn  init1
< 4 2685 2685:-----
  8 3 3:==
 12 2 2:==
 16 7 7:=====
 20 35 35:-----
 24 9330 9330:-----
 28 17754 17754:-----
 32 17894 17894:-----
 36 10726 10726:-----
 40 4969 4969:-----
 44 2221 2221:-----
 48 1342 1344:-----
 52 585 602:-----
 56 233 238:-----
 60 104 104:-----
 64 37 39:+++++-----
 68 23 23:=====
 72 5 5:==
 76 8 3:--+
 80 10 0:++++
 84 6 0:+++
 88 1 0:+
 92 2 0:+
 96 0 0:
100 0 0:
104 0 0:
108 3 1:--+
112 0 0:
116 0 0:
120 0 0:
124 0 0:
128 1 1:=-
132 0 0:
136 5 5:===
140 1 1:=-
144 2 2:=-
148 0 0:
152 0 0:
156 1 1:=-
160 0 0:
>160 4 4:=-

```

87552214 residues in 67962 sequences

mean initn score: 30.7 (8.64)

mean init1 score: 30.7 (8.61)

1764 scores better than 46 saved, ktup: 6, fact: 6 scan time: 0:09:59

The best scores are:

```

>DOGRHO1 5/91 Canine rho1 mRNA for ras-related GTP-bi 268 268 271
>BOVBGBRH 6/90 B.taurus rho mRNA encoding Gb, complet 261 261 264
>APLRHOA 8/86 Aplysia californica (mollusc) ras-relat 247 247 247
>HUMRHOB 3/88 Human rho mRNA (clone 12). 3/88 219 219 236

```

```

>YSCCDC42 5/91 Yeast CDC42 gene involved in developme 156 156 158
>HUMGPG25K 2/91 Human GTP-binding protein G25K mRNA, 142 142 151
>HUMG25KA 9/90 Human GTP-binding protein (G25K) mRNA, 142 142 151
>YSCRHO1X 6/87 Yeast (S.cerevisiae) ras-related RHO1 138 138 232
>HUMRHOA 8/86 Human ras-related rho mRNA (clone 6), p 135 135 214
>HUMRHOB6 6/89 Human rhoB mRNA (clone 6). 6/89 135 135 214
>HUMRASAA 6/90 Human ras-like protein mRNA, complete 133 133 151
>HUMRACA 3/90 Human ras-related C3 botulinum toxin su 133 133 151
>DOGRAC2 5/91 Canine rac2 mRNA for ras-related GTP-bi 133 133 165
>RATRHOB 8/91 Rat rhoB gene mRNA, complete cds. 8/91 128 128 193
>HS4B958RAJ 10/91 Epstein-Barr virus, artifactual joi 107 50 56
>HUMRHOC9 6/89 Human rhoC mRNA (clone 9). 6/89 107 107 222
>HS4 6/88 Epstein-Barr virus (EBV) B95-8 strain, comp 107 50 56
>SPICPSO213 9/89 Spinach chloroplast DNA inversion co 92 64 64
>PIFHNFD 6/89 Parainfluenza-3 virus transcriptase (L 91 64 64
>RATALDRED 1/92 Rat aldose reductase gene, complete c 86 56 60

```

```

>DOGRHO1 5/91 Canine rho1 mRNA for ras-related GTP-bi 268 268 271
81.2% identity in 101 nt overlap

```

```

      10 20 30
SHRRHO GACAGATTGAGGCCACTGTCCTACCCCGAC
      : X: : : : : : : : : : : : : :
DOGRHO TTGTGGGATACAGCTGGGCAGGAAGATTATGATCGCTTGAGGCCTCTCTCCTATCCAGAC
      170 180 190 200 210 220

      40 50 60 70 80 90
SHRRHO ACAGATGTCATACTCATGTGTTTCTCTATTGATTCGCCGGATTTCGTTAGAAAAATATTCCA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
DOGRHO ACTGATGTTATACTGATGTGTTTCTCTATTGACAGCCCTGATAGCTTAGAAAAACATCCCA
      230 240 250 260 270 280

```

```

      100
SHRRHO GAAAAATGGGACG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
DOGRHO GAAAAATGGACCCCAAGTCAAGCACTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCTCTGGTTGGG
      290 300 310 320 330 340

```

