

**SESSION DE FORMATION
A L'UTILISATION DE LA TECHNIQUE PCR
POUR LE DIAGNOSTIC DE L'INFECTION
A HERPESVIRUS CHEZ LES HUITRES**

De la grande théorie aux petites recettes

**IFREMER La Tremblade
23 et 24 avril 1996**

**Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales
B. P. 133 - 17390 La Tremblade**

INTRODUCTION

**RAPPEL DES TRAVAUX
concernant l'herpèsvirus
observé chez les huîtres
(Août 1995-Avril 1996)**

I - INTRODUCTION

Parmi les maladies infectieuses observées chez les mollusques bivalves marins, les viroses sont souvent mal connues, en raison d'une certaine inadéquation des techniques d'identification et de diagnostic généralement mises en oeuvre lors de phénomènes de mortalité. En effet, la microscopie photonique a été et reste encore, dans de nombreux laboratoires travaillant sur les pathologies des mollusques, la technique de base pour l'analyse des échantillons. Cette technique reste insuffisante en cas de pathologie d'origine virale si elle n'est pas complétée par d'autres approches (microscopie électronique à transmission, recherche d'effets cytopathogènes sur monocouches cellulaires et réactifs de diagnostic spécifiques). Aucune lignée de mollusques bivalves n'est à l'heure actuelle disponible, et la recherche d'éventuels effets cytopathogènes dus à des virus est donc impossible en système homologue. De plus, aucun outil de diagnostic spécifique de virus d'huître (anticorps ou sondes nucléiques) n'était jusqu'alors disponible.

Depuis 1991, de fortes mortalités sporadiques de larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été observées, au cours de l'été, dans différentes écloséries françaises. Ces mortalités ont été associées à la détection d'un virus en microscopie électronique à transmission. Ce dernier, du fait de ces caractéristiques morphologiques et de son cycle de développement semble apparenté à la famille des *Herpesviridae*. Le pouvoir pathogène de cet agent viral a été démontré au laboratoire par reproduction expérimentale de mortalité sur larves axéniques. Par ailleurs, des mortalités concomitantes ont été rapportées chez les larves des deux espèces *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*, élevées dans les mêmes installations, avec détection chez ces deux espèces d'un virus de type herpès.

De fortes mortalités sporadiques ont également été observées au cours des étés 1993, 1994 et 1995, sur des lots particuliers de naisains d'huître creuse, produits en écloséries ou provenant de captage naturel. Pour ces animaux de moins d'un an, il a été possible de détecter un virus de type herpès comparable à celui mis en évidence chez les larves. Cependant, dans ce cas, la démonstration du pouvoir pathogène de ce virus (reproduction expérimentale de mortalités sur animaux sains à partir de matériel biologique virosé) n'a pas encore été réalisée au laboratoire.

La difficulté de l'étude de ce virus réside non seulement dans l'impossibilité actuelle de pouvoir le cultiver *in vitro*, mais également aussi dans ses caractéristiques biologiques. En effet, les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* peuvent exister dans les cellules de l'hôte sous plusieurs formes : une forme latente, une forme peu productive et une forme d'infection aiguë.

En phase de latence (absence de symptôme et de mortalités), le virus n'est présent que sous forme d'ADN, intégré au génome de l'hôte ou sous formes circulaires dans la cellule. Au cours de cette phase, les particules virales ne sont pas produites.

Dans d'autres cas, le virus peut se multiplier de façon limitée. Un cycle viral peu productif conduit à un nombre réduit de virions qui ne sont que difficilement détectés en microscopie électronique. De plus, ce cycle viral peu productif n'induit pas nécessairement une infection clinique.

Dans la forme aiguë, forme observée chez les larves et le naisain, la multiplication intense du virus aboutit à une maladie clinique.

Les deux premières formes d'infection virale (latente et peu productive) sont supposées exister chez les huîtres adultes, le virus pouvant alors être transmis à la descendance sous forme activée mais encore peu productive. Chez les larves, le virus transmis pourra soit se multiplier et induire une infection, soit passer à un état de latence en l'absence de tout signe particulier. De ce fait, le développement de la maladie ultérieurement dans un lot d'animaux au stade naissain peut correspondre soit à l'activation d'un virus déjà présent chez certains individus sous une forme latente, soit à une contamination par le virus sous forme de particules infectieuses produites par des huîtres malades voisines. Toutefois, si les conditions sont défavorables à la multiplication du virus, celui-ci peut retourner à une phase de latence.

Pour pallier les difficultés du diagnostic de l'infection à herpèsvirus chez les huîtres, divers travaux ont été réalisés au sein du Laboratoire IFREMER GAP, afin de développer des techniques de diagnostic adaptées et sensibles, tout particulièrement à l'aide de la Biologie Moléculaire.

II - RAPPELS DES TRAVAUX CONCERNANT L'HERPESVIRUS OBSERVE CHEZ LES HUITRES - AOUT 1995/AVRIL 1996

Les travaux concernant le virus de type herpès, observé chez les huîtres, ont été poursuivis en 1995-1996 et ont ainsi permis d'aboutir à la mise au point d'un protocole de purification du virus, malgré l'ensemble des difficultés rencontrées (impossibilité de reproduire le virus sur lignées cellulaires, dépendance vis à vis des professionnels pour l'approvisionnement en matériel infecté et difficulté de planifier les expériences). De ce fait, le point de blocage que représentait l'obtention de particules virales en nombre suffisant pour le développement d'outils de diagnostic fiables et sensibles a été levé.

Etude des cas de mortalités

L'étude de ces cas concerne essentiellement l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, pour l'année 1995, avec comme objectif fixé d'essayer de préciser les relations mortalités et infection à virus de type herpès. 2378 huîtres (stade naissain) provenant de l'ensemble du littoral français ont ainsi été analysées sur coupes histologiques. 206 individus présentaient des anomalies cellulaires et nucléaires laissant suspecter une infection virale à herpès virus. Ces animaux provenaient de 52 lots différents.

Essais de reproduction de l'infection virale

Divers essais ont été menés au cours de l'année 1995, afin de reproduire la maladie au laboratoire.

Il a été ainsi possible de reproduire comme les années précédentes, l'infection chez des larves axéniques par inoculation dans les ballons d'élevage de broyats de larves virosées. Ce résultat est intéressant dans la mesure où il montre qu'il est possible, grâce à la congélation de matériel virosé, de reproduire la maladie à tout moment. De plus, il a été possible d'infecter expérimentalement des larves conventionnelles, en inoculant dans les bacs d'élevage des larves axéniques virosées expérimentalement. Ce type d'infection permet d'obtenir de plus grandes quantités d'animaux virosés. Cette approche a été développée dans le but de disposer de quantités de matériel biologique suffisantes pour entreprendre des essais de purification.

