

IUT DE BIOLOGIE  
De LA ROCHELLE  
2003-2004

IFREMER  
BIBLIOTHEQUE  
LA TREMBLADE

Claire BRUNETIERE

65834.  
E800-BML.E.  
OU 2380.

Etude de l'immunité antivirale  
chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.



IFREMER/O.BARBAROUX

Stage réalisé au Laboratoire de Génétique et Pathologie  
17390 Ronce les Bains  
sous la direction de Tristan RENAULT

Ifremer

## SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
----------	---

INTRODUCTION	3
--------------	---

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	6
--------------------------	---

I - HERPÈSVIRUS CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES	6
II - MÉCANISMES DE DÉFENSE CHEZ LES BIVALVES	7
A - MÉCANISMES DE DÉFENSE À MÉDIATION CELLULAIRE	8
Phagocytose	8
Apoptose ou mort cellulaire programmée	8
B - MOLÉCULES SOLUBLES IMPLIQUÉES DANS LA RÉPONSE IMMUNITAIRE	9
Hydrolases lysosomales	9
Lectines	10
Cytokines	10
Phénoloxydase	10
Protéines de stress	10
Oxyde nitrique synthétases (NOS)	11
Molécules antibactériennes	11
Molécules antivirales	11

MATERIEL ET METHODES	12
----------------------	----

NOTE LIMINAIRE	12
I - PRODUCTION DE LARVES AXÉNIQUES	13
II - INFECTION EXPERIMENTALE DE LARVES AXENIQUES	13
III - MISE EN CULTURE D'HEMOCYTES ET CONTACT AVEC LES BROYATS DE LARVES INFECTÉES	14
IV - EXTRACTION D'ARN DES HEMOCYTES	14
V - PRODUCTION D'ADN COMPLEMENTAIRE (ADNc)	14
VI - TECHNIQUE SSH (SUPPRESSIVE AND SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION)	15
VII - CLONAGE ET HYBRIDATION SUR MEMBRANE	18
VIII - SEQUENCAGE	19

<u>RESULTATS</u>	<u>20</u>
I - PRODUCTION DE LARVES AXENIQUES ET INFECTION EXPERIMENTALE	20
II - OBTENTION DES HEMOCYTES	21
III - MISE EN CULTURE ET EXTRACTION D'ARN	25
IV - CLONAGE ET HYBRIDATION SUR MEMBRANE	25
<u>DISCUSSION</u>	<u>28</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>30</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>35</u>

## INTRODUCTION

Même si l'élevage de coquillages concerne un nombre limité d'espèces dont la plupart sont des mollusques bivalves, la conchyliculture représente à l'échelle mondiale et en France une activité dont les enjeux économiques sont importants. En France, la conchyliculture produit 200 000 tonnes de coquillages annuellement, représentant un chiffre d'affaire de 3 milliards d'euros. Ainsi en 2000, la production française de palourdes, de moules et d'huîtres représentait 29,8% du tonnage de la production européenne de coquillages et 39,6% du chiffre d'affaire (CA) de l'aquaculture mondiale (Food and Agriculture Organisation, (FAO) 2002). En France, l'activité ostréicole concerne principalement deux espèces d'huître : l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, avec 133 500 tonnes et l'huître plate, *Ostrea edulis*, avec 2000 tonnes en 2000. Ces deux espèces représentaient alors 66% du tonnage des coquillages d'intérêt économique produit en France (FAO). L'ostréiculture est donc une activité à grand intérêt économique en France. De plus, elle a également un impact écologique sur le littoral. Pour ces raisons, l'ostréiculture en France, est considérée par les autorités publiques et les entreprises privées comme une activité à soutenir en terme de recherche fondamentale et appliquée.

La production française est basée sur le captage de juvéniles dans le milieu naturel, appelé captage naturel. Pour pallier le caractère souvent aléatoire de ce captage naturel, des techniques d'élevage ont été développées en milieu confiné. En effet, durant les dernières décennies, des progrès zootecniques considérables ont été réalisés, notamment grâce à une meilleure connaissance de la biologie des bivalves (Loosanoff et Davis, 1963; Dechauville, 1989). De plus, les professionnels de l'ostréiculture peuvent aujourd'hui avoir recours à des productions de larves et de naissains issus d'élevages intensifs. Ils trouvent alors une certaine indépendance par rapport aux pontes naturelles (captage naturel). Le confinement des populations et le transfert d'animaux entre bassins et pays sont fréquents (Héral, 1985). L'eau constitue un formidable vecteur favorisant les flux intra- et interspécifiques de virus et d'autres pathogènes. Les caractéristiques de la conchyliculture rendent donc les productions sensibles aux maladies infectieuses et l'intensification des conditions de culture peut être associée à l'émergence et à la propagation de maladies. Ainsi, plusieurs maladies d'origines virales affectant les bivalves, ont été détectées (Farley et al., 1972). Notamment, des virus décrits comme des iridovirus, ont été associés à la disparition de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, des eaux françaises au début des années 70. Des virus présentant une morphologie similaire à celle des virus de la famille des *Herpesviridae* ont été mis en évidence, pour la première fois en 1972, chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica* (Farley et al., 1972). Ce type de virus a été par la suite décrit, chez plusieurs espèces de bivalves marins dans le monde (Hine et al., 1992 ; Nicolas et al., 1992 ; Renault et al., 1994; Renault, 1998 ; Renault et al., 2000, Renault et al., 2001). Depuis 1991, de fortes mortalités de larves et de juvéniles ont été observées en France chez plusieurs espèces

d'huître, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* (Nicolas *et al.*, 1992 ; Comps et Cochenec, 1993 ; Renault *et al.*, 1994, ; Renault *et al.*, 2000) et en Nouvelle Zélande chez *Tiostrea chilensis* (Hine *et al.*, 1998). Ces mortalités ont été associées à la détection en microscopie électronique à transmission, de particules virales de type herpès associées à des lésions cellulaires importantes (Nicolas *et al.*, 1992, Renault *et al.*, 1994 ; Le Deuff, 1995 et Renault *et al.*, 2000). La caractérisation du génome viral, la morphologie, la taille, la localisation intranucléaire et cytoplasmique, mais également la réplication virale et la structure de la nucléocapside du virus infectant les larves de *Crassostrea gigas* ont confirmé l'appartenance de ce virus à la famille des *Herpesviridae* (Arzul et Renault, 2002 ). Il a été associé à cette famille en tant que nouveau membre et a été nommé Ostreid Herpesvirus de type 1 (OsHV-1) (Minson *et al.*, 2000 ; Arzul et Renault, 2002 ).

Des mortalités causées par le virus OsHV-1 sont régulièrement rapportées chez les larves et les juvéniles d'huître. Cependant, le virus OsHV-1 peut être présent chez les huîtres adultes, *C. gigas*, sans développer de maladie ni entraîner de mortalité (Arzul *et al.*, 2002). Hine et Thorne (1997) ont aussi détecté en Australie, un virus de type herpès dans les hémocytes d'huître plate adulte, *Ostrea angasi*, ne présentant pas de symptômes. Ces résultats suggèrent alors une certaine capacité d'OsHV-1 et des virus de type herpès infectant les bivalves, à persister dans l'hôte sans pour autant induire de symptômes ou la mort de l'animal. On suppose également que les animaux adultes transmettent le virus à leur descendance mais sont capables de se défendre par divers mécanismes (Le Deuff *et al.*, 1996 ).

Bien que l'impact des pathologies virales en aquaculture soit important, la prévention et les traitements antiviraux sont peu maîtrisés. De plus, les connaissances sur l'immunité des invertébrés marins face aux infections virales sont peu nombreuses (Renault, 1998 ; Arzul *et al.*, 2001; Renault *et al.*, 2001). L'immunité non spécifique, constituant la première barrière de défense chez les vertébrés (Du Pasquier, 2001), représente le seul mécanisme de l'immunité décrit à ce jour chez les bivalves marins (Salzet, 2001). De plus, les travaux ayant pour objet l'étude des mécanismes développés par les bivalves pour se défendre vis-à-vis de ces agents infectieux sont peu développés (Renault, 1998).

Il apparaît donc important de comprendre quel(s) mécanisme(s) de défense peut(vent) être mis en place chez les huîtres adultes, *C. gigas*, pour limiter et/ou contrôler les infections virales responsables de fortes mortalités aux stades larvaire et juvénile. L'étude de ces mécanismes devrait d'une part, contribuer à approfondir les connaissances sur l'immunité antivirale innée chez l'huître creuse, *C. gigas* et à développer de nouvelles approches qui pourraient permettre de contrôler l'impact de ces infections virales sur les productions conchyliques.

Dans ce cadre, la recherche de gènes cellulaires viro-induits, dans les hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas* au contact du virus OsHV-1 a été entreprise au LGP\*. Pour cela, les techniques de production de larves axéniques infectées et le maintien en culture d'hémocytes ont été utilisées et complétées par une approche moléculaire. Celle-

ci consiste à extraire des ARN à partir d'hémocytes, de produire des ADNc et d'identifier par SSH (Suppressive Subtractive Hybridization), les gènes cellulaires exprimés dans les cellules au contact du virus et non exprimés dans les cellules témoins.

\* : le travail réalisé dans le cadre de l'obtention du DUT s'est inscrit dans cette thématique plus générale développée au LGP. Du fait de la durée du stage réalisé, seuls certains aspects ont été développés. Cependant, par soucis de cohérence, le travail rapporté dans ce mémoire, a été intégré dans l'approche générale. Ainsi, les techniques et les étapes à proprement réalisées au cours de ce stage sont identifiées au chapitre MATERIEL ET METHODES.

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### I - HERPESVIRUS CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES

La première infection à virus de type herpès touchant un invertébré a été décrite en 1972, chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, aux Etats Unis (Farley et al., 1972). L'infection semblait être dépendante de la température. En effet, Farley et al., ont noté des mortalités importantes (52%) pour les lots d'huîtres placées à 28-30°C contre 18% pour celles placées à 12-18°C. Les analyses histologiques des huîtres infectées ont montré des inclusions intranucléaires dans le noyau des hémocytes. Une étude plus approfondie en microscopie électronique à transmission a mis en évidence, dans les inclusions, des particules virales de forme hexagonale, de 70 à 90 nanomètres de diamètre, ainsi que des particules virales enveloppées dans le cytoplasme des cellules infectées.

Ce n'est qu'à partir de 1991 que des mortalités massives, associées à la détection de virus de type herpès ont été de nouveau rapportées chez plusieurs espèces de bivalves marins dans différentes régions du monde. De fortes mortalités sporadiques ont été observées en France, depuis 1991, chez les larves et les juvéniles de *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*, issus d'écloserie mais aussi de captage naturel (Renault et al., 1994a). Ces mortalités ont été associées à la détection en microscopie électronique à transmission, de particules virales de type herpès chez les animaux infectés. Les épisodes de mortalités massives sont souvent observés pendant les périodes chaudes (Nicolas et al., 1992 ; Renault et al., 1994b, Renault et al., 2000a). De telles mortalités associées à ce virus, sont également rapportées chez d'autres espèces de bivalves et notamment chez la palourde européenne, *Ruditapes decussatus*, chez la palourde japonaise, *R. philippinarum*, mais aussi chez la coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus* (Renault et al., 1998 ; Renault et al., 2001). Pour des animaux âgés de moins d'un an (larves et juvéniles), les infections à herpèsvirus conduisent à la mort alors que les infections par ces mêmes virus ne semblent pas entraîner la mort chez les adultes. Cependant, ces virus sont détectés à ce stade de développement chez *Crassostrea gigas* (Arzul et al., 2002) et chez d'autres espèces (Hine et Thorne, 1997).