```

>BOVBGBRH 6/90 B.taurus rho mRNA encoding Gb, complet 261 261 264
80.2% identity in 101 nt overlap

```

```

      10 20 30
SHRRHO GACAGATTGAGGCCACTGTCCTACCCCGAC
      : : X: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
BOVBGB TTATGGGACACAGCTGGGCAGGAAGATTATGATCGCTTGAGGCCTCTCTCCTACCCGGAT
      370 380 390 400 410 420

      40 50 60 70 80 90
SHRRHO ACAGATGTCATACTCATGTGTTTCTCTATTGATTCGCCGGATTTCGTTAGAAAAATATTCCA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
BOVBGB ACCGACGTTATACTGATGTGTTTCTCCATTGATAGCCCTGATAGTTAGAAAAACATACCA
      430 440 450 460 470 480

```

```

      100
SHRRHO GAAAAATGGGACG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
BOVBGB GAAAAATGGACTCCGGAAGTCAAGCATTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCTCTGGTTGGG
      490 500 510 520 530 540

```

```

>APLRHOA 8/86 Aplysia californica (mollusc) ras-relat 247 247 247
77.5% identity in 102 nt overlap

```

```

      10 20 30
SHRRHO GACAGATTGAGGCCACTGTCCTACCCCGAC
      X: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
APLRHO CTGTGGGACACAGCGGGGACAAGGACTATGACAGACTGAGCCCGCTGCTTACCCTGAC
      190 200 210 220 230 240

```

```
SHRRHO ACAGATGTCATACTCATGTGTTTCTCTATTGATCCCGGATTCGTTAGAAAAATATCCCA
      40      50      60      70      80      90
APLRHO ACAGATGTCATACTCATGTGTTTCTCTATAGACAGTCCAGACAGTCTGGAGAACATACCCG
      250     260     270     280     290     300

SHRRHO GAAAAATGGACG
      100
APLRHO GAGAAAGTGGACGCGCTGAGGTTGCTCACTTTTGCCAAATGTTCTCATAATACTTGTGGGT
      310     320     330     340     350     360

>HUMRHOB 3/88 Human rho mRNA (clone 12). 3/88 219 219 236
78.7% identity in 94 nt overlap

SHRRHO GACAGATTGAGGCCACTGCCTACCCCGACACAGATG
      10      20      30
X: ::::: :: ::::: :: ::::: :: :::::
HUMRHOB ACACAGCTGGGCAGGAAGATTATGATCGCCTGAGGCCCTCTCTACCCAGATACCGATG
      340     350     360     370     380     390

SHRRHO TCATACTCATGTGTTTCTCTATTGATCCCGGATTCGTTAGAAAAATATCCAGAAAAAT
      40      50      60      70      80      90
X: ::::: :: ::::: :: ::::: :: :::::
HUMRHOB TTATACTCATGTGTTTCTCTATCGACAGCCCTGATAGTTTAAAAAATATCCAGAAAAAT
      400     410     420     430     440     450

SHRRHO GGACG
      100
HUMRHOB GGACCCCAAGTCAAGCATTTCTGTCCCAACGTGCCCATCATCCTGTTGGGAATAAGA
      460     470     480     490     500     510

>YSCCDC42 5/91 Yeast CDC42 gene involved in developme 156 156 158
65.7% identity in 99 nt overlap

SHRRHO GACAGATTGAGGCCACTGCCTACCCCGAC
      10      20      30
X: ::::: :: ::::: :: :::::
YSCCDC42 TTGTTTGATACGGCGGTCAAGAAGATTACGATCGATTGAGACCCCTGTGCATATCCTTCT
      900     910     920     930     940     950

SHRRHO ACAGATGTCATACTCATGTGTTTCTCTATTGATCCCGGATTCGTTAGAAAAATATCCCA
      40      50      60      70      80      90
X: ::::: :: ::::: :: :::::
YSCCDC42 ACTGATGATTTTGGTTGTTTTCAGTGTATTCCACCCTCTTTTAAAAACGTTAAA
      960     970     980     990     1000    1010

SHRRHO GAAAAATGGACG
      100
YSCCDC42 GAAAAATGGTTCCCTGAAGTACATCACCAATTGTCAGGTGTACCATGCGTGGTCTGCGGT
      1020    1030    1040    1050    1060    1070

>HUMGPG25K 2/91 Human GTP-binding protein G25K mRNA, 142 142 151
64.6% identity in 99 nt overlap