Quelques essais ont été également réalisées sur naissains et adultes. Dans ce cas, aucune mortalité n'a été observée chez les animaux ayant subi les essais.

Purification

En effet, il a été possible de purifier à plusieurs reprises des particules virales à partir de larves virosées fraîches. Cependant, le même protocole testé sur des lots de naissains présentant des mortalités anormales n'a pas permis d'aboutir à un résultat probant.

Par ailleurs les essais effectués à partir de larves ou de naissains virosés conservés congelés à -20°C, ont été infructueux.

Extraction de l'ADN viral, clonage et séquençage

Les quantités de virus purifié ainsi obtenues ont permis d'entreprendre divers travaux :

- De réaliser l'extraction de l'ADN viral et d'effectuer une première caractérisation de ce matériel par digestion avec des enzymes de restriction et électrophorèse en gel d'agarose. Il a été ainsi possible de démontrer que les particules virales purifiées contiennent un acide nucléique de type ADN, double brin. Cet ADN a une taille d'environ 180 Kpb. Ce résultat étaye l'hypothèse de l'appartenance de ce virus à la famille des *Herpesviridae*, virus à ADN double brin dont la taille du génome varie de 120 à 220 Kpb.

- De cloner des fragments de l'ADN extrait des particules virales purifiées, après digestion par l'enzyme EcoRI. Le clonage a été réalisé en plasmide Bluescript II KS (-). Ce type de clonage permet d'obtenir relativement rapidement des sondes nucléiques adéquates pour l'obtention d'outils spécifiques de diagnostic. Quatre des fragments clonés ont été choisis en fonction de leur longueur différente, afin de vérifier leur spécificité. Les premiers essais d'hybridation sur membrane ont donné des résultats très positifs. En effet, les quatre fragments testés donnent un marquage net sur les ADN extraits de larves et de naissains virosés et pas de marquage sur de l'ADN extrait d'huîtres creuses adultes saines.

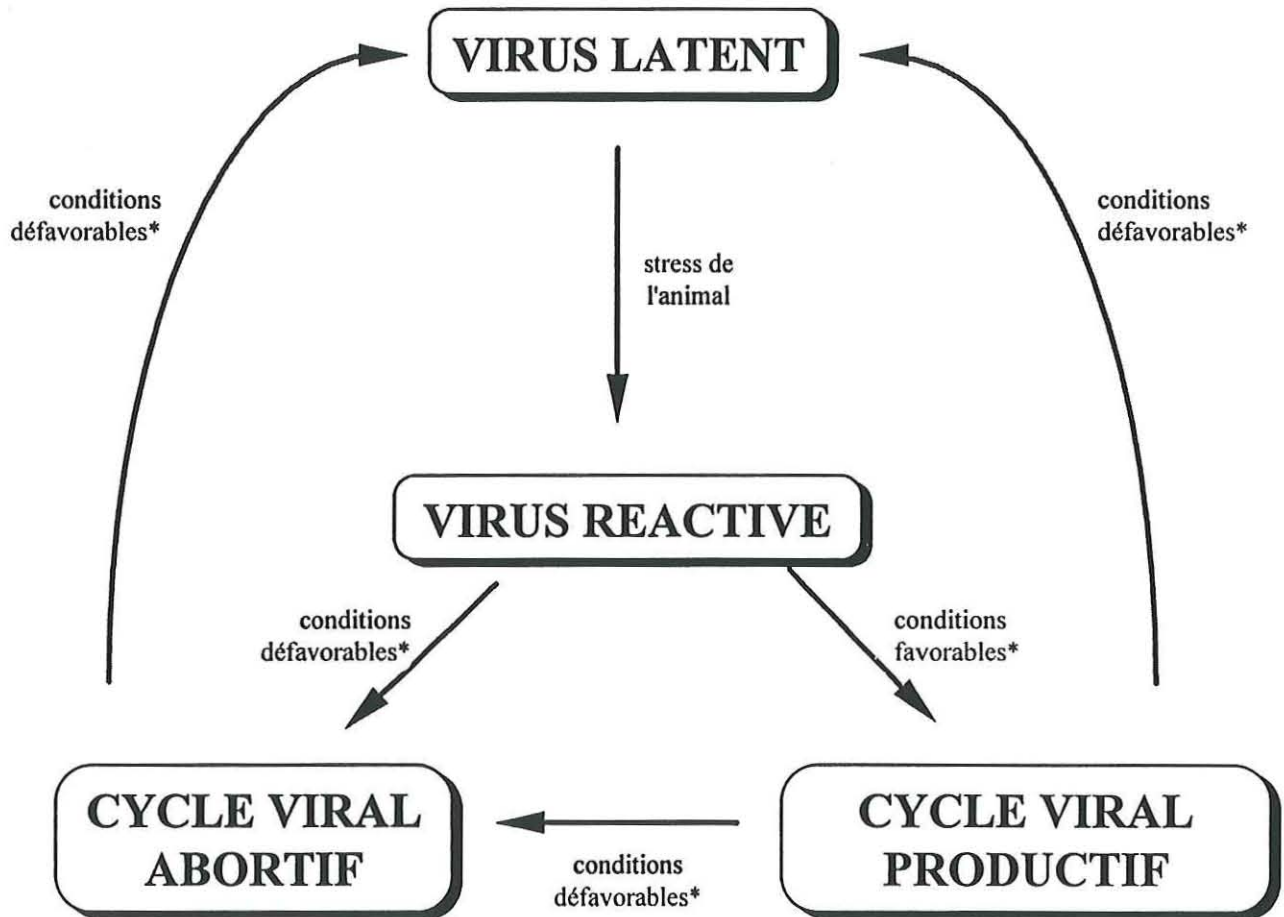
- Suite à ces résultats, le séquençage de ces quatre fragments clonés a été entrepris par C. Delsert (IFREMER, Sète), afin de pouvoir définir des zones propices à la construction de couples d'amorces pour la PCR. Nous disposons à l'heure actuelle d'amorces qui nous permettent d'obtenir une amplification claire sur ADN viral purifié, sur ADN extraits de larves virosés, sur broyats de larves et de naissains infectés et une absence d'amplification sur ADN d'huîtres adultes saines. Une méthodologie a été ainsi définie au laboratoire de La Tremblade pour le traitement des échantillons de larves et de naissain présentant des mortalités.