L'herpèsvirus de l'huître, appelé Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1), récemment identifié comme appartenant à la famille des *Herpesviridae* (Minson et al., 2000) et infectant les larves d'huître creuse, *C. gigas*, possède des caractéristiques communes aux autres virus de cette famille. Des capsides ont pu être observées dans le noyau des cellules infectées. La taille des nucléocapsides varie de 72 à 75 nm. Des analyses en cryomicroscopie de capsides purifiées à partir de larves infectées ont montré que ces particules virales présentaient des caractéristiques morphologiques des *Herpesviridae* au niveau de l'association d'hexamères et de pentamères (Arzul et Renault, 2002). Certaines capsides sont vides et d'autres contiennent des nucléoïdes. Des particules virales ont été aussi identifiées dans le cytoplasme. En position extracellulaire, les virions observés sont enveloppés et présentent parfois des projections à la surface de l'enveloppe (Renault, 1998). Le tégument est quant à lui, réduit par rapport à la plupart

des *Herpesviridae*. Cependant, il est connu que la taille du téguement est un élément variable pour les différents membres des herpèsvirus (Roizman et Furlong, 1974).

L'appartenance à la famille des *Herpesviridae* du virus OsHV-1 a été élucidée par l'étude des gènes ainsi que par sa structure. En effet, la présence du gène codant la terminase ainsi que la structure de la capsid de symétrie icosaédrique issue d'assemblage de 162 capsomères, ont permis de conclure à l'appartenance de ce virus à la famille des *Herpesviridae*. OsHV-1 est un nouveau membre de la famille des herpèsvirus. Il fait partie de la lignée des invertébrés dont il est le seul représentant aujourd'hui décrit. Cependant si OsHV-1 présente des homologues avec HSV-1 dans la structure et l'organisation de son génome (ADN double brin de grande taille), il n'en est pas de même quant aux séquences des gènes. La comparaison des séquences d'acides aminés n'a pas permis d'identifier des protéines présentant des homologues avec des protéines d'autres herpèsvirus, à l'exception de la terminase. Néanmoins il existe de telles différences entre les herpèsvirus de poissons et ceux des amphibiens ainsi qu'entre les herpèsvirus de mammifères et ceux des oiseaux.

La non disponibilité de lignée cellulaire provenant de bivalves marins ainsi que l'impossibilité d'infecter d'autres lignées cellulaires avec OsHV-1, ne nous permet pas actuellement d'étudier et d'observer le cycle de réplication de OsHV-1 (Le Deuff et al., 1994; Renault et al., 1995).

## II - MECANISMES DE DEFENSE CHEZ LES BIVALVES

Le système de défense, non spécifique des bivalves marins est essentiel à la survie de ces animaux qui ne produisent pas d'anticorps spécifiques. Ils doivent alors compter uniquement sur leurs défenses immunitaires innées. Rapides et efficaces, divers mécanismes se mettent ainsi en place dès la pénétration d'un pathogène dans l'organisme.

Chez les bivalves marins, le système circulatoire est semi ouvert, impliquant un contact avec le milieu extérieur et donc avec les différents pathogènes. L'hémolymphe est le liquide circulant dans l'organisme et les tissus des invertébrés. Ce liquide est composé d'une partie acellulaire appelé sérum et de cellules nommées hémocytes.

Deux grandes catégories hémocytaires sont distinguées : les hémocytes granuleux (granulocytes) et les hémocytes ne présentant pas de granulation (hyalinocytes). L'hétérogénéité des différents travaux sur les hémocytes, complique la classification de ces cellules. Cheng (1981) a proposé un schéma commun. Les hémocytes seraient composées de cellules granulocytes, hyalinocytes et de cellules séreuses. Parallèlement, Auffret (1989) décrit chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, trois types de granulocytes et deux types de hyalinocytes. Les hémocytes, notamment les granulocytes ainsi que les hyalinocytes sont impliquées de façon active dans la réponse immunitaire. Ils sont doués de phagocytose, principal mécanisme de défense chez les bivalves marins.

Le sérum joue lui aussi un rôle important dans les mécanismes de défense. Des études ont montré entre autres, la présence de protéines à activité anti-bactérienne, des hydrolases, des inhibiteurs de protéase et des enzymes lysosomales et particulièrement des lysozymes, dans la partie acellulaire de l'hémolymphe (Faisal et *al.*, 1998; Culloty et *al.*, 2002).

## A - MECANISMES DE DEFENSE A MEDIATION CELLULAIRE

### *Phagocytose*

Mis en évidence pour son rôle dans la nutrition, la phagocytose intervient également dans les mécanismes de défense (Cheng, 1977). La phagocytose est assurée par les hémocytes. Elle permet la neutralisation et l'élimination des pathogènes ainsi que des cellules anormales ou des débris. Les cellules phagocytaires permettent ainsi de limiter la prolifération des virus ou d'autres agents pathogènes. Les cellules à activité phagocytaire internalisent l'agent infectieux par endocytose. Il y a alors formation de phagolysosomes puis destruction de l'agent pathogène par libération d'agents cytotoxiques (Gourdon et *al.*, 1998). Il existe deux voies de destruction des particules internalisées. La première correspond à la libération d'enzymes lysosomales. La seconde voie est dépendante de l'oxygène, on parle de « flambée oxydative ». Elle correspond à la production de radicaux libres, formes intermédiaires réactives de l'oxygène et de la molécule de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Par ailleurs, le système oxyde nitrique synthétase (NOS) présent dans les cellules phagocytaires, est également impliqué. Les agents infectieux sont ensuite dégradés. Les granulocytes ainsi que les hyalinocytes sont des cellules douées de phagocytose. Cependant, les granulocytes sont considérés comme le type cellulaire le plus actif dans ce phénomène de phagocytose.

### *Apoptose ou mort cellulaire programmée*

Au cours de la multiplication cellulaire et de la différenciation, de nombreuses cellules sont produites en excès ou bien de façon anormale. La mort cellulaire intervient alors en détruisant et en éliminant ces cellules afin de maintenir un équilibre dans l'organisme. Cependant, elle est également activée en réponse à des infections par de nombreux virus (Ravzi et Welsh, 1995). Ses caractéristiques (Terahara et *al.*, 2003) correspondent à l'arrondissement des cellules, une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN cellulaire, des transformations comme le bourgeonnement au niveau des membranes cellulaires. Le contenu cellulaire est finalement détruit pour ensuite être phagocyté (Cohen, 1994). L'apoptose est une des principales réponses face à une infection virale, en empêchant ainsi la dissémination des agents pathogènes dans l'organisme. De nombreux facteurs externes (pathogènes, stress environnemental) sont susceptibles de déclencher ce phénomène apoptotique. En effet, l'apoptose constitue un type de mort cellulaire différent de la nécrose ou de la cytolyse. Contrairement à la nécrose, ce phénomène est un processus cellulaire actif.

Si la mort cellulaire programmée est utilisée afin de lutter contre les infections virales, certains virus sont capables d'utiliser ce mécanisme afin de persister dans la cellule (Cohen, 1994). Ces virus peuvent alors, induire ou inhiber l'apoptose. Le phénomène d'induction de l'apoptose est largement décrit chez les virus comme le VIH ou chez les *Herpesviridae*. A l'inverse, certains herpèsvirus sont capables d'inhiber le processus de mort cellulaire programmée leur permettant ainsi d'assurer une infection productive dans les cellules cibles. Les travaux de Terahara et al. (2003) mettent en évidence la présence d'un peptide cellulaire (Arg-Gly-Asp (RGD)) dans les hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, qui serait impliqué dans l'induction de l'apoptose.

Ce phénomène apoptotique, fondamental chez les vertébrés, a aussi été étudié chez les invertébrés et largement chez les insectes (Claveria et al., 1998; Ishikawa et al., 2003). Divers travaux de recherche ont permis de mettre en évidence le phénomène apoptotique chez les invertébrés, notamment chez les bivalves marins telles que la moule *Mytilus galloprovincialis* (Micic et al., 2001) ou la palourde *Ruditapes philippinarum* (Renault et al., 2001b). Ce phénomène a aussi été mis en évidence chez l'huître européenne, *Ostrea edulis*, et chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Renault et al., 2000a; Sunila et LaBanca, 2003; Terahara et al., 2003). Les travaux de Sunila et LaBanca (2003) montrent que les mécanismes d'apoptose pourraient prévenir des transmissions des maladies infectieuses chez l'huître américaine *Crassostrea virginica*.

## B - MOLECULES SOLUBLES IMPLIQUEES DANS LA REPONSE IMMUNITAIRE

Outre les propriétés des hémocytes et les différents mécanismes de défense énumérés, des molécules solubles sont aussi mises en jeu au cours des réponses immunitaires chez les bivalves marins.

### *Hydrolases lysosomales*

Les hydrolases lysosomales sont présentes à la fois dans les hémocytes et dans l'hémolymphe (Gourdon et al., 1998). L'effet hydrolytique de ces différentes enzymes, impliquées dans la dégradation des pathogènes, est un des mécanismes les plus importants rencontré chez les bivalves marins (Xue et Renault, 2000). Ces activités enzymatiques, proviendraient d'une dégranulation des granulocytes (Cheng, 1981). L'activité bactéricide du lysozyme est présente chez de nombreuses espèces de bivalves marins. Comme le lysozyme, la  $\beta$ -glucuronidase, la phosphatase acide, l'amylase, des peroxydases, des lipases et des estérases ont également été détectées dans l'hémolymphe de plusieurs espèces de bivalves marins (Xue et Renault, 2001).

Des inhibiteurs de protéase ont été détectés dans la partie acellulaire de l'hémolymphe de deux espèces d'huître, *Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica*. Les travaux, de Faisal et al. (1998), mettent en évidence chez *Crassostrea gigas*, espèce résistante au pathogène *Perkinsus marinus*, l'augmentation significative de l'activité inhibitrice des protéases du pathogène lorsque celui-ci lui a été injecté. Contrairement à cette

observation, l'injection de *P. marinus* à *Crassostrea virginica*, espèce sensible à ce pathogène, n'entraîne aucune détection d'activité inhibitrice de protéase de l'agent infectieux.

### *Lectines*

Les lectines sont des protéines qui s'attachent spécifiquement à des sucres. Elles sont détectées chez la quasi-totalité des organismes vivants. Chez les invertébrés, les lectines sont sous forme libre dans l'hémolymphe et le liquide tissulaire. Elles interviennent dans le mécanisme de phagocytose du fait de leur spécificité pour certains sucres (mannose, fructose). En effet, les lectines sont présentes sur les saccharides terminaux des glycoprotéines observées à la surface des agents pathogènes. Dans ces conditions, elles reconnaissent des ligands exogènes, elles fonctionnent alors comme des opsonines (Arason, 1996).

### *Cytokines*

Les cytokines sont de petites protéines solubles produites par une cellule, qui modifient le comportement d'une autre cellule. Ces médiateurs sont libérés après contact avec des constituants étrangers, notamment par les cellules phagocytaires. Elles forment un groupe très diversifié de molécules ayant de multiples activités sur différents types de cellules. Les cytokines de type interleukines (IL) et facteur nécrosant les tumeurs (TNF) ont été détectées dans l'hémolymphe et les hémocytes de moules *Mytilus edulis* (Hughes et al., 1990, 1991). Cependant, les cytokines de type interférons (IFN), reconnus pour leur activité antivirale sur des cellules somatiques chez les vertébrés, n'ont pas été détectées chez les bivalves jusqu'à ce jour.

### *Phénoloxydase*

Le système prophénoloxydase-phénoloxydase a pu être mis en évidence chez les bivalves marins. La phénoloxydase est une enzyme dépendante du cuivre et existe dans les cellules sous forme d'un précurseur, la prophénoloxydase. Ce précurseur est activé sous l'action de lipopolysaccharides via une cascade de sérines protéases pour aboutir à la formation de phénoloxydase. Cette enzyme catalyse alors la réaction de conversion de substrats phénoliques en quinones pour ensuite conduire à la biosynthèse de mélanine (Gourdon et al., 1998). Les composés formés semblent être impliqués dans les mécanismes de reconnaissance de particules étrangères et d'opsonisation lors de la phagocytose et de la communication intercellulaire (Söderhall, 1992). L'activité phénoloxydase a pu être mise en évidence dans les hémocytes de moules *Mytilus edulis* (Coles et Pipe, 1994), *Mytilus galloprovincialis* (Carballal et al., 1997), et *Perna viridis* (Asokan et al., 1997). Elle a aussi été détectée chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Luna-Gonzalez et al., 2003).