SHRRHO GACAGATTGAGGCCACTGCCTACCCCGAC
      10      20      30
X: ::::: :: ::::: :: :::::
HUMGPG25K CTTTTTGATACTGCAGGGCAAGAGGATTACAGACATTACGACCGCTGAGTTATCCACAA
      240     250     260     270     280     290

SHRRHO ACAGATGTCATACTCATGTGTTTCTCTATTGATCCCGGATTCGTTAGAAAAATATCCCA
      40      50      60      70      80      90
X: ::::: :: ::::: :: :::::
HUMRHOB ACCGACGTCATTCTCATGTGTTTCTCTATTGATCCCGGATTCGTTAGAAAAATATCCCA
      150     160     170     180     190     200
```

```
HUMGPG ACAGATGTAATTTCTAGTCTGTTTTTCAGTGGTCTCTCCATCTTCATTTGAAAAACGTGAAA
      300     310     320     330     340     350

SHRRHO GAAAAATGGACG
      100
HUMGPG GAAAAGTGGGTGCCTGAGATAACTCACCAGTCCAAAGACTCCTTTCTGCTGTGTTGGG
      360     370     380     390     400     410

>HUMG25KA 9/90 Human GTP-binding protein (G25K) mRNA, 142 142 151
64.6% identity in 99 nt overlap

SHRRHO GACAGATTGAGGCCACTGCCTACCCCGAC
      10      20      30
X: ::::: :: ::::: :: :::::
HUMG25KA CTTTTTGATACTGCAGGGCAAGAGGATTACAGACATTACGACCGCTGAGTTATCCACAA
      170     180     190     200     210     220

SHRRHO ACAGATGTCATACTCATGTGTTTCTCTATTGATCCCGGATTCGTTAGAAAAATATCCCA
      40      50      60      70      80      90
X: ::::: :: ::::: :: :::::
HUMG25KA ACAGATGTAATTTCTAGTCTGTTTTTCAGTGGTCTCTCCATCTTCATTTGAAAAACGTGAAA
      230     240     250     260     270     280

SHRRHO GAAAAATGGACG
      100
HUMG25KA GAAAAGTGGGTGCCTGAGATAACTCACCAGTCCAAAGACTCCTTTCTGCTGTGTTGGG
      290     300     310     320     330     340

>YSCRHO1X 6/87 Yeast (S.cerevisiae) ras-related RHO1 138 138 232
76.0% identity in 100 nt overlap

SHRRHO GACAGATTGAGGCCACTGCCTACCCCGAC
      10      20      30
X: ::::: :: ::::: :: :::::
YSCRHO1X CTATGGGATACCGCTGGTCAAGAAGATTATGATAGACTAAGACCATTTGCATACCCAGAC
      290     300     310     320     330     340

SHRRHO ACAGATGTCATACTCATGTGTTTCTCTATTGATCCCGGATTCGTTAGAAAAATATCCCA
      40      50      60      70      80      90
X: ::::: :: ::::: :: :::::
YSCRHO1X TCCAATGTCGATTAATTTGTTTCTCTATCGATCTTCCAGATTTTATAGAGAATGTACAA
      350     360     370     380     390     400

SHRRHO GAAAAATGGACG
      100
YSCRHO1X GAAAATGGATTGCCGAAGTATTACATTTCTGTCAAGGTGTGCCAATTATTCTGTGTTGGT
      410     420     430     440     450     460

>HUMRHOA 8/86 Human ras-related rho mRNA (clone 6), p 135 135 214
73.7% identity in 99 nt overlap

SHRRHO GACAGATTGAGGCCACTGCCTACCCCGAC
      10      20      30
X: ::::: :: ::::: :: :::::
HUMRHOA CTGTGGGACACGGCGGGCCAGGAGACTACGACCGCTGCGGCCGCTCTCTACCCGGAC
      90      100     110     120     130     140

SHRRHO ACAGATGTCATACTCATGTGTTTCTCTATTGATCCCGGATTCGTTAGAAAAATATCCCA
      40      50      60      70      80      90
X: ::::: :: ::::: :: :::::
HUMRHOB ACCGACGTCATTCTCATGTGTTTCTCTATTGATCCCGGACTGCTGGAGAATATCCCC
      150     160     170     180     190     200
```