- D'envoyer au Dr A. Davison (Medical Research Council Virology Unit, Glasgow) de l'ADN viral extrait de particules purifiées afin qu'il puisse réaliser le séquençage complet du génome viral et le comparer à d'autres virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*.

Obtention d'anticorps spécifiques du virus

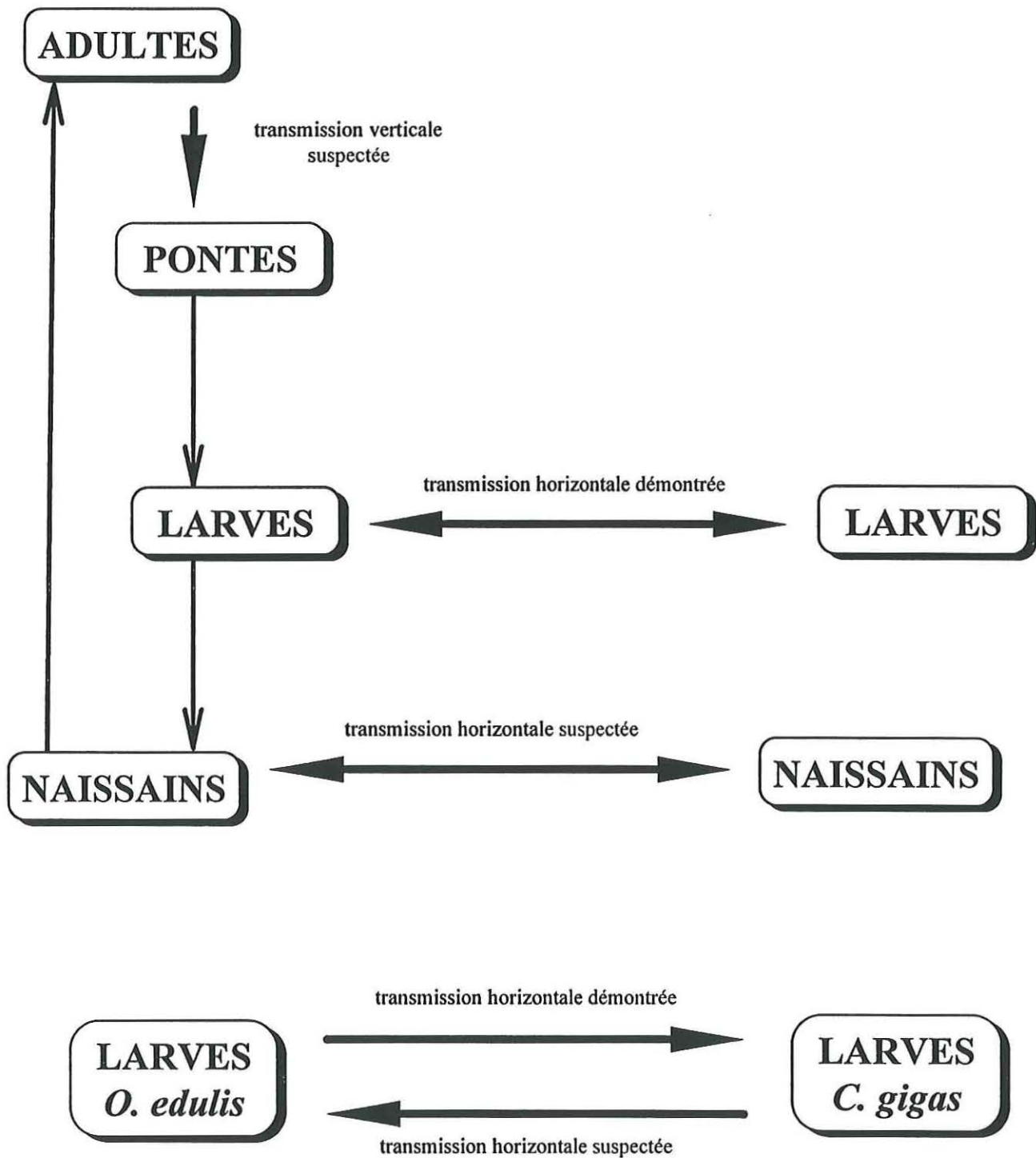
Trois souris BalbC ont été immunisées avec du virus purifié. Les sérums et les ascites (contenant des anticorps spécifiques) ont été récupérés après sacrifice des animaux. L'une des ascites montre une réactivité claire sur coupes histologiques de tissus d'huîtres infectées. Par ailleurs, les animaux immunisés ont également servi à réaliser une fusion lymphocytaire dans le but d'obtenir des anticorps monoclonaux spécifiques du virus. Les analyses pour cette dernière expérimentation sont en cours.

CYCLE DES HERPESVIRUS



*conditions favorables/défavorables pour le virus

TRANSMISSION DU VIRUS DE TYPE HERPES CHEZ LES HUITRES

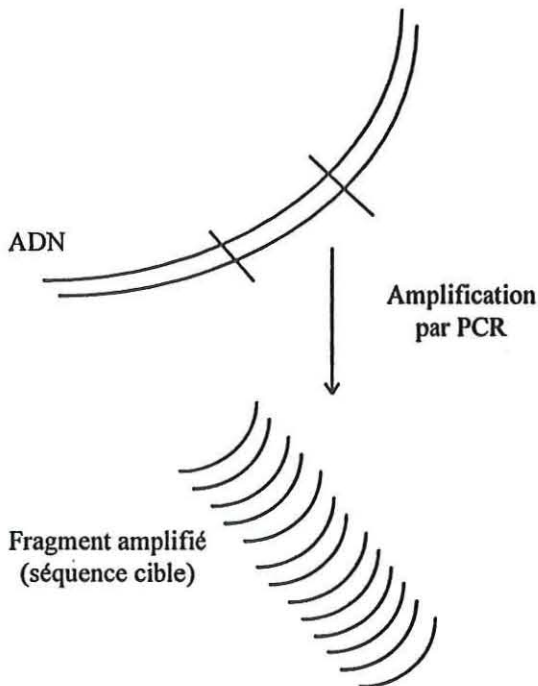


LA TECHNIQUE DE PCR GENERALITES

La technique de PCR - Généralités

La réaction d'amplification enzymatique ou PCR (pour polymerase chain reaction en anglais) est une réaction d'amplification de l'ADN.