### *Protéines de stress*

Les protéines de stress ou HSP (Heat Shock protein) contribuent également aux mécanismes de défense des bivalves marins (Tirard et al., 1997 ; Lacoste et al., 2001).

Elles sont produites en réponse à un stress physique, chimique ou biologique. En 1988, Steinert et *al.* ont mis en évidence une production de HSP dans les tissus de moule de *Mytilus edulis*, soumise à une température élevée et en présence de métaux lourds.

#### *Oxyde nitrique synthétases (NOS)*

Les oxydes nitriques synthétases (NOS) catalysent la production d'oxyde nitrique à partir de la L-arginine en utilisant le NADPH comme cofacteur. Ces NOS sont des radicalaires qui peuvent réagir avec d'autres radicaux comme les superoxydes et former un oxydant fort, le peroxydinitrite (NO) qui agit comme un bactéricide puissant (Gourdon et *al.*, 1998). Les travaux de Ottaviani et *al.* (1993) ont décelé la présence de NO synthétase dans les hémocytes de moules *Mytilus edulis* et ont mis en évidence le rôle bactéricide du NO produit.

#### *Molécules antibactériennes*

A partir de l'hémolymphe de moule, Mitta et *al.* (2000), ont pu caractériser plusieurs petits peptides antimicrobiens de nature cationique et riches en cystéine. Ces peptides seraient synthétisés dans les granulocytes et libérés dans le sérum de l'hémolymphe à la suite d'un contact avec des bactéries (Mitta et *al.*, 1999). Ces peptides seraient divisés, sur la base de leur structure primaire, en quatre groupes : les Défensines qui présentent des homologies avec la famille des Défensines isolées chez les arthropodes, les Mytilines, les Myticines et les Mytimycines. Ils ont tous été isolés chez les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*. Ces peptides présentent un large spectre, affectant aussi bien les bactéries que les champignons ou les levures

#### *Molécules antivirales*

Chez la moule, *Mytilus edulis*, des activités antivirales ont été observées par Limasset (1961). Ces travaux sont parmi les premiers à rapporter une activité antivirale contre le virus de la mosaïque du tabac (VMT) dans des extraits de moule (*Mytilus edulis*), de clam (*Mercenaria mercenaria*), et d'huître (*Crassostrea gigas*). A la même époque, Li et *al.* (1965) ont étudié les activités antivirales chez les bivalves marins. Les études menées sur ce sujet ont mis en évidence une activité antivirale dans des extraits de glande digestive de clam, *Mercenaria mercenaria*. Ce même extrait inhibe, chez le hamster, la formation de tumeur par un virus oncogène, un adénovirus de type 12, (Li et *al.*, 1965, 1968). Plus tard, cette même équipe a précisé que l'inhibition du virus oncogène par l'extrait de glande digestive de clam correspondait à une activité intracellulaire (Li et *al.*, 1972a). Cette molécule serait une protéine nommée Paolin. Prescott et *al.* (1966) ont isolé une molécule de type Paolin dans des extraits d'huître. En 1990, Bachère et *al.* mettent en évidence *in vitro* une substance issue de sérum d'hémolymphe de *Crassostrea gigas* adultes, capable de neutraliser l'activité de coliphage T3. Cette activité serait due à une serine protéase.

## MATERIEL ET METHODES

### NOTE LIMINAIRE

Dans le cadre d'un programme européen (AVINSI, QLK2-CT-2002-01691), le LGP est impliqué dans la recherche de gènes cellulaires viro-induits chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Un ensemble de techniques est utilisé à cette fin (Figure 1). Ces techniques sont rapportés dans ce chapitre. Cependant, elles n'ont pas toute été utilisées au cours de ce stage (Figure 1).

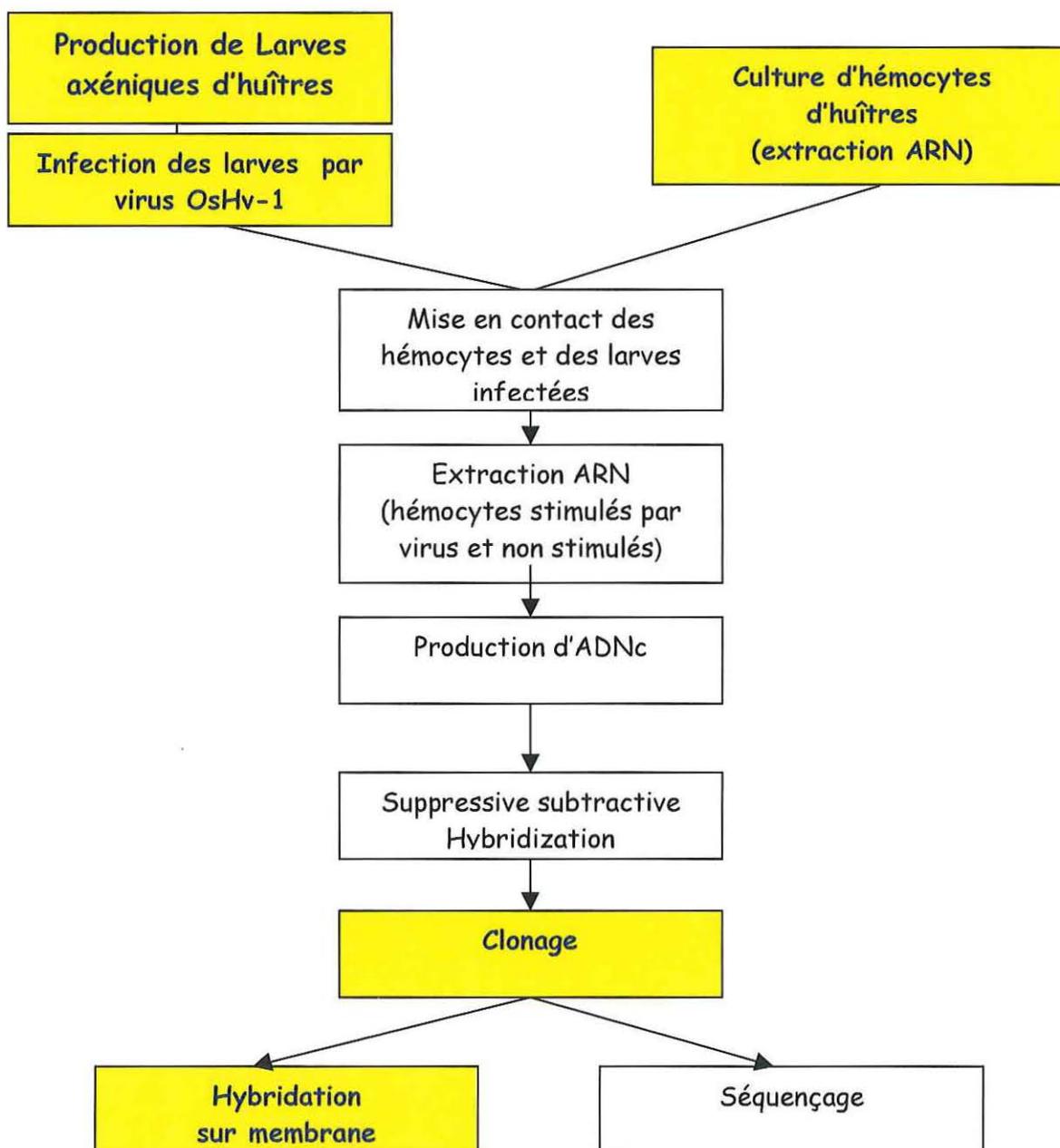


Figure 1 : Schéma récapitulatif des différentes étapes du protocole général, (les étapes sur fond jaune ont été réalisées au cours de ce stage).

## I - PRODUCTION DE LARVES AXENIQUES

L'obtention d'œufs fécondés, est effectuée en conditions stériles. Les géniteurs sont lavés et brossés sous l'eau courante, puis la surface de la coquille est désinfectée par un bain d'alcool à 70%. Les huîtres sont ensuite séchées sous une hotte à flux laminaire. Les huîtres ouvertes de manière stérile sont rincées à l'eau de mer filtrée et autoclavée, additionnée de Tween 80 (0.1%), puis à l'eau de mer stérile (filtrée à 0.22  $\mu\text{m}$  et autoclavée). La différenciation et la sélection des géniteurs s'effectuent par observation microscopique des gamètes prélevées dans la gonade. Les individus sélectionnés (ovocytes en forme de poire et spermatozoïdes mobiles), sont traités à la Bétadine (10%). Après scarification de la gonade, les spermatozoïdes et les ovocytes sont aspirés à l'aide d'une pipette stérile et distribués séparément dans deux Erlen Meyer contenant 200 mL d'eau de mer stérile.

La fécondation est réalisée avec un rapport de 15 spermatozoïdes pour 1 ovocyte, pendant environ une heure et à température constante de 23-24°C. Les ovocytes fécondés sont alors comptés sur cellule de Sedgewick. Ils sont ensuite distribués à raison de 1000 œufs par mL, sous une hotte à flux lumineuse, dans huit flacons de 500 mL contenant de l'eau de mer stérile, complémentée en antibiotiques (Annexe 1). Les larves axéniques obtenues se développent, sans apport de nourriture et sans bullage, à une température constante de 23-24°C.

## II - INFECTION EXPERIMENTALE DE LARVES AXENIQUES

Le principe consiste à inoculer des larves axéniques avec un ultrafiltrat de larves infectées afin de reproduire l'infection virale.

Un échantillon de larves (RS2 juin 2004) provenant de la station IFREMER de Ronce les Bains, contrôlées positives sont reprises dans 300  $\mu\text{L}$  d'eau de mer stérile. Les 510 mg de matériel biologique dilué sont ensuite broyés au piston-Pellet stérile et repris dans 10 mL d'eau de mer filtrée et autoclavée. Après centrifugation (2000 trm, 10 minutes à 4°C) le surnageant est récupéré, filtré à 0.22  $\mu\text{m}$  et réparti dans quatre des huit flacons contenant les larves axéniques. Les quatre flacons restants servent de témoin négatif. A chaque étape de la préparation et de l'inoculation de broyat, des prélèvements sont réalisés et conservés au congélateur pour des analyses en PCR.

### III - MISE EN CULTURE D'HEMOCYTES ET CONTACT AVEC LES BROYATS DE LARVES INFECTEES

Les huîtres sont ouvertes avec précaution et, l'hémolymphe est prélevée dans la cavité péricardique ou dans le muscle adducteur à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille de 0.6\*25 mm. Les hémolymphe prélevées sur l'ensemble des huîtres sont regroupées et maintenues dans la glace de manière à éviter l'agrégation des hémocytes. La concentration en hémocytes est définie à l'aide d'une cellule de Malassez afin de déterminer le volume d'hémolymphe à distribuer dans les fioles de culture cellulaire de 25 cm<sup>2</sup>. Après ensemencement des fioles, le contenu de chacune d'elles, est observé au microscope inverse et mis à incuber 1 heure à 15°C. Après incubation, un tapis cellulaire est observable au fond de chaque fiole. L'hémolymphe est aspirée délicatement, puis filtrée à 0.22 µm. Elle est répartie dans chacune des fioles afin d'être mise à incuber 12 heures ou une nuit à 15°C.

### IV - EXTRACTION D'ARN DES HEMOCYTES

Après une incubation d'environ 12 heures, les cultures d'hémocytes sont observées. Le milieu liquide est aspiré de manière à ne conserver que le tapis cellulaire au fond de la fiole. Les cellules sont lavées au PBS 1X à deux reprises (à 4°C), puis lysées par une solution de Trizol (1mL de Trizol pour 10 cm<sup>2</sup>). L'extraction des ARN est réalisée au chloroforme alcool isoamylique (Annexe 2). La concentration en ARN des échantillons (en µg/mL) est mesurée par spectrophotométrie. La qualité de l'échantillon est appréciée par électrophorèse sur gel dénaturant (Annexe 3).