```

      40      50      60      70      80      90
SHRRHO ACAGATGCATACTACTCATGTGTTCTCTATTGATCCCCGGATTGTTAGAAAAATATCCCA
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
HUMRHO ACTGATGCATCCTCATGTGCTTCTCCATCGACAGCCCTGACAGCTGGAAAAACATTCCT
      230      240      250      260      270      280

      100
SHRRHO GAAAAATGGACG
      :: :: :: :: ::
HUMRHO GAGAAGTGGACCCAGAGGTGAAGCACTTCTGCCCAACGTGCCCATCATCTGGTGGGG
      290      300      310      320      330      340

>HS4 6/88 Epstein-Barr virus (EBV) B95-8 strain, comp 107 50 56
62.5% identity in 48 nt overlap

      10      20      30
SHRRHO GACAGATTGAGGCCACTGTCCTACCC--CGACAC
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
HS4 TGGCAGGATGGCGCTCTCCGGGCACGTCTTGATAGACCCCGCCGACTGCCAGGGACAC
      14541

      40      50      60      70      80      90
SHRRHO AGATGCATACTACTCATGTGTTCTCTATTGATCCCCGGATTGTTAGAAAAATATCCAGA
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
HS4 AGGCCCCGAACACTCATGTGGGCCCCAAGCCTTCGCAACTCACTGGGGGTGTCGCCGAAGC
      14547

>SPICPSO213 9/89 Spinach chloroplast DNA inversion co 92 64 64
82.6% identity in 23 nt overlap

      50      60      70      80      90      100
SHRRHO GTGTTTCTCTATTGATCCCCGGATTGTTAGAAAAATATCCAGAAAAATGGACG
      X :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
SPICPS TTTCATATACTAGGGGATTTCACCTGGAAAAGAAAATGTTCCATACTAATGGATCCGGGT
      5050      5060      5070      5080      5090      5100

SPICPS CCATAACCATGGGTTCCAATGTACGAGATCTTGTAGCATTATCAACGAGGCCCTATCGA
      5110      5120      5130      5140      5150      5160

>PIFHNFD 6/89 Parainfluenza-3 virus transcriptase (L 91 64 64
82.6% identity in 23 nt overlap

      50      60      70      80      90      100
SHRRHO GTGTTTCTCTATTGATCCCCGGATTGTTAGAAAAATATCCAGAAAAATGGACG
      X :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
PIFHNF ATCAAAACTTAAAGATGTGACTCTTGGAAGAAAATAATCTATTAATGGATCATTTT
      9820      9830      9840      9850      9860      9870

PIFHNF ATCAAGAAGAAAAATAATGAATGGTTACATCATGAAATCAAGAAGGGGAAAGAGATTA
      9880      9890      9900      9910      9920      9930

>RATALDRED 1/92 Rat aldose reductase gene, complete c 86 56 60
72.4% identity in 29 nt overlap

      10      20      30      40      50
SHRRHO GACAGATTGAGGCCACTGTCCTACCCCGACACAGATGCATACTCATGTGTTTCTCTA
      : : : : X :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
RATALD AGTTAAAGTGGGTAATGTATATGGTGAATAAGAAACAAGTCATAGACTTGTCTTCTCTG
      2230      2240      2250      2260      2270      2280

      60      70      80      90      100
SHRRHO TTGATCCCCGGATTGTTAGAAAAATATCCAGAAAAATGGACG
RATALD AATGTGTTTCTAAGCCAGTAGATTAGCAAGTGGCGCTTTCGTTTCCCTCCAAAGGGTCTCT
      2290      2300      2310      2320      2330      2340

```

Library scan: 0:09:59 total CPU time: 0:10:03

[IFREMER.BATCH]RHOAAC01.TXT

SHRRHOAA .dat, 34 aa vs DB:[bisance.gcgcgpcr]protein.seq library
using protein matrix

N B R F 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:-----
```

1181134 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 *Gb protein - Bovine 182 182 182
;TVGAAC Transforming protein (rho) - Sea hare (Aplysia 182 182 182
;TVHURH Transforming protein (rhoB) - Human 178 178 178
;A39727 *Immediate-early protein rhoB, ras-like - Rat 178 178 178
;TVBYH1 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
;A32119 Transforming protein homolog (rho) - Bovine (f 145 145 153
;A36030 *Cell division control protein 42 - Yeast (Sac 143 143 143
;G36364 *GTP-binding protein Rac2 - Dog 141 141 141
;A34386 *rac1 protein - Human 141 141 141
;TVHUC1 Transforming protein (ras, teratocarcinoma clo 141 141 141
;B34386 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 DRLRPLSYPDVDVILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::
H36364 TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDVDVILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90
```