Réalisation de la réaction d'amplification

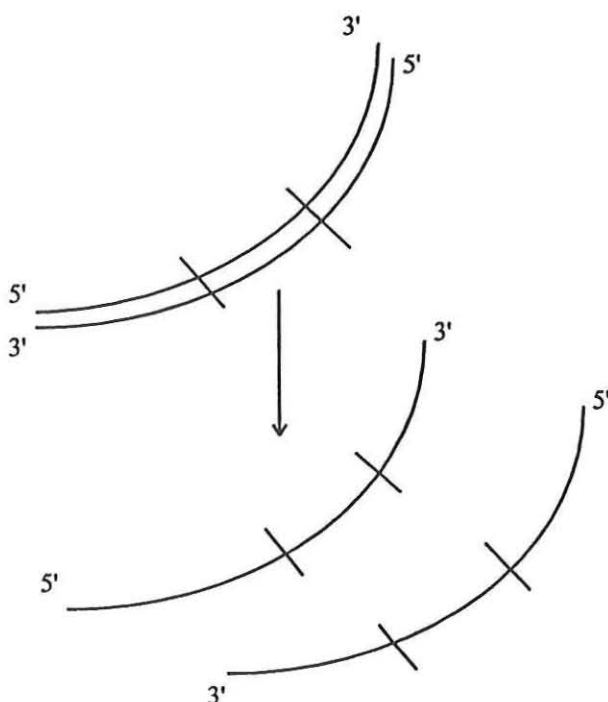


La PCR est une réaction enzymatique de polymérisation de l'ADN. Cette réaction d'amplification est obtenue par plusieurs cycles de polymérisation. Son originalité est que les copies d'ADN néosynthétisées servent de matrice au cours des cycles d'amplification suivants, aboutissant ainsi à une amplification exponentielle du nombre de copies.

On appelle séquence cible d'amplification, la région de l'ADN qui sera spécifiquement amplifiée au cours de la PCR. La taille de la séquence cible varie d'une centaine à quelques centaines de bases.

L'amplification de l'ADN cible est obtenue par une série de cycles d'amplification. Une PCR classique comporte 30 cycles. Un cycle d'amplification est défini comme la période au cours de laquelle la quantité d'ADN cible est multipliée par deux.

Description des cycles de PCR



Le cycle d'amplification est constitué de trois étapes. Chacune des étapes est réalisée à une température particulière.

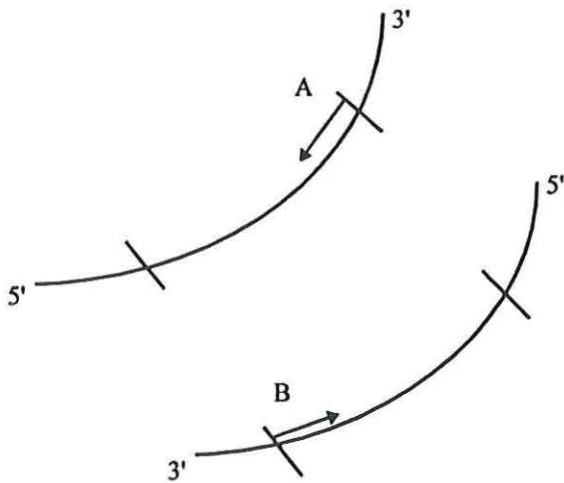
Rappels sur la structure de l'ADN

* l'ADN est une molécule orientée, dont les extrémités sont désignées 5' et 3'.

* Les 2 brins de l'ADN double brin s'hybrident en orientation inverse.

* Deux brins d'ADN s'hybrident de façon spécifique, en fonction de leur séquence, les séquences respectives des brins d'une molécule d'ADN double brin sont dites "complémentaires" (les bases A et T sont complémentaires, les bases G et C sont complémentaires).

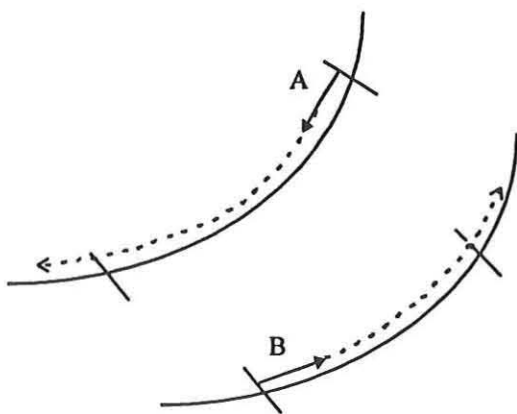
La première étape est réalisée à 94°C pendant 1 minute. Sous l'effet de la température, les deux brins constituant l'ADN sont séparés. Cette étape "transforme" l'ADN double brin en ADN simple brin, qui servira de matrice pour l'amplification ultérieure. Cette première étape est l'étape de dénaturation.



La deuxième étape est réalisée à 50°C pendant 1 minute. A cette température, les amorces (= primers = oligonucléotides), qui serviront de départ à la polymérisation s'hybrident de façon spécifique sur l'ADN matrice, de part et d'autre de la séquence cible d'amplification. Les amorces sont désignées A et B sur le schéma, la tête de flèche indique l'extrémité 3'. Pour que les amorces s'hybrident préférentiellement, une grande quantité en est ajoutée au milieu réactionnel. De plus, les amorces étant de petite taille, leur cinétique d'hybridation sur les brins d'ADN matrice est beaucoup plus rapide que celle des brins matrice entre eux.

Cette deuxième étape est l'étape d'hybridation (= annealing). Les amorces sont des oligonucléotides de synthèse, de séquence définie (25 à 35 bases nucléotidiques). La température d'hybridation est déterminée par la séquence des amorces.

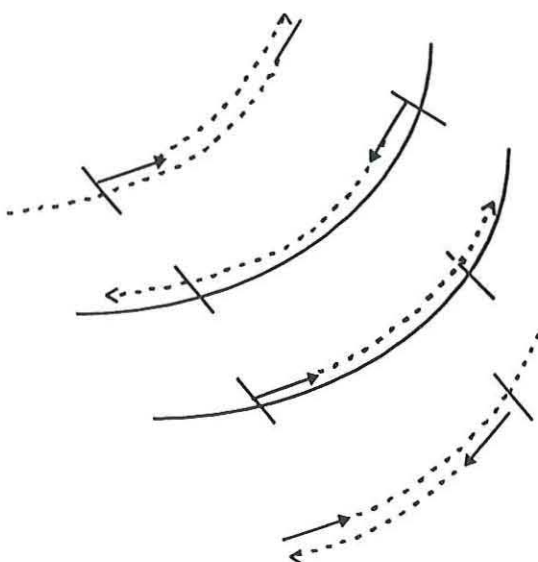
Les amorces servent de point de départ à la polymérisation. Les amorces sont choisies de façon à orienter la polymérisation de l'ADN de manière convergente.