### V - PRODUCTION D'ADN COMPLEMENTAIRE (ADNc)

Les ARN totaux précédemment extraits sont utilisés pour synthétiser des ADN complémentaires (ADNc). Ainsi, il devient possible de produire des ADNc de haute qualité à partir d'une quantité minimale d'ARN. Cette phase est réalisée à l'aide du kit « SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit » (Figure 2).

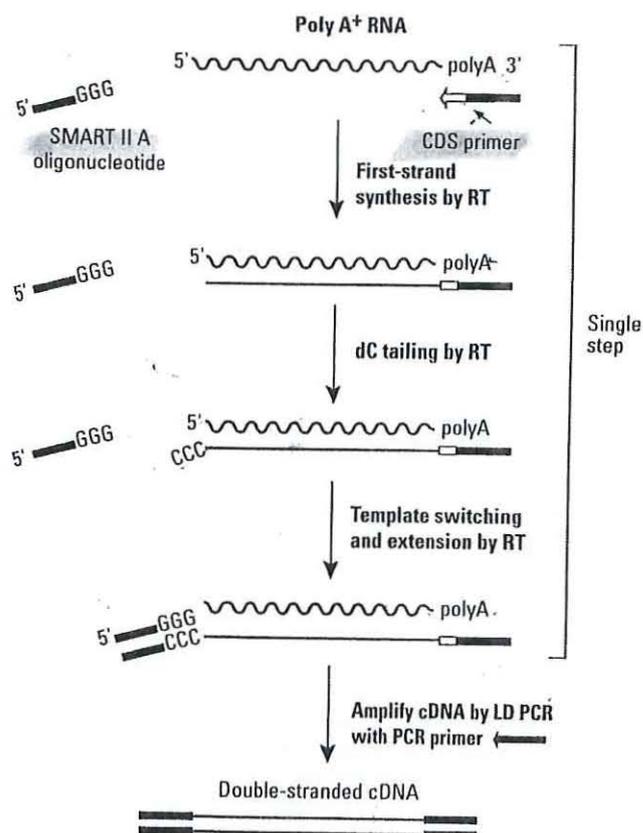


Figure 2: Représentation schématique de la production d'ADNc (SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit User Manual)

## VI - TECHNIQUE SSH (SUPPRESSIVE AND SUBRACTIVE HYBRIDIZATION)

La technique « subtractive hybridization » permet de comparer deux populations d'ARNm et d'obtenir des gènes uniquement exprimés dans l'une des deux populations. Pour cela, les ARNm doivent être convertis en ADNc divisés en deux catégories. Le « driver » (séquence de référence) correspond à l'ADNc issu des hémocytes contrôlés et le « tester » représente l'ADNc des hémocytes au contact du virus OsHv-1. Après avoir synthétisé l'ADNc à partir de l'ARNm, les tester et driver sont digérés séparément par l'enzyme de restriction (Rsa I), puis liés à des adaptateurs spécifiques. Les produits obtenus subissent alors deux hybridations successives. Une fois, les deux populations d'ADNc hybridées, les hybrides sont éliminés de façon à ne conserver que les séquences non hybridées (Figure 3). Les fragments exprimés uniquement dans la population « tester » sont amplifiés. La procédure « Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction » est schématisée en Figure 4. La dernière étape de cette technique aboutie donc à l'obtention de produits de PCR (Nested PCR) qui sont ensuite clonés.

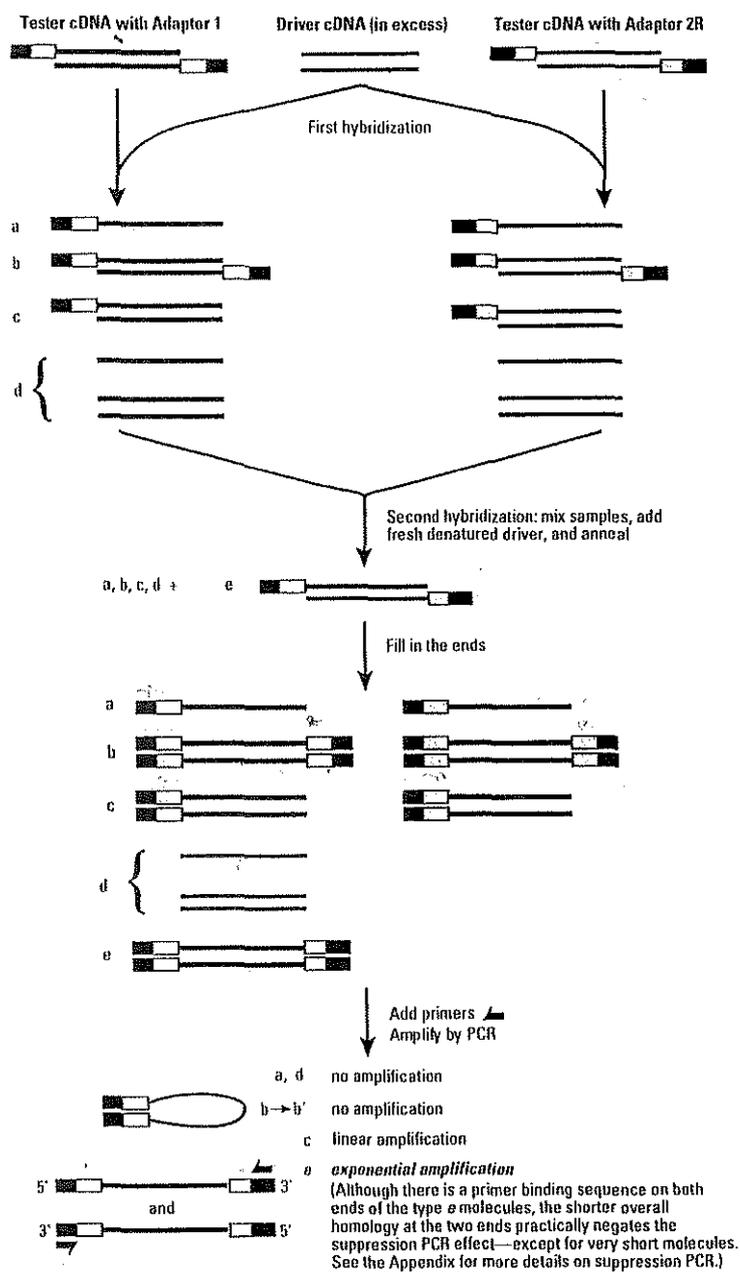


Figure 3 : Diagramme schématique de la PCR-Select cDNA subtraction (Clontech PCR Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual).

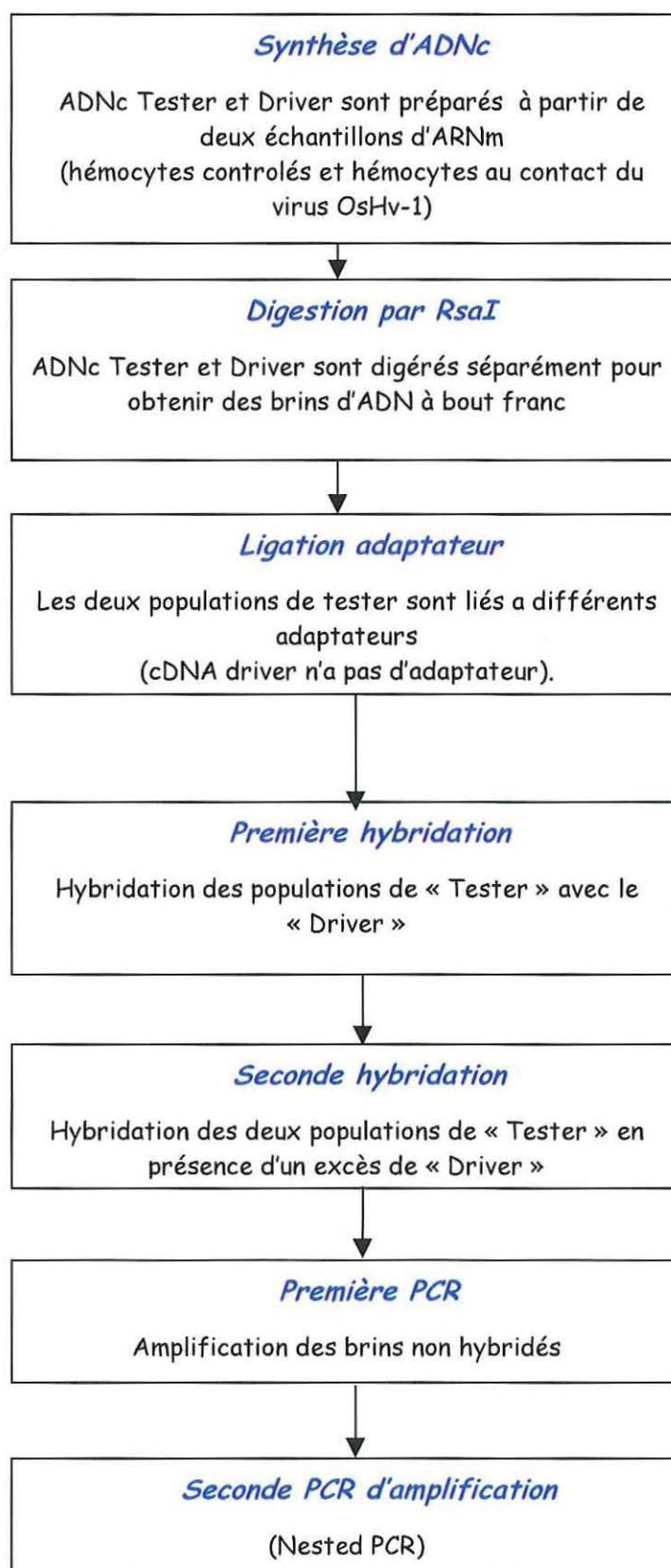


Figure 4 : Procédé « Clontech PCR-select cDNA Subtraction Kit ».

## VII - CLONAGE ET HYBRIDATION SUR MEMBRANE

*Clonage*

Le principe du clonage bactérien est d'isoler à des fins d'amplification et/ou de manipulation, un fragment d'ADN en l'insérant dans un vecteur ou plasmide capable de se multiplier dans les bactéries (Figure 5). L'insertion dans le vecteur est réalisée à l'aide d'enzymes de restriction (EcoR1) qui permettent la linéarisation du vecteur (pCR<sup>®</sup>II-TOPO). Le fragment d'ADN à cloner (produit de PCR) peut alors être inséré si ses extrémités sont cohésives et compatibles avec les extrémités du vecteur linéarisé. Les liaisons phosphodiester entre le fragment à cloner (appelé insert) et le vecteur sont créées à l'aide d'une enzyme particulière, la ligase. Le mélange de ligation est ensuite mis en présence de bactéries compétentes (TOPO 10 du TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, U.S.A.)). Le vecteur (avec éventuellement l'insert) pénètre dans la bactérie : c'est la transformation bactérienne (Annexe 4). Les colonies bactériennes ayant été transformées par un plasmide non recombinant apparaissent bleues sur la gélose LB contrairement aux colonies blanches qui contiennent l'insert inactivant le gène de la  $\beta$ galactosidase. Ainsi, toutes les colonies blanches sont sélectionnées. Le contrôle de l'incorporation de l'insert est réalisé par PCR à l'aide des amorces ayant été utilisées pour la seconde amplification (Annexe 5). Les résultats de la PCR sont contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Les clones possédant l'insert sont ensuite multipliés sur milieu LB additionné d'ampicilline.

L'ADN plasmidique est extrait (Annexe 6). La concentration en ADN plasmidique est évaluée par spectrophotométrie et contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose.