```
SHRRHO EKWT
:::X
H36364 EKWTPEVKHFPCNPVPIILVGNKKDLRQDEHTRRELAKMKQEPVKPEGRDMANRIGAFGY
100 110 120 130 140 150
```

```
;TVHURC Transforming protein (rhoC) - Human 182 182 182
100.0% identity in 34 aa overlap
```

```
SHRRHO DRLRPLSYPDVDVILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::
TVHURC TVFENYIADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDVDVILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90
```

```
SHRRHO EKWT
:::X
TVHURC EKWTPEVKHFPCNPVPIILVGNKKDLRQDEHTRRELAKMKQEPVRESEGRDMANRISAFGY
100 110 120 130 140 150
```

```
;TVHU12 Transforming protein (rhoA) - Human 182 182 182
100.0% identity in 34 aa overlap
```

```
SHRRHO DRLRPLSYPDVDVILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::
TVHU12 TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPDVDVILMCFSIDSPDLENIP
40 50 60 70 80 90
```

```
SHRRHO EKWT
:::X
TVHU12 EKWTPEVKHFPCNPVPIILVGNKKDLRQDEHTRRELAKMKQEPVKPEGRDMANRIGAFGY
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 DRLRPLSYPDVDVILMCFSIDSPDLENIP
X::::::::::::::::::::::::::::
```

alignement FASTA protéique de psh-rho1

G38625 TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 40 50 60 70 80 90
 X::::::::::::::::::::::::::::

SHRRHO EKWT
 ::X

G38625 EKWTPEVKHFCPNVPIILVGNKKTAGDENTRRELAKMKQEPVKPDDAKEMGSRIKAFGYL
 100 110 120 130 140 150

;A33518 *Gb protein - Bovine 182 182 182
 100.0% identity in 34 aa overlap

SHRRHO 10 20 30
 DRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 X::::::::::::::::::::::::::::

A33518 TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 40 50 60 70 80 90

SHRRHO EKWT
 ::X

A33518 EKWTPEVKHFCPNVPIILVGNKKTDLRNDENTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGY
 100 110 120 130 140 150

;TVGAAC Transforming protein (rho) - Sea hare (Aplysia 182 182 182
 100.0% identity in 34 aa overlap

SHRRHO 10 20 30
 DRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 X::::::::::::::::::::::::::::