La troisième étape est réalisée à 72°C pendant 1 minute. C'est l'étape d'allongement des amorces par polymérisation ou étape d'élongation. L'enzyme utilisée est une ADN polymérase thermorésistante (= Taq polymérase) purifiée à partir de bactéries thermophiles. Cette polymérase reste stable à des températures pouvant aller jusqu'à 95°C.

L'enzyme polymérise à partir de l'extrémité 3' des amorces. Elle prend pour matrice le brin d'ADN sur lequel est hybridée l'amorce et polymérise un brin d'ADN de séquence complémentaire.

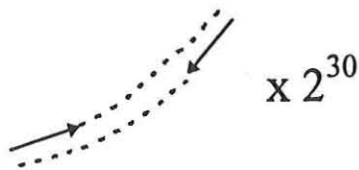
Le cycle d'amplification est maintenant terminé. Ce cycle a permis de doubler le nombre de copies de la séquence cible.



Au deuxième cycle, l'étape de dénaturation fournit maintenant 4 brins matrices.

L'étape d'hybridation permet aux amorces de s'hybrider aux 4 brins matrices.

L'étape d'élongation du deuxième cycle aboutit au doublement des 4 brins matrices issus du premier cycle.



Au troisième cycle, le nombre de copies de la séquence cible est à nouveau multiplié par deux.

Les cycles d'amplification sont reproduits à l'identique une trentaine de fois. A chaque cycle, le nombre de copies de la séquence cible est multiplié par deux.

Après 30 cycles, le nombre de copies de la séquence cible est de l'ordre de 2^{30} , c'est à dire, l'amplification est de l'ordre du million. Le mélange réactionnel contient donc un fragment d'ADN amplifié de la taille de la séquence cible.

Obtention des produits d'amplification

Dans la pratique, la réalisation de la PCR est assez simple.

1 - Un mélange réactionnel (= mix) est tout d'abord préparé. Il contient en milieu tamponné les éléments utiles à l'activité de la polymérase :

- Le tampon est fourni en même temps que l'enzyme, sous une forme 10 fois concentrée.
- Le $MgCl_2$ est fourni en même temps que l'enzyme. Sa concentration optimale est à déterminer pour chaque couple d'amorces ou type d'enzyme.
- Les 4 nucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dGTP et dCTP = dNTPs), nécessaires à la polymérisation de l'ADN.
- Les amorces A et B.
- La polymérase thermorésistante (= Taq polymérase).

2 - Ce mélange réactionnel est distribué dans des microtubes (50 à 100 μ l).

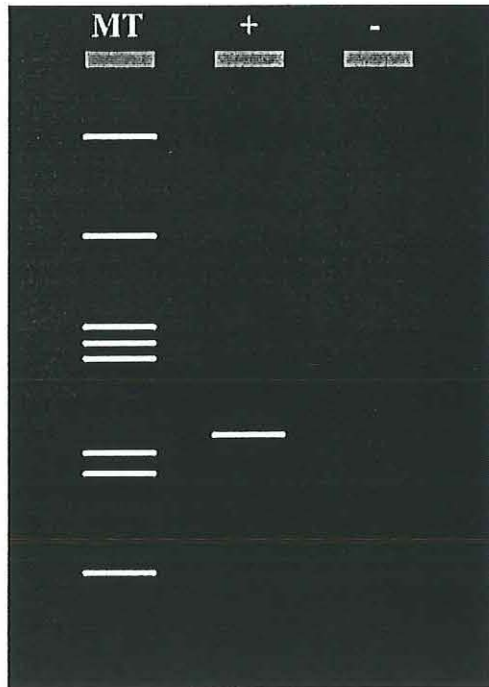
3 - Les échantillons et les témoins positifs et négatifs sont distribués dans différents tubes (de l'ordre de 1 μ l par tube).

4 - Les conditions de température imposent de recouvrir l'échantillon d'huile minérale, afin d'éviter l'évaporation.

5 - Les cycles thermiques permettant l'amplification sont réalisés au moyen d'une machine (thermocycleur), sur laquelle sont programmées la température et la durée des trois étapes de chaque cycle d'amplification, ainsi que le nombre de cycles souhaités. La durée totale de l'amplification dure généralement entre 2 et 4 heures, suivant le type de machine et le nombre de cycles choisi.

Analyse des produits d'amplification

Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose.



1 - Les produits de PCR sont mélangés avec un tampon de dépôt contenant du sucrose ou du glycérol afin d'alourdir les échantillons ainsi que deux colorants permettent de suivre le déroulement de la migration lors de l'électrophorèse.

2 - Les échantillons ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (contenant plusieurs fragments de taille connue) sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose

3 - Le gel d'agarose est soumis à un champ électrique pendant environ une heure. Dans ces conditions, les fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille.

4 - Le gel est coloré au bromure d'éthidium. Ce colorant est généralement directement ajouté au gel lors de sa préparation. La coloration est alors réalisée en même temps que l'électrophorèse.

5 - Le gel coloré au bromure d'éthidium est observé sur une table lumineuse en lumière UV. Les produits d'amplification, s'ils sont en quantité suffisante, apparaissent sous la forme d'une bande fluorescente. Le calcul et le contrôle de leur taille se fait par comparaison de leur migration avec celle du marqueur de poids moléculaire.

**APPLICATIONS ET
PERSPECTIVES DU
DIAGNOSTIC PAR PCR
DU VIRUS DE TYPE HERPES
CHEZ LES HUITRES**

Applications et perspectives du diagnostic par PCR du virus de type herpès chez les huîtres

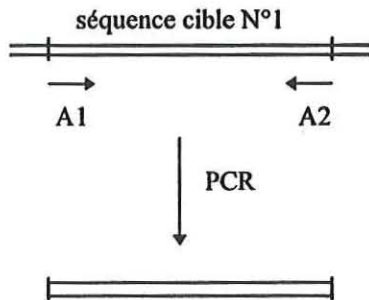
Mise au point du diagnostic par PCR

1 - Obtention d'ADN viral cloné

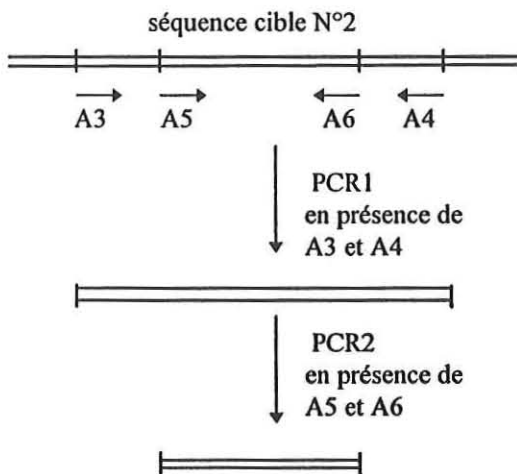
La purification des particules virales à partir de larves de *Crassostrea gigas* virosées à la fin de l'été 1995 a permis d'extraire l'ADN viral. Cet ADN, dont la taille a été estimée à 180kpb, a été cloné dans un plasmide, sous forme de fragments de 1 à 4 kpb (= fragments de restriction). Les fragments clonés d'ADN viral peuvent être produits à volonté dans des bactéries transformées, c'est à dire dans lesquelles les plasmides ont été introduits et peuvent se multiplier.