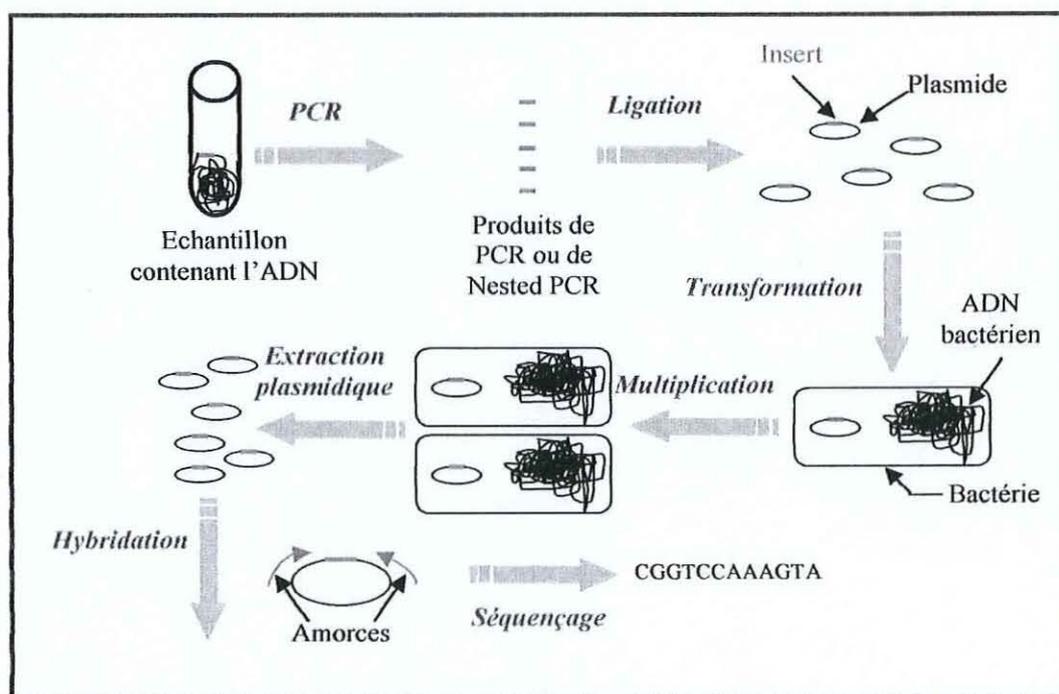


Figure 5 : Schéma récapitulatif des différentes étapes du clonage.

### *Hybridation sur membrane : DOT BLOT*

Cette technique consiste à détecter la présence de séquences d'ADN spécifiques dans un produit contenant plusieurs séquences (mélange de produits de PCR). Les produits de PCR ( mélange) sont dénaturés par NaOH et déposé sous forme de spot sur une membrane « Nylon ». Des sondes spécifiques sont produites en utilisant un produit de PCR cloné. Les sondes ainsi obtenues sont hybridées sur les membranes préparées. Si un des produits de PCR « spoté » sur la membrane est reconnu par la sonde de manière spécifique, il sera possible de révéler cette sonde par un marquage immunologique. En effet, un anticorps anti-digoxigénine, marqué à la phosphatase alcaline est utilisé et se fixe sur la sonde. Une étape de révélation (substrat de phosphatase alcaline) permet de visualiser l'hybridation sur la membrane. L'opération consiste à marquer le fragment d'ADN avec des nucléotides marqués à la digoxigénine.

### VIII - SEQUENCAGE

Le fragment à séquencer, obtenu par PCR est mis en présence d'un milieu réactionnel. L'ensemble est ensuite soumis à une succession de cycles de polymérisation au cours desquels l'ADN polymérase incorpore un déoxynucléotide ou un didéoxynucléotide. Dans le premier cas la synthèse se poursuit contrairement au second cas où celle-ci s'arrête. Les molécules néosynthétisées contenues dans le milieu réactionnel, sont alors dénaturées pour ensuite migrer dans un gel d'électrophorèse afin d'être séparées selon leur taille. La séquence peut ainsi être reconstituée en analysant la nature du fluorochrome terminant chacun de ces fragments néosynthétisés, du plus petit, au plus grand. Lors de l'étude les produits de clonage sont séquencés à l'aide du kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer, Applied Biosystems, USA) et d'un séquenceur automatique ABI 310 Genetic analyser (Perkin Elmer, USA).

## RESULTATS

### I - PRODUCTION DE LARVES AXENIQUES ET INFECTION EXPERIMENTALE

Dans le but d'obtenir les meilleures conditions de fécondation, (une quantité d'œufs fécondés importante et de bonne qualité), trois essais ont été réalisés, à partir de géniteurs de l'écloserie d'IFREMER. Après avoir sélectionné les géniteurs, les gamètes sont prélevés dans des conditions stériles et mis en contact pendant une heure. Les larves sont observées régulièrement afin de contrôler leur survie (sédimentation des larves mortes). Les résultats obtenus au cours de chaque essai sont répertoriés dans le Tableau I.

*Tableau I : résultats obtenus lors de la production de larves axéniques.*

	<b>ESSAI 1</b>	<b>ESSAI 2</b>	<b>ESSAI 3</b>
<b>Géniteurs</b>	2 femelles et 1 mâle	3 femelles et 2 mâles	3 femelles et 2 mâles
<b>Quantité de spermatozoïdes (nombre par mL)</b>	41 550	24 000 000	61 200 000
<b>Quantité d'ovocytes (nombre par mL)</b>	73 000	117 500	250 000
<b>Volume de spermatozoïdes au contact d'ovocytes (mL)</b>	26.7	15	12.5
<b>Quantité de larves obtenue après fécondation (nombre par mL)</b>	42 000	89 000	136 000
<b>Charge dans les bouteilles (larves par mL)</b>	147	90	1088
<b>Température d'incubation (°C)</b>	29	23	22
<b>Qualité des larves</b>	Beaucoup de larves sédimentées : Mortalité importante	Faible densité Développement normal	Forte densité Développement normal

Les rendements de fécondation sont de 0.5 pour les essais 1 et 3 et de 0.7 pour l'essai 02. La charge par bouteille, respectivement de 147 et de 90 pour les essais 1 et 2 a volontairement été augmentée lors de la dernière expérimentation. Les résultats du premier essai montrent l'importance du facteur « température » lors du développement larvaire. A une température de 29°C, les larves survivent difficilement et sédimentent 24 heures après la fécondation. La température a été étroitement surveillée lors des essais suivants, elle a été maintenue à 22-23°C.

L'examen visuel et microscopique des larves permet de déterminer la meilleure charge larvaire pour l'expérimentation. Ainsi, lors du dernier essai (3), la charge a pu être portée à environ 1000 larves par mL. Le développement et la survie se sont déroulés favorablement. Ainsi, une infection par le virus à OsHV1 est lancée sur cette dernière expérimentation mais n'étant pas arrivée à son terme les conclusions ne sont pas disponibles pour le rapport.

## II - OBTENTION D'HEMOCYTES

Deux types d'animaux ont été étudiés : huîtres diploïdes et huîtres triploïdes. Le lieu de ponction a également été expérimenté : la cavité péricardique et le muscle adducteur. Ceci dans le but d'optimiser les cultures cellulaires d'hémocytes. Les ponctions réalisées sur les huîtres triploïdes montrent une disparité dans les volumes recueillis et les concentrations hémocytaires (Tableau II). Ainsi, le volume recueilli lors de l'essai 5 est de 5 mL. Il est plus faible, ramenés au nombre d'huître ponctionnée, que lors des essais précédents (35 et 22 mL). Il est à noter que ces individus étaient difficilement ponctionnables en raison de l'épaisseur du manteau chargé en glycogène. La ponction dans le muscle adducteur permet de recueillir un volume important d'hémolymphe (72.5 mL) pour une faible quantité d'hémocyte par mL ( $1,5 \cdot 10^6$ /mL).

*Tableau II : Résultats des ponctions d'hémolymphe sur huîtres triploïdes.*

	Essai 1	Essai 3	Essai 4	Essai 5
Origine et taille	Claire N°1	Claire N°1	Estran N°3	Estran N°3
Quantité d'huîtres	99	59	58	35
Lieu de ponction	Cavité péricardique	Cavité péricardique	Cavité péricardique	Muscle adducteur
Volume d'hémolymphe recueilli (mL)	35	22	5	72.5
Nombre de cellules (millions par mL)	11.5	5	12	1.5

Les animaux diploïdes présentent des différences de volume recueillis selon le lieu de ponction (Tableau III). Il est ponctionné plus de 1 mL d'hémolymphe par huîtres lorsque la ponction est réalisée au niveau du muscle adducteur. Ce volume est de 0,2 à 0,5 mL lors de prélèvement dans la cavité péricardique. Par contre la concentration hémodocytaire varie peu quel que soit le lieu de ponction de 1 à 2,5 millions de cellules /mL.

*Tableau III : Résultats des ponctions d'hémolymphe sur huîtres diploïdes.*

	Essai 5	Essai 6	Essai 7	Essai 8	Essai 9	Essai 10
Origine et taille	Claire N°3	Estran N°1	Bassin Ifremer N°3	Bassin Ifremer N°3	Estran N°3	Estran N°3
Quantité d'huîtres	80	73	20	25	38	35
Lieu de ponction	Cavité péricardique	Cavité péricardique	Cavité péricardique	Cavité péricardique	Muscle adducteur	Muscle adducteur
Volume d'hémolymphe recueilli (mL)	27	15	10	12.5	43	42.5
Nombre de cellules (millions par mL)	2.5	3	1.2	1	1	1.7

### III - MISE EN CULTURE ET EXTRACTION D'ARN

La quantité de cellules mises en culture a été modulé selon les essais (Tableaux IV et V). La concentration des ARN obtenus à partir des hémocytes issus des animaux triploïdes varie de 121 à 985  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . et ne permet pas d'établir de relation entre le nombre de cellules et la quantité d'ARN produit ( $1.5 \cdot 10^6 / \text{mL}$ ) (Tableau IV).

*Tableau IV: Concentration en ARN ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtenue à partir des cultures hémocytaires issues d'huîtres triploïdes (incubation 12h)..*

	<b>Essai 1*</b> <b>A</b>	<b>Essai 1*</b> <b>B</b>	<b>Essai 1*</b> <b>C</b>	<b>Essai 2</b>	<b>Essai 3</b>	<b>Essai 4</b>
<b>Nb hémocytes par fiole (millions de cellules)</b>	11	27.5	55	46.5	50	9
<b>Volume de Trizol (mL)</b>	0.720	0.720	0.720	2.5	2.5	2.5
<b>Concentration ARN</b>	275.5	446.6	330	985	121	129

\*Pour l'essai 1 (voir Tableaux II et IV), trois concentrations de cellules ont été testées pour la mise en culture. Ce sont les cellules issue des mêmes animaux qui ont été traitées à trois concentrations différentes.

L'observation faite ci-dessus concernant l'absence de relation entre les concentrations en ARN totaux et la quantité d'hémocytes se vérifie également pour les huîtres diploïdes (Tableau V). Les concentrations en ARN, pour les extractions réalisées à partir des hémocytes d'huîtres diploïdes se situent entre 157.5 et 684.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans la même fourchette de valeurs à quelques centaines de micro grammes près.

Tableau V : Concentration en ARN ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtenue à partir des cultures hémocytaires issues d'huîtres diploïdes (incubation 12h).

	Essai 5	Essai 6	Essai 7	Essai 8	Essai 9	Essai 10*
Nb hémocytes par fiole (millions de cellules)	10	10	6	5	6	10
Volume de Tizol (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Concentration ARN	684.7	174.9	157.5	373.6	175	663.9

\*L'extraction de l'essai 10 est obtenue après avoir « poolé » plusieurs fioles.

Des extractions d'ARN ont également été réalisées sur des fioles incubées 22 heures. Les deux types de population ont été testés : des triploïdes (essai 2) et des diploïdes (essai 5). Ainsi, après 22 heures d'incubation le concentration en ARN est de  $133.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ , pour les triploïdes alors qu'elle était de  $985 \mu\text{g}/\text{mL}$  pour les même cellules, après une incubation de 12 heures. De même, pour les diploïdes les concentrations étaient de  $138.8 \mu\text{g}/\text{mL}$  après 22 heures d'incubation et de  $684.7 \mu\text{g}/\text{mL}$  après 12 heures, et pour les même cellules. En effet, après 22 heures d'incubation, l'examen microscopique des fioles de cultures a révélé un nombre important de bactéries.