TVGAAC TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 40 50 60 70 80 90

SHRRHO EKWT
 ::X

TVGAAC EKWTPEVRHFCPNVPIILVGNKKTDLRNDSTKRELMKMKQEPVVRPEDGRAMAEKINAYS
 100 110 120 130 140 150

;TVHURH Transforming protein (rhoB) - Human 178 178 178
 97.0% identity in 33 aa overlap

SHRRHO 10 20 30
 DRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 X::::::::::::::::::::::::::::

TVHURH TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 40 50 60 70 80 90

SHRRHO EKWT
 ::X

TVHURH EKWVPEVKHFCPNVPIILVANKKDLRSDHEVRTLARMKQEPVRTDDGRAMAVRIQAYDY
 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 10 20 30
 DRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 X::::::::::::::::::::::::::::

A39727 TVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 40 50 60 70 80 90

SHRRHO EKWT
 ::X

A39727 EKWVPEVKHFCPNVPIILVANKKDLRSDHEVRTLARMKQEPVRTDDGRAMAVRIQAYDY
 100 110 120 130 140 150

;TVBYH1 Transforming protein (rho-1) - Yeast (Saccharo 158 158 158
 78.8% identity in 33 aa overlap

SHRRHO 10 20 30
 DRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 X::::::::::::::::::::::::::::

TVBYH1 TVFENYVADIEVDGRRVELALWDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 50 60 70 80 90 100

SHRRHO EKWT
 ::X

TVBYH1 EKWIAEVLHFCQGVPIILVGNKKTDLRNDPQTIEQLRQEGQPVTSEQEGQSVADQIGATGY
 110 120 130 140 150 160

;A36382 *GTP-binding protein G25K - Human 146 146 146
 72.7% identity in 33 aa overlap

SHRRHO 10 20 30
 DRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 X::::::::::::::::::::::::::::

A36382 TVFDNYAVTVMIGGEPYTLGLFDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 40 50 60 70 80 90

SHRRHO EKWT
 ::X

A36382 EKWVPEITHHCPTKPFLLVGTQIDLRDDPSTIEKLAKNKQKPIPTETAELKARDLKAVKY
 100 110 120 130 140 150

;A39265 *GTP-binding protein G25K - Human 146 146 146
 72.7% identity in 33 aa overlap

SHRRHO 10 20 30
 DRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 X::::::::::::::::::::::::::::

A39265 TVFDNYAVTVMIGGEPYTLGLFDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 40 50 60 70 80 90

SHRRHO EKWT
 ::X

A39265 EKWVPEITHHCPTKPFLLVGTQIDLRDDPSTIEKLAKNKQKPIPTETAELKARDLKAVKY
 100 110 120 130 140 150

;A32119 Transforming protein homolog (rho) - Bovine (f 145 145 153
 94.1% identity in 34 aa overlap

SHRRHO 10 20 30
 DRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 X::::::::::::::::::::::::::::

A32119 XLLIVFYVADIEVDGQVELALDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDLENIP
 10 20 30 40 50 60

SHRRHO EKWT
 X ::

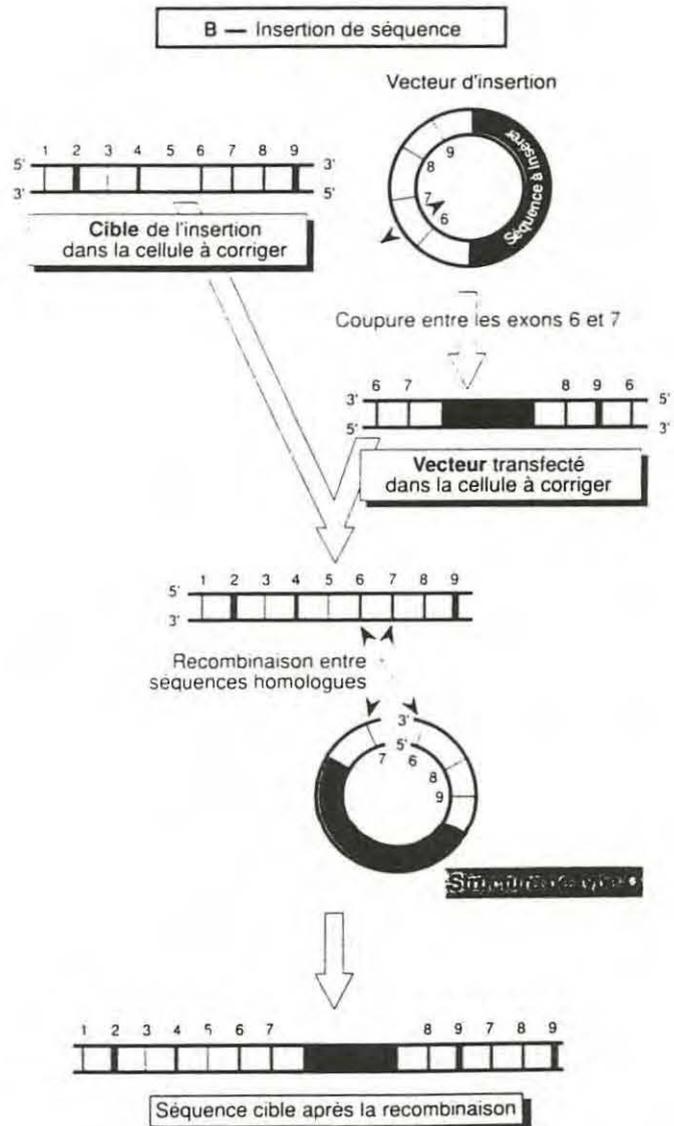
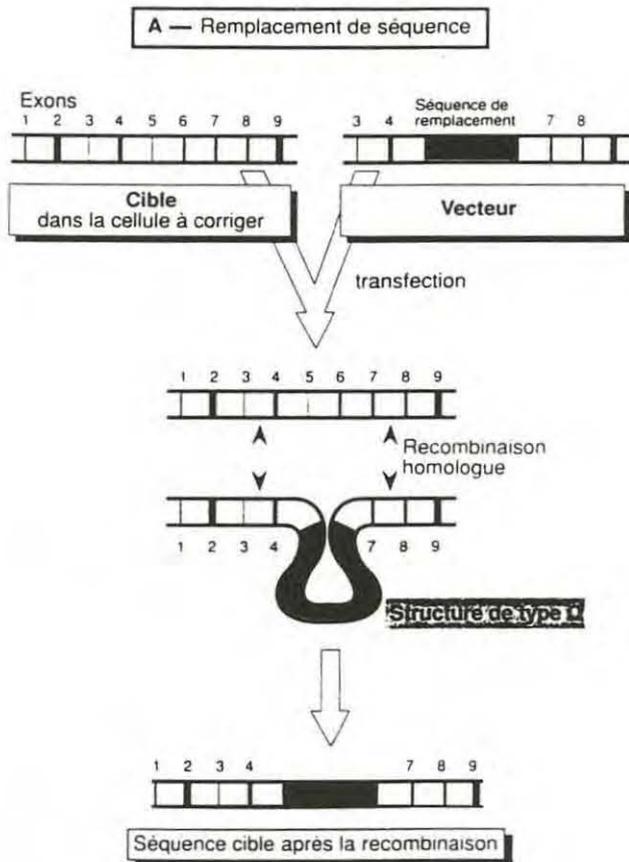
A32119 E-WTPEVKMKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMEXSAKEVFEMATR
 70 80 90 100

;A36030 *Cell division control protein 42 - Yeast (Sac 143 143 143
 72.7% identity in 33 aa overlap

10 20 30

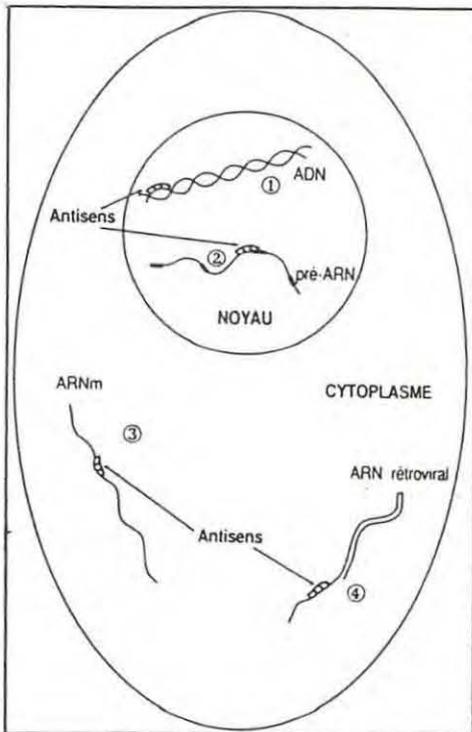
Ciblage génique par recombinaison homologue (d'après Thomas et Capecchi, 1987)

- A. La technique par remplacement: la recombinaison permet l'introduction de la séquence souhaitée et l'élimination de l'ADN génomique compris entre les zones homologues 4 et 7
- B. La technique par insertion: la séquence souhaitée a été introduite et les exons 7, 8 et 9 ont été dupliqués.

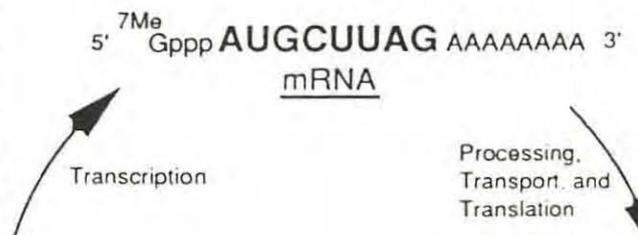


Stratégies d'inhibition de gènes par antisens.

L'expression normale d'un gène (haut du schéma) peut être spécifiquement supprimée par l'hybridation d'un nucléotide antisens complémentaire à sa cible ARNm (milieu du schéma). Le nucléotide antisens peut être un ARN antisens transcrit *in vivo* à partir d'une séquence inversée, un oligonucléotide de synthèse ou un ARNn synthétisé *in vitro*.



TARGET GENE



Gene Fragment Excised, Inverted, and Reinserted



"FLIPPED GENE" ANTI-SENSE PLASMID