2 - Séquençage et détermination de couples d'amorces pour la PCR

Parmi les fragments clonés d'ADN viral, certains ont été séquencés. Des séquences cible pour l'amplification par PCR ont été choisies dans ces séquences d'ADN viral, puis plusieurs couples d'amorces (A1+A2 ; A3+A4 ; A5+A6) ont été déterminés en fonction de ces séquences cibles.

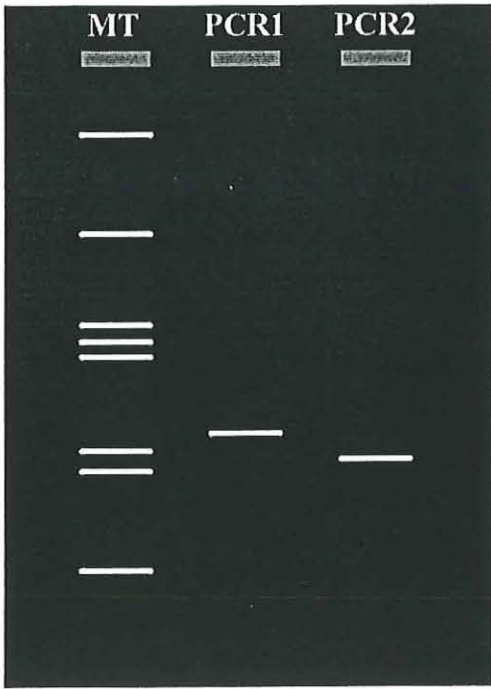


Le premier couple (A1+A2) testé n'a pas été retenu car la sensibilité de l'amplification ne s'est pas avérée suffisante. De plus, du fait de sa séquence, la spécificité de ces amorces n'était pas satisfaisante. En effet, si un fragment spécifique était amplifié à partir d'ADN viral, de façon très intense, plusieurs autres fragments d'intensité plus faible et de taille différente étaient amplifiés à partir d'ADN de *Crassostrea gigas*.



Les deux autres couples d'amorces (A3+A4 et A5+A6) permettent l'amplification de séquences cibles de l'ADN viral de façon spécifique. Un seul fragment est amplifié pour chacun de ces couples d'amorces en présence d'ADN viral. Aucune amplification non spécifique n'est visible à partir d'ADN de *Crassostrea gigas* ou d'*Ostrea edulis*.

Ces couples d'amorces sont utilisés dans une réaction de nested PCR. Celle-ci consiste à réaliser une première amplification par PCR en présence du couple d'amorces A3+A4. Puis, 1µl des produits de cette première PCR est utilisé pour réaliser une deuxième amplification en présence du couple d'amorce A5+A6. La méthode de nested PCR permet ainsi d'augmenter la sensibilité de la détection du virus dans des échantillons.



Les produits de PCR sont visualisés après électrophorèse en gel d'agarose 1%.

3 - Traitement des échantillons

Différents essais ont conduit aux protocoles suivants.

Larves

- 50 mg de larves sont pesées en portant des gants et à l'aide d'une pipette Pasteur neuve.
- Les larves sont broyées en présence de 50 µl d'eau distillée, dans un microtube de type Eppendorf, à l'aide d'un piston Pellet à usage unique.
- Ce broyat est placé au bain-marie bouillant 10 minutes, puis centrifugé (8000rpm, 5min).

Naissain <3mm

- Les animaux de moins de 3mm peuvent difficilement être ouverts, ils sont donc broyés avec la coquille de la façon suivante.
- Les animaux sont séchés sur du papier absorbant, puis ils sont réunis par pools de 5 (6 pools) dans des tubes Eppendorf. Dans le même temps, ils sont pesés (Xg)
- Ces animaux sont broyés en présence de X ml d'eau distillée, dans un microtube de type Eppendorf, à l'aide d'un piston Pellet à usage unique.
- Ce broyat est placé au bain-marie bouillant 10 minutes, puis centrifugé (8000rpm, 5min).

Naissains >3mm

- Un échantillon de 30 animaux est analysé, quelle que soit leur taille. Ces animaux sont traités par pools de 5. Le traitement de ces pools et, en particulier, le broyage en eau distillée tient compte du poids de chair obtenu (0,5 ml pour 0,5 g de tissus ou X ml pour X g de tissus) de façon à "standardiser" le protocole.
- 30 animaux sont ouverts à l'aide d'un couteau à huître, au préalable longuement lavé, ou d'une lame de scalpel neuve.
- Les animaux sont séchés sur du papier absorbant, puis ils sont réunis par pools de 5 (6 pools) dans des boîtes de Pétri.
- Les tissus sont dilacérés très finement à l'aide de lames de rasoir, puis conservés sur glace. Les lames ainsi que les gants sont changées entre chaque pool.
- 0,5g (ou Xg si les animaux sont petits) de tissus dilacérés sont pesés à l'aide d'une pipette Pasteur neuve.
- Ces tissus sont broyés en présence de 0,5 ml (ou X ml) d'eau distillée, dans un microtube de type Eppendorf, à l'aide d'un piston Pellet à usage unique.
- Ce broyat est placé au bain-marie bouillant 10 minutes, puis centrifugé (8000rpm, 5min).

PCR

- Un certain nombre de précautions doivent être prises, elles sont détaillées dans la partie "protocoles" de ce fascicule. Globalement, ces précautions concernent l'utilisation d'un matériel adapté (gants, matériel jetable, cônes à filtres, etc...) et réservé à l'usage exclusif de la PCR (pipettes).

De plus, il faut souligner l'importance de séparer les différentes étapes de l'analyse d'échantillons par PCR dans différentes pièces, de façon à limiter les contaminations entre différents lots et la contamination des réactifs et du matériel. Ainsi, trois pièces doivent être utilisées :

- une pour la préparation des échantillons
- l'autre pour la préparation des réactifs
- la troisième pour la mise en route de la réaction et la manipulation des produits de réaction.