L'analyse des ARN extraits, en gel dénaturant permet de préciser leur qualité. Les ARN obtenus dans l'essai 1 permettent de visualiser des bandes de taille attendue, en gel dénaturant (Figure 6). Cependant, l'intensité de ces dernières est faible. L'ensemble des échantillons d'ARN obtenus au cours des différents essais (essais 2 à 10) ont également été analysés mais l'intensité des bandes était très faible.

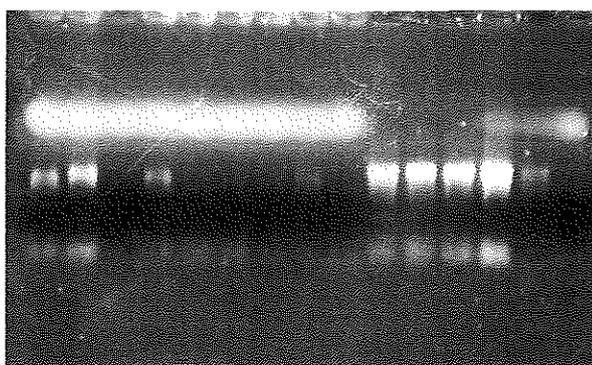


Figure 6: Gel dénaturant concernant des extractions d'ARN.

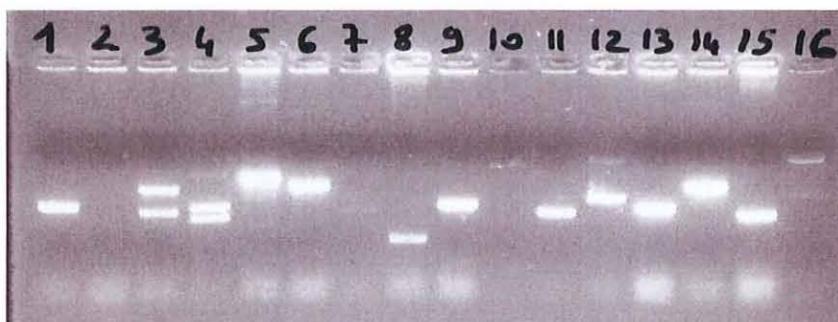
### III - CLONAGE ET HYBRIDATION SUR MEMBRANE

#### NOTE LIMINAIRE

Des hémocytes ont été mis au contact du virus OsHv-1 antérieurement au laboratoire. Ce sont ces essais qui ont permis l'obtention d'ARN utilisés pour la technique de SSH. Il en a résulté des produits de PCR qui ont servi notamment au clonage et à l'hybridation sur membranes.

Les produits issus de la deuxième PCR (Nested PCR protocole SSH) ont été clonés et ont servi à la production de sondes (Annexe 4).

Seize clones ont été sélectionnés et contrôlés en PCR (Figure 7).



*Figure 7: Gel de contrôle des clones amplifiés par PCR, vérification de l'incorporation de l'insert.*

Sur l'ensemble des clones testés (16), seul le clone 2 ne présente pas d'insert (pas de bande après migration) (Figure 7). Ce dernier (clone 2) n'a pas été retenu pour les phases suivantes : hybridation sur membrane et séquençage.

Il a été alors procédé à la production de sondes marquées à partir des cultures de clones sélectionnés, par PCR en utilisant des dNTP marqués. L'efficacité des marquages a été contrôlé en gel d'agarose (Figure 8). Les produits de PCR ayant incorporés des dNTP marqués sont plus lourds que les produits identiques, non marqués. Les bandes correspondant aux produits marqués, migrent moins et sont donc distinguables (Figure 8).

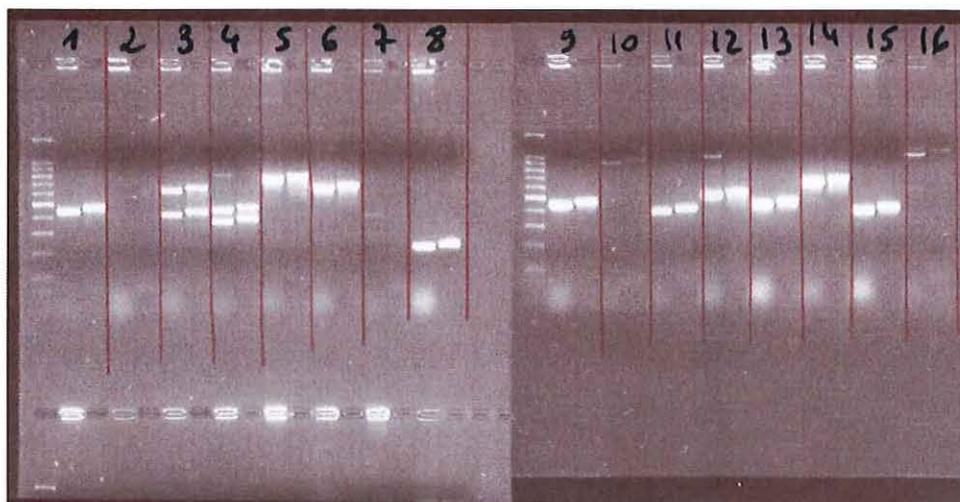


Figure 8 : Contrôle sur gel des clones avant (bande de gauche) et après (bande de droite) marquage à la digoxigénine (dNTP\*).

Les sondes obtenues ont été utilisées par hybridation sur des produits issus de trois SSH (mélanges de produits de PCR) réalisées antérieurement au laboratoire (SSH1, SSH2 et SSH3).

Quinze membranes comprenant les produits dénaturés (SSH1, SSH2, SSH3), ont été effectuées, elles comportent deux dépôts pour un même produit. Chaque sonde a été mise en contact individuellement avec une membrane.

Les analyses en DOT BLOT, montrent que les 16 sondes produites marquent aussi bien les produits de PCR SSH1, SSH2 et SSH3. Ce résultat indique que ces produits SSH1, SSH2 et SSH3 ne sont pas différenciables sur la base des sondes utilisées. Les clones sélectionnés pour produire les sondes ne correspondent donc pas à des gènes viro-induits ou des gènes éteints par le virus.

☞ Trois Suppressive Subtractive Hybridization ont été développées antérieurement à ce stage. Elles ont été menées à partir d'ARN extrait d'hémocytes stimulés ou non stimulés par le virus OsHv-1. Lors de la 1<sup>ère</sup> et de la 2<sup>ème</sup> SSH, les ADN issus d'hémocytes stimulés par le virus ont été considérés comme « Tester » ; dans le cas de la 3<sup>ème</sup> SSH, le « tester » était composé par les ADN issus d'hémocytes non stimulés par le virus. Le premier cas doit révéler les gènes viro-induits, le second les gènes « down-régulés ».

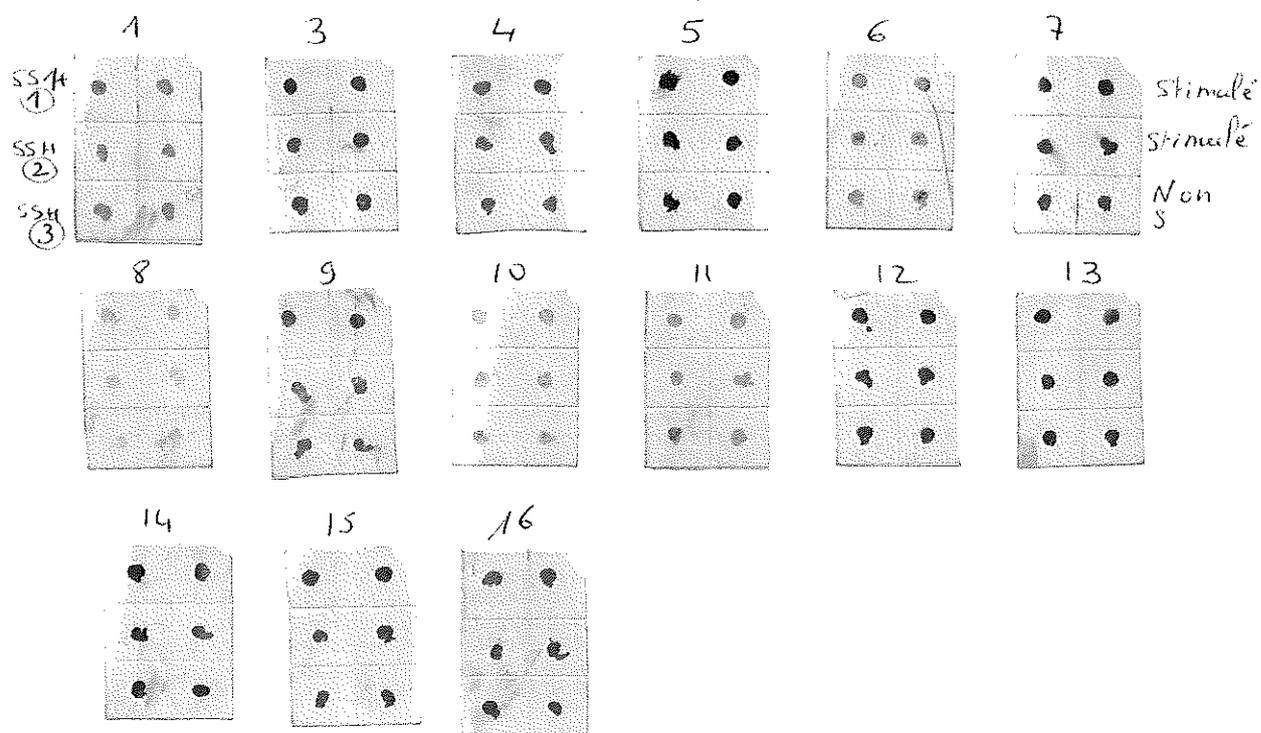


Figure 9 : Résultat de l'hybridation obtenue à partir des sondes 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16.

## DISCUSSION

La production de larves axéniques a montré l'importance du facteur température. Les œufs fécondés doivent être maintenus à une température voisine de 23°C. Des températures plus élevées peuvent favoriser le développement larvaire. Cependant, des températures trop élevées peuvent se traduire par une mortalité larvaire importante. Ainsi, l'expérience réalisée à 29°C s'est soldée par la perte totale des larves en 24 heures. Il est dans ces conditions indispensable de maintenir une température constante au cours des expériences. De plus, ici les essais ont été réalisés en bouteilles contenant 500 mL d'eau de mer filtrée alors qu'ils sont habituellement réalisés en ballons contenant 1 litre. Par ailleurs, des concentrations élevées de larves ont également été utilisées. En effet, les bouteilles ont étéensemencées avec plus de 1000 larves/mL. Les concentrations habituellement utilisées varient de 10 à 100 larves par ml (Dégremont, 2003). Cette forte densité larvaire ne semble pas avoir d'impact sur la survie et le développement. Les larves sont viables et présentent un développement normal après 10 jours dans une bouteille en absence de nourriture. Ces fortes concentrations en larves devraient permettre de produire des quantités importantes d'animaux infectés indispensables pour les étapes suivantes de l'approche choisie.

Le type d'huître utilisée conditionne les quantités d'hémocytes prélevés pour une ponction dans la cavité péricardique. En effet, les huîtres triploïdes permettent d'obtenir des quantités plus importantes d'hémocytes que des animaux diploïdes. Des résultats comparables ont été obtenus au cours d'une étude réalisée sur le terrain comparant des huîtres triploïdes et diploïdes (Gagnaire, 2004). Dans ces conditions, les huîtres triploïdes apparaissent intéressantes pour réaliser des essais de maintien *in vitro* d'hémocytes. Cependant, dans notre approche, le fait d'utiliser des animaux possédant 3N chromosomes pourrait gêner l'identification de gènes viro-induits. En effet, l'expression des gènes doit être différente chez les triploïdes par rapport aux diploïdes. Cependant, il a été démontré que les animaux triploïdes étaient moins sujets aux mortalités estivales et possédaient des capacités immunitaires supérieures par rapport aux diploïdes (Gagnaire, 2004). Dans ces conditions, il est possible de suspecter la présence d'activités anti-virales dirigées contre OsHv-1 supérieures chez les triploïdes. Les prélèvements réalisés dans le muscle adducteur ne permettent pas d'observer de telles différences.