- Des témoins négatifs (eau distillée) sont réalisés : un témoin entre chaque lot de naissain ou tous les 10 lots de larves, plus le premier et l'avant dernier tube. Un autre témoin négatif est réalisé (un tube), il contient de l'ADN extrait d'huîtres saines, *C. gigas* ou *O. edulis*. Un témoin positif est réalisé, c'est le dernier tube.

- 1 µl du surnageant de chaque broyat ou des témoins est utilisé pour réaliser la PCR1, en présence des amorces A3 et A4.

- Le résultat est analysé par électrophorèse en gel d'agarose :

* Si une bande très intense est visualisée sur gel, le produit de PCR1 doit être dilué au 1/50^e pour ne pas inhiber la PCR2.

* Si la bande amplifiée est faible ou non visible, le produit de la PCR1 n'est pas dilué.

- 1 µl du produit de la PCR1, dilué ou non, est utilisé pour réaliser la PCR2.

- Le résultat est analysé par électrophorèse en gel d'agarose :

* Les témoins négatifs doivent être négatifs, les témoins positifs doivent être positifs. Ceci est contrôlé en PCR1 et en PCR2

* Une bande très intense ou faible est visualisée sur gel : résultat positif, l'ADN viral est présent dans les échantillons analysés.

* Pas d'amplification visible : résultat négatif, rien ne permet d'affirmer que le virus soit absent, il peut en effet être en quantité trop faible pour être détectée.

4 - Spécificité et sensibilité de la détection d'ADN viral dans les échantillons

Les couples d'amorces A3A4 et A5A6, utilisés en nested PCR ne permettent pas d'amplifier de fragment visible à partir de broyats de larves, naissains ou adultes de *C. gigas* ou d'*O. edulis* "saines" ni à partir d'ADN (1µg) extrait de *C. gigas* ou d'*O. edulis*

Ces couples d'amorces (A3A4 + A5A6) ont été testés sur des lots de larves et de naissains de deux espèces (*C. gigas* et *O. edulis*.) et permettent la détection d'herpèsvirus par PCR.

La sensibilité de la détection d'ADN viral dans les échantillons a été déterminée par addition de quantités connues d'ADN viral extrait à partir de particules virales purifiées, dans des broyats d'animaux "sains" (larves et naissains). De cette façon, chez les larves, 50 copies de la séquence cible peuvent être détectées, ce qui représente une sensibilité relativement importante. Chez le naissain, cette sensibilité est de 5.10^6 copies. La différence de sensibilité entre les deux types d'échantillons peut s'expliquer par la présence d'inhibiteurs de la PCR dans les broyats, qui seraient en plus grande proportion dans les échantillons de naissains.

Différents lots de larves et de naissain ont été analysés à l'URPIG dans le cadre de la mise au point du protocole, de l'analyse de cas de mortalités 1996 et du suivi de pontes protocolaires. L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans le tableau ci-dessous. Il faut noter que la détection du virus de type herpès n'a été associée à ce jour qu'à des lots (larves et naissains) présentant des mortalités.

	mortalités	nombre de lots	résultat en PCR
larves	importantes	30	tous positifs
	aucune	34	tous négatifs
naissains (lots de 30 à 100 animaux)	importantes	6	tous positifs
	aucune	17	tous négatifs

Applications et perspectives du diagnostic par PCR

Le protocole décrit ici est reproductible. Il permet de détecter le virus de type herpès de façon fiable, en éliminant les résultats faux positifs. La sensibilité actuelle de la méthode peut permettre de détecter un virus en phase de multiplication précoce. Ce protocole peut donc être appliqué tel quel pour la détection de virus dans des lots d'animaux (larves et naissains) présentant des mortalités, afin d'étudier l'implication de l'herpèsvirus dans ces phénomènes.

La détection de virus en phase de latence est encore aléatoire. En effet, si la sensibilité de la détection chez les larves est grande (50 copies), les connaissances actuelles sur le cycle de ce virus ne permettent pas de définir si cette quantité d'ADN cible correspond à un virus en phase de latence ou en phase de multiplication précoce. En effet, d'après les données bibliographiques, les virus apparentés à la famille des *Herpesviridae* peuvent présenter des formes différentes au cours de leur phase de latence (ADN viral intégré au génome de l'hôte ou ADN viral sous forme circulaire présent dans le noyau de la cellule hôte). Selon les virus, une à plusieurs dizaines de copies de l'ADN viral peuvent être présentes dans les cellules porteuses, et un nombre variable de cellules par animal peuvent être porteuses. De plus, rien ne permet de savoir quelle est, dans un lot donné, la proportion d'animaux porteurs asymptomatiques du virus en phase de latence.

Ces données montrent que le diagnostic du virus de type herpès ne peut être qu'un diagnostic positif, si la présence du virus est détectée. A l'heure actuelle, si le résultat est négatif pour la détection du virus en PCR, le diagnostic ne permet pas de définir si les animaux sont indemnes ou porteurs asymptomatiques.

Les travaux de mise au point qui seront réalisés dans les prochaines semaines vont porter sur l'amélioration de la sensibilité de la méthode de PCR, chez les larves et plus particulièrement le naissain (PCR à partir d'ADN extrait), et la validation de ces méthodes. Des analyses sur des lots d'animaux (*O. edulis* et *C. gigas*) en absence de mortalités seront réalisées dans ce cadre.

**MATERIEL, METHODES ET
PRECAUTIONS**

DIAGNOSTIC PAR PCR

MATERIEL ET PRECAUTIONS GENERALES

LOCAUX : Trois pièces distinctes sont nécessaires à la mise en place de techniques de diagnostic par PCR :

Une pièce pour la préparation des réactifs ; *pièce réactifs*

Une pièce pour la préparation des échantillons ; *pièce échantillons*

Une pièce pour la mise en route de la réaction de PCR ; *pièce PCR*

PAILLASSE : Afin de préserver les échantillons et les réactifs des contaminations éventuelles, il est nécessaire de travailler sur une paillasse protégée par une feuille de papier aluminium, qui est renouvelée après chaque manipulation.

PIPETTES : 1 jeu de pipettes automatiques décontaminées (lavages et sonication) ou neuves (P20, P200) réservé au traitement des échantillons.

1 jeu de pipettes automatiques décontaminées ou neuves (P20, P200, P1000) réservé au prélèvement des réactifs.

Les pipettes sont identifiées "réactif" ou "échantillon" et ne servent qu'à la PCR.