Les résultats obtenus indiquent également que l'extraction d'ARN doit être réalisée rapidement après mise en culture *in vitro*. Après une incubation de plus de 14h, les quantités en ARN sont très faibles. Ces résultats peuvent s'expliquer par des proliférations bactériennes dans les cultures cellulaires. Il est important de noter que le système circulatoire des bivalves est un système ouvert en contact avec le milieu extérieur (Olicard, 2004). L'hémolymphe n'est pas un milieu stérile. Les hémocytes mis en culture ne subissent aucun traitement. Aucun ajout d'antibiotique n'est réalisé. Didier (2004) a ainsi montré l'importance de la température et des antibiotiques dans la possibilité de maintenir des hémocytes en culture.

Par ailleurs, il faut noter, également qu'il n'existe pas de corrélation entre la quantité de cellules déposée dans les fioles lors de la mise en culture des hémocytes et la concentration d'ARN totaux obtenue après extraction. Le facteur limitant pourrait être dans ce cas le volume de Trizol ajouté pour réaliser les extractions. Cependant, les recommandations du fournisseur ont été suivies (1 ml pour 10 cm<sup>2</sup>). Par ailleurs, la concentration en ARN peut être déterminée en regroupant plusieurs fioles de culture. La qualité des ARN extraits est également un aspect important à prendre en compte. Ainsi, l'absence de bandes sur gel semble être reliée aux faibles concentrations en ARN obtenues après extraction. Dans ces conditions, l'étape d'extraction est cruciale.

L'analyse des clones obtenus dans des expériences réalisées au préalable au laboratoire n'a pas permis d'identifier des gènes exprimés uniquement dans des hémocytes au contact du virus OsHV-1. Ces résultats ne sont pas inattendus dans la mesure où le nombre de clones testés (16) était relativement réduit. En effet, la technique de SSH est basée sur la possibilité de trouver des gènes différemment exprimés. La probabilité d'identifier de tels gènes est d'autant plus forte que le nombre sondes testées est élevé. Il apparaît donc nécessaire de reprendre des expériences de SSH en optimisant toutes les étapes. Le travail réalisé au cours de cette étude devrait permettre d'apporter des améliorations à certaines étapes de cette approche.

Gueguen *et al.* (2002) ont étudié l'expression de gènes induits suite à l'infection par des bactéries du genre *Vibrio*, chez l'huître creuse. Leurs travaux ont démontré que certains des gènes exprimés lors de l'infection avaient une homologie avec des gènes impliqués dans la réponse immunitaire chez les mammifères ou les insectes tels que la drosophile. Cependant, dans ces travaux, les bactéries utilisées ne sont pas toutes des agents pathogènes propres aux coquillages. Par ailleurs, le phénomène d'apoptose a été mis en évidence (Renault 2002) chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, infectée par OsHV-1. L'expression de gènes responsables de l'apoptose lors de l'infection virale serait donc intéressant à étudier.

## BIBLIOGRAPHIE

**Arason G.J.** (1996). Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish and Shellfish Immunology*, **6**, 277-289.

**Arzul I., J.L. Nicolas, A.J. Davison and T. Renault** (2001). French scallops: a new host for Ostreid Herpesvirus-1. *Virology*, **290**, 342-349.

**Arzul I. et Renault T.** (2002). Herpèsvirus et bivalves marins. *Virologie*, **6**, 169-174.

**Asokan R., M. Arumugan and P. Mullainadhan** (1997). Activation of prophenoloxdase in plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis*. *Developmental and Comparative Immunology*, **21**, 1-12.

**Cheng T.C.** (1977). Biochemical and ultrastructure evidence for the double role of phagocytosis in molluscs: defense and nutrition. *In: Comparative pathology. Vol 3. Invertebrate Immune Responses*, 21-30. Plenum press, New York and London.

**Cheng T.C.** (1981). Bivalves. *In: Invertebrate Blood Cells (edition N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley)*, 233-299. Academic Press, London.

**Claveria C., J.P. Albar, A. Serrano, J.M. Buesa, J.L. Barbero, C. Martinez and M. Torres** (1998). Drosophila grim induces apoptosis in mammalian cells. *The EMBO Journal*, **17(24)**, 7199-7208.

**Cohen J.J.** (1994). Apoptosis: physiologic cell death. *J. Lab. Clin. Med.*, **124(6)**, 761-765.

**Coles J.A. and A.K. Pipe** (1994). Phenoloxdase activity in the hemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish and Shellfish Immunology*, **4**, 337-352.

**Culloty S.C., P.F. Duggan, X. Quishi and M.F. Mulcahy** (2002). Amylase and aspartate aminotransferase in the haemolymph of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish and Shellfish Immunology*, **12**, 367-369.

**Dechauvelle N.** (1989). La reproduction de mollusques bivalves en écloséries. *Haliotis*, **19**, 315-324.

**Dégremont L.** (2003). Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, rapport de thèse : pp .

Didier Y. (2004). Etude des mécanismes immunitaires développés chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, lors d'infection à virus de type herpès. *Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'école pratique des Hautes Etudes, Science de la Vie et de la Terre*, pp. 189.

Du Pasquier L. (2001). The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **129**, 1-15.

Faisal M., E.A. Mac Intyre, K.G. Adham, B.D. Tall, M.H. Kothary and J.F. La Peyre (1998). Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **121**, 161-168.

FAO (2002). World review of fisheries and aquaculture, part 1. The state of world fisheries and aquaculture. pp. 28.

Farley A.C., W.G. Banfield, G. Kasnic and W.S. Foster (1972). Oyster herpes-type virus. *Science*, **178**, 759-760.

Gagnaire B., T. Renault, K. Bouilly, S. Lapegue and H. Thomas-Guyon (2003). Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Current Pharmaceutical Design*, **9**, 193-199.

Gourdon I., M-C Guérin and J. Torreilles (1998). Mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse aux stress chez les bivalves marins. *CR de l'Académie des Sciences Paris*, **192**, 749-774.

Gueguen Y., J.P. Cadoret, D. Flament, C. Barreau-Roumiguière, A.L. Girardot, J. Garnier, A. Hoareau, E. Bachère, J.M. Escoubas (2003). Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*, **303**, 139-145.

Heral M. (1985). Evaluation de la capacité biotique des écosystèmes conchylicoles. *Séminaire Inter. Recherche et Développement Aménagement Conghy., La Rochelle, 4-9 mars 1985*, , 1-30.

Hine P.M., B. Wesney and B.E. Hay (1992). Herpes viruses associated with mortalities among hatchery-reared larval pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 135-142.

Hine P.M. and T. Thorne (1997). Replication of Herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: an ultrastructural study. *Dis. Aquat. Org.*, **29**, 189-196.

- Hughes T.K.J., E.M. Smith, R. Chin, P. Cadet, J. Sinisterra, M. Leung, M.A. Shipp, B. Scharrer and G.B. Stephano (1990). Interaction of immunoreactive monokines (IL1 and TNF) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4426-4429.
- Ishikawa H., M. Ikeda, K. Yanagimoto, C.A. Alves, Y. Katou, B.A. Lavina-Caoili and M. Kobayashi (2003). Induction of apoptosis in an insect cell line, IPLB-Ld652Y, infected with nucleopolyhedroviruses. *J. Gen. Virol.*, **84**, 705-714.
- Le Deuff R.M, J.L. Nicolas, T. Renault and N. Cochenec (1994). Experimental transmission of a Herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **14(2)**, 69-72.
- Le Deuff R.M., T. Renault and A. Gérard (1996). Effects of temperature on Herpes-like virus detection among hatchery-reared larval pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, **24**, 149-157.
- Lee T.G. and S. Maruyama (1998). Isolation of HIV-1 protease-inhibiting peptides from thermolysin hydrolysate of oyster proteins. *Biochemical and Biophysical research communications*, **253**, 604-608.
- Li C.P., B. Prescott, B. Eddy, G. Caldes, W.R. Green, E.C. Martino and A.M. Young (1965). Antiviral activity of paolins from clams. *Ann. NY Acad. Sci.*, **130(1)**, 374-382.
- Li C.P., N.M. Tauraso, B. Eddy, B. Prescott and E.C. Martino (1972). Studies on inhibition of viral oncogenesis.III. Effect of clam extracts and methotrexate on tumor formation in male and female hamsters induced by virulent and attenuated adenovirus-12. *Arch. Gesamte Virusforsch*, **36(3)**, 284-295.
- Limasset P. (1961). Observations préliminaires démontrant l'existence d'inhibiteurs du virus de la mosaïque du tabac chez les animaux aquatiques, la plupart marins. *CR de l'Académie des Sciences Paris*, **252**, 3154-3156.
- Loosanoff V.L. and H.C. Davis (1963). Rearing of bivalve mollusks. *In: Advances in Marine Biology*, 1 (edition FS Russel), pp. 1-136. Academic Press Inc., Londres.
- Luna-Gonzalez A., A.N. Maeda-Martinez, F. Vargas-Albores, F. Ascencio-Valle and M. Robles-Mungaray (2003). Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology*, **15**, 275-282.
- Micic M., N. Bihari, Z. Labura, W.E. Muller and R. Batel (2001). Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride. *Aquatic Toxicology*, **55**, 61-73.

Minson A.C., A.J. Davison, R.C. Desrosier, B. Fleckenstein, D.J. McGeoch, P.E. Pellett, B. Roizman and M.J. Studdert (2000). Herpesviridae: In *Virus Taxonomy, 7th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (edition M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner). *Academic Press*, 203-225.

Mitta G., F. Vandenbulcke, F. Hubert and P. Roch (1999). Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Science*, **112**, 4233-4242.

Mitta G., F. Vandenbulcke and P. Roch (2000). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters*, **486**, 185-190.

Newell N.D. (1969). Classification of Bivalvia. In: *Treatise of Invertebrate Paleontology, Mollusca, Bivalvia*, Vol 1 (edition RC Moore), 205-224. Geological Society of America and the University of Kansas Press, Lawrence, Kans.

Nicolas J.L., M. Comps and N. Cochenec (1992). Herpes-like virus infecting Pacific Oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **12**(1), 11-13.

Olicard C. (2004). Recherche de substances anti-virales chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. *Rapport de thèse* : pp. 138.

Prescott B., C.P. Li, G. Caldes and E.C. Martino (1966). Chemical studies of paolin II, an antiviral substance from oysters. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **123**(2), 460-464.

Razvi E.S. and R.M. Welsh (1995). Apoptosis in viral infections. *Advances in Virus Research*, **45**, 1-60.

Renault T., N. Cochenec, R.M. Le Deuff and B. Chollet (1994). Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **14**(2), 64-66.

Renault T. (1998). Infections herpétiques chez les invertébrés: détection de virus de type Herpes chez les mollusques bivalves marins. *Virologie*, **2**(5), 401-402.

Renault T., R.M. Le Deuff, B. Chollet, N. Cochenec and A. Gérard (2000). Concomitant Herpes-like virus infection in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 173-183.

Renault T., C. Lipart and I. Arzul (2001). A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **45**, 1-7.

- Renault T., C. Lipart and I. Arzul (2001). A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *Journal of Fish Diseases*, **24**, 369-376.
- Roizman B. and D. Furlong (1974). The replication of herpesvirus. In: *Comprehensive Virology*, vol 3 (edition H Fraenkel-Conrat and RR Wagner), 29-403. Plenum Press, New York.
- Salzet M. (2001). Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends in Immunology*, **22(6)**, 285-288.
- Söderhall K. (1992). Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Bollettina di zoologica*, **59**, 141-151.
- Sunila I. and J. LaBanca (2003). Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Org.*, **56(2)**, 163-170.
- Terahara K., K.G. Takahashi and K. Mori (2003). Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, **27**, 521-528.
- Tirard C.T., R.M. Grossfeld, J.F. Levine and S. Kennedy-Stoskopf (1997). Effect of osmotic shock on protein synthesis of oyster hemocytes *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **116**, 43-49.
- Xue Q-G. and T. Renault (2000). Enzymatic activities in european flat oyster, *Ostrea edulis*, and pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology*, **76**, 155-163.
- Xue Q-G. and T. Renault (2001). Monoclonal antibodies to european flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals. *Developmental and Comparative Immunology*, **25**, 187-194.

ANNEXE 1

## PREPARATION DES SOLUTIONS D'ANTIBIOTIQUES

COCKTAIL DE 5 ANTIBIOTIQUES : (SOLUTION MERE 1000X)

	Concentration finale
10 mg d'Acide oxolinique	(à 0.1 mg/L)
10 mg de Kanamycine	(à 0.1 mg/L)
10 mg d'Erythromycine	(à 0.1 mg/L)
75 mg de Péniciline G	(à 0.75 mg/L)
150 mg de Streptomycine	(à 1.5 mg/L)

Les antibiotiques sont dilués dans 100 mL d'eau de mer filtrée à 0.22  $\mu\text{m}$  et aliquoté dans des tubes Falcon stériles de 10 mL.

SOLUTION DE FLUMEQUINE : (SOLUTION MERE 1000X)

Concentration mère : 30 mg/L  
Concentration finale : 30  $\mu\text{g}$ /L

Nécessité d'ajout de NaOH pour dissoudre la fluméquine.  
Cette solution n'est pas préparée dans des conditions stériles, il faut donc la filtrée à 0.22  $\mu\text{m}$  avant d'aliquoter.

Les solutions de fluméquine et d'antibiotiques sont dilués au 1/1000 dans les ballons ou les bouteilles de culture pour les larves.

ANNEXE 2

## EXTRACTION DES ARN A PARTIR D'HEMOCYTES EXTRACTION AU TRIZOL

### *Extraction des ARN*

- Aspirer à la pipette stérile l'hémolymphe de manière à ne conserver que le tapis cellulaire fixé au fond de la fiole.
- Laver la fiole avec du PBS 1X filtré (4°C), répéter l'opération
- Ajouter 2.5 mL de Trizol par fiole
- Agiter : la lyse s'effectue immédiatement
- Récupérer le lysat dans un tube stérile (eppendorf 1,5 mL stérile)
- Laisser incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 260  $\mu\text{L}$  de mélange chloroforme alcool isoamylique
- Vortexer 15 secondes puis laisser reposer 10 minutes à température ambiante
- Centrifuger 10 minutes à 4°C à 14000 trm
- Récupérer le surnageant  $\approx 250 \mu\text{L}$
- Ajouter 1 volume de mélange alcool isoamylique puis vortexer 15 secondes et laisser reposer 10 minutes à température ambiante
- Centrifuger 10 minutes à 4°C à 14000 trm
- Récupérer le surnageant dans un tube stérile
- Ajouter 1 volume d'isopropanol froid (4°C) (précipitation)
- Incuber 30 minutes à 4°C
- Centrifuger 30 minutes à 4°C à 14000 trm
- Rejeter le surnageant, laver le culot avec 1 mL d'éthanol à 70%
- Centrifuger 10 minutes à 4°C à 14000 trm
- Rejeter le surnageant
- Centrifuger 2 minutes à 4°C à 14000 trm
- Eliminer les dernières gouttes d'éthanol et sécher sous la hotte et au speed vac 15 minutes à 36°C.
- Remettre en suspension dans 22  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  DEPC
- Réaliser une dilution au 1/250 pour la lecture au spectrophotomètre.
  - 1  $\mu\text{L}$  d'échantillon + 249  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  DEPC
- Lire au spectrophotomètre.

### ANNEXE 3

## CONTROLE SUR GEL DENATURANT

### *Réaliser un gel à 1%*

- Faire fondre 0.5 g d'agarose dans 40 ml de H<sub>2</sub>O bidistillée au micro-onde
- Ajouter 5 mL de MOPS 10X filtré et 5 mL de formaldéhyde
- Couler le gel

### *Préparation des échantillons*

- Déposer 6  $\mu$ L de FEB dans un tube contenant les 2  $\mu$ L d'ARN
- Parallèlement, ajouter 12  $\mu$ L de FEB dans un tube contenant 4  $\mu$ L de marqueur de taille
- Dénaturation 10 minutes à 70°C
- Centrifuger
- Ajouter 1  $\mu$ L de BET (1mg/mL)
- Déposer l'ARN sur le gel
- Laisser migrer dans du tampon MOPS 1X à 70V pendant 1h30
- Lire le gel

### **Milieu FFB**

Formamide désionisée

MOPS 10X filtré

Formaldéhyde 37%

H<sub>2</sub>O

Glycérol

Bleu de Bromothymol 1% H<sub>2</sub>O

*A conserver à -20°C*

Marqueur de taille

ANNEXE 4**CLONAGE (PCR® II TOPO)***Préparation du pool réactionnel*Jour 1

Dans la glace :

Salt solution.....	1 $\mu$ l
TOPO Vector .....	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O qsp 9 $\mu$ l .....	1 $\mu$ l
Produit PCR	4 $\mu$ l

- Mélanger doucement
- Incuber à température ambiante de 5 à 30 minutes
- Stocker à -20 °C si les plasmides ne sont pas utilisés immédiatement

*Transformation*Jour 2

- Equilibrer un bain-marie à 42 °C
- Mettre les boîtes de LB Ampiciline
- Centrifuger 10-15 sec le mélange de ligation, maintenir sur glace
- Prendre 1 tube de cellules compétentes TOPO 10 (Congélateur) et maintenir dans la glace
- Ajouter 1  $\mu$ l de produit de ligation en maintenant dans la glace
- Laisser 30 min sur glace
- Réaliser un choc thermique à 42°C 30 secondes
- Ajouter 250  $\mu$ l de SOC décongelé (Température Ambiante)
- Incuber 1 heure 37 °C sous agitation à 350 trm
- Pendant l'incubation étaler 40  $\mu$ L de X Gal à 40 mg/mL sur la gélose LB Ampiciline
- Après l'incubation, étaler 100  $\mu$ l de mélange de transformation sur la boîte de gélose
- Incuber 20 heures, boîtes retournées à 37 °C

Jour 3

Observation

- Colonies bleues : non transformées, ou segments non intégrés
- Colonies blanches : bactéries transformées avec plasmide

### *Contrôle par PCR des clones*

- Sélectionner toutes les colonies blanches
- Préparer une boîte gélosée quadrillée de LB + ampicilline codifiée avec les différents clones à tester)

#### *PCR avec primer*

Tp gold star 10x	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	5 $\mu$ l
dNTP 20 mM	0.5 $\mu$ l
Nested 1 100 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l
Nested 2R 100 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l
50X Advantage cDNA polymerase	0.2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O qsp 50 $\mu$ l	38 $\mu$ L

#### *Programme*

Etape 1 : 95°C 3 min

Etape 2 :

95 °C                      1 min

68 °C                      1 min

23 cycles

puis à 4 °C

Gel de contrôle 2 % agarose : 5  $\mu$ l de produit de PCR pour 2  $\mu$ l de bleu

- Réaliser autant de pool que d'échantillon + 2
- Déposer 50  $\mu$ l de mix par tube dans une plaque à PCR
- Prélever une colonie blanche à l'aide d'un cône stérile
- Déposer un peu de la colonie sur la gélose (incuber à 37 °C la nuit)
- Tremper le même cône dans le puits correspondant de la plaque PCR
- Ajouter de l'huile et couvrir
- Mettre la gélose à incuber une nuit à 37°C

#### *Matériel :*

Gélose LB à la concentration d'Ampicilline de 50  $\mu$ g/ml

Solution SOC à température ambiante

X Gal à 40 mg/ml.

ANNEXE 5

## EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE MINIPREP « Kit FastPlasmide Mini procedure »

- Mise en culture des clones une nuit à 37.5 °C  
(1 colonie de produit dans 3 mL de milieu LB)

Le lendemain:

- Centrifuger 10 minutes à 3510 trm
- Eliminer le surnageant
- ajouter 400 µL de solution de lyse
- Vortexer 30 secondes
- Laisser incuber 3 minutes à température ambiante
- Transférer dans une "Spin" colonne
- Centrifuger 1 minute à 10000 trm
- Laver l'ADN avec 400 µL de Wash buffer
- Centrifuger 1 minute à 10000 trm
- Vider le contenu du "tube"
- Centrifuger 1 minute à 10000 trm
- Transférer le contenu de la "Spin" colonne dans le "tube collection"
- Ajouter 40 µL de solution d'élution au centre de la "Spin" colonne
- Attendre quelques instants
- Centrifuger 1 minute à 8000 trm
- Lire la concentration au spectrophotomètre

## ANNEXE 6

# HYBRIDATION REVELATION

### *Préhybridation : (four à hybridation)*

- Incuber la membrane dans 8 mL de MIX d'Hybridation à la température de 42°C sous agitation lente pendant 1 heure.

### *Hybridation : (four à hybridation)*

- Ajouter 5 µl de sonde préalablement dénaturée 5 minutes à 94°C
- Incuber la membrane une nuit à la température de 42°C sous agitation lente

### *Révélation*

- Laver la membrane avec SSC 2X à 42°C pendant 20 mn sous agitation lente
- Laver la membrane avec SSC 1X à 42°C pendant 20 mn sous agitation lente
- Laver la membrane avec SSC 1X à température ambiante pendant 20 mn sous agitation lente
- Laver la membrane avec SSC 0.5X à température ambiante pendant 20 mn sous agitation lente
- Incuber en tampon DIG 1 pendant 5 mn à Température ambiante
- Incuber en tampon DIG 2 sans l'anticorps pendant 30 mn à Température ambiante
- Incuber en tampon DIG 2 contenant l'anticorps pendant 1 heure à Température ambiante
- Laver 4 fois 5 mn avec le tampon DIG 1
- Incuber en tampon DIG 3 pendant 5 mn à Température ambiante
- Incuber à Température ambiante et à l'obscurité en tampon DIG 3 additionné de NBT-BCIP jusqu'à apparition du marquage
- Stopper la réaction par un rinçage à l'eau du robinet ou tampon DIG 4
- Observer le marquage

### *Solutions*

KIT 1 : DIG oligonucleotide Tailing Kit, 2<sup>nd</sup> génération - « ROCHE » (congélateur)

KIT 2 : DIG Nucleic Acid Detection Kit - « ROCHE » (congélateur)

MIX HYBRIDATION :

	C initiale	C.finale.	Volume
Formamide	100%	50%	5 mL
Dextran sulfate	50%	10%	2 mL
SSC	20X	4X	2 mL
Yeast tRNA	11.4 mg/mL	250 µg/mL	219 µL
Denhart	50X	1X	200 µL
H2O qsp			0.580 µL
Conserver à -20°C			

SSC 2X, 1X, 0.5X,

<u>DIG 1 :</u>	Acide Malique 0,1 M	11,61 g
	NaCl 0,15 M	30 mL de NaCl 5M
	H <sub>2</sub> O	800 mL
	Ajuster le pH à 7,5	
	H <sub>2</sub> O	1000 mL
	Stocker à Température ambiante	

<u>DIG 2 :</u>	1 g de Blocking Reagent KIT 2	
	DIG 1 qsp	100 mL

<u>DIG 3 :</u>	TRIS 0,1M	100 mL de TRIS 1M non équilibré en pH
	NaCl 0,1M	20 mL de NaCl 5M
	MgCl <sub>2</sub> 0,05M	50 ml de MgCl <sub>2</sub> 1M
	H <sub>2</sub> Oqsp	100 mL
	Ajuster pH 9,5	
	Stocker à Température ambiante (il peut précipiter)	

<u>DIG 4 :</u>	TE (TRIS EDTA) 10 :1
----------------	----------------------

Anticorps : Anti Dig-AP FAB fragment 150 unités à diluer au 1/5000 (Anticorps FAB anti DIG marqué à la phosphatase alcaline) (Frigo 4 BioMoL)

NBT BCIP (Kit 2) 20 µL/mL de DIG 3