CONES : Il est indispensable de travailler avec des cônes à filtre pour éviter les contaminations dues aux aérosols. Comme pour les pipettes, il est nécessaire d'avoir des boîtes de cônes identifiées pour les réactifs et pour les échantillons.

Entre chaque réactif il est impératif de changer de cône, si un cône touche la paillasse ou les gants, il faut de le remplacer avant de (re)-prélever.

BAC à GLACE : Il est très fortement recommandé de travailler avec deux bacs à glace distincts, l'un servant à conserver les échantillons, et l'autre ne servant que pour les réactifs.

PORTOIR DE TUBES : Il est nécessaire de posséder au moins deux portoirs pour les tubes, l'un n'étant utilisé que pour disposer les réactifs et l'autre pour les échantillons.

GANTS : L'utilisation de gants en latex est un facteur permettant de limiter les contaminations. Il faut donc toujours porter des gants pour réaliser des techniques de PCR, mais **il faut toujours travailler avec des gants propres.**

Il est indispensable de changer de paire de gants entre chaque pièce.

Les gants sont une protection pour vous, vis à vis des produits dangereux, mais il permettent de limiter la contamination échantillon/échantillon entre deux prélèvements, la contamination échantillon/réactifs, ainsi que la contamination du matériel propre par des mains souillées que ce soit par des échantillons ou des produits de PCR (invisibles et insoupçonnables !)

REACTIFS : Les solutions stock sont soit conservées sur la paillasse, soit conservées à -20°C selon leurs nature. Elles doivent être systématiquement aliquotées au moment de leur utilisation car il ne faut en aucun cas pipetter dans une solution stock, même avec du matériel propre et même s'il s'agit d'eau distillée.

Réactifs pour PCR :

Tous les réactifs pour PCR sont conservés à -20°C et doivent être décongelés sur glace car ils sont très sensibles aux congélations et décongélations successives, une fois décongelés il faut impérativement les conserver à 4°C sur glace.

Les solutions stock de ces réactifs sont aliquotées en tubes Eppendorf propre, ce qui permet d'avoir de petits volumes qui ne seront décongelés qu'un minimum de fois.

Les enzymes sont des réactifs en solution aqueuse contenant du glycogène. Ces réactifs restent donc liquides même conservés à -20°C , **il est impératif de ne jamais sortir ces tubes du congélateur** pour ne pas altérer l'enzyme.

Chaque utilisateur possède ses propres tubes de réactifs, même si les solutions stock de départ sont les mêmes pour tous les utilisateurs, ceci afin de limiter au maximum les contaminations et l'altération des réactifs.

Ne pas stocker les réactifs dans le même congélateur que les échantillons.

DECHETS : Lors de la préparation des échantillons (larves, naissains), tous les déchets sont collectés dans des "poubelles de table", en aluminium garnie de papier absorbant. Ces déchets sont potentiellement contaminés par des particules virales infectieuses, il doivent être stockés dans un sac à autoclave, puis autoclavés 20 min à 120°C avant d'être éliminés par la voie classique. Les mêmes précautions sont à prendre pour les déchets provenant de la manipulation des produits de PCR.

Les gels et le tampon TAE sont éliminés dans des containers adéquats car ils contiennent du Bromure d'Ethidium, ils sont traités par une société spécialisée dans le recyclage de produit dangereux.

TEMOINS : Un témoin positif (10 ng d'ADN extrait de virus purifié) est réalisé pour chaque séries d'analyses. Le témoin permet de vérifier la qualité de la réaction de PCR et de mettre en évidence une éventuelle altération d'un des réactifs. Ce témoin est le dernier de chaque série de façon à limiter d'éventuelles contaminations.

Des témoins négatifs composés d'eau sont introduits dans les séries de PCR pour contrôler qu'il n'y a pas de contamination d'un tube d'échantillon à un autre.

TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

LARVES

- 1- Echantillons de larves en tubes Eppendorf
- 2- Décongeler les échantillons
- 3- Centrifuger 5 minutes à 4°C à 8 000g
- 4- Eliminer l'eau de mer pour ne garder que le culot
- 5- Conserver dans la glace
- 6- Préparer des tubes Eppendorf bleus (1 ml) + 50µl d'eau distillée
- 7- Peser dans chaque tube 50 mg de larves (1 lot) en changeant de gants et de pipette pasteur pour chaque prélèvement
- 8- Broyer les larves avec les pistons Pellet bleus (environ 5 minutes), et conserver dans la glace

* A cette étape les prélèvements peuvent être congelés à - 20°C ou bien l'extraction peut être réalisée tout de suite.

* Si les échantillons sont traités à la protéinase K, il faut peser 50 mg de larves dans des tubes bleus secs.

TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

NAISSAINS

- 1- Préparer le matériel nécessaire dans la *pièce échantillon* avant de commencer le traitement
- 2- Décongeler les naissains sur la glace, dans le bac à glace échantillons
- 3- Ouvrir 30 (6 x 5) animaux du même lot.
- 4- Eliminer l'excédent d'eau de mer en déposant les animaux sur du papier absorbant quelques minutes.
- 5- Placer les animaux entiers par pool de 5 dans des boîte de Pétri neuves et conserver dans la glace
- 6- Avec une lame de rasoir, broyer le plus finement possible pendant au minimum 5 min, plus si nécessaire.
- 7- Dans des tubes Eppendorf bleus contenant 500 μ l d'eau distillée, peser 0.5 g de chaque broyât.
- 8- Conserver sur glace
- 9- A l'aide d'un piston bleu terminer de dilacérer les animaux jusqu'à obtention d'une solution homogène
- 10- Préparer un bain-marie bouillant
- 11- Placer les tubes bleus sur un portoir flottant au bain-marie bouillant pendant 10 min.
- 12- Placer les tubes dans la glace pendant quelques minutes.
- 13- Vortexer
- 14- Centrifuger 5 min, 8 000 g, à 4°C. Les échantillons peuvent être conserver à -20°C à l'issu de cette étape.
- 15- 1 μ l de surnagent sera utilisé pour la PCR 1.

PREPARATION D'ADN

PROTOCOLE N°1

I - Par chauffage :

- 1- Sous la hotte, faire bouillir de l'eau distillée
- 2- Mettre les tubes de larves ou de naissains broyés sur des portoirs flottants et mettre au bain-marie bouillant pendant 10 minutes
- 3- Mettre les tubes dans la glace quelques minutes
- 4- Vortexer
- 5- Centrifuger 5 min à 8 000 g à 4°C
- 6- Prélever 1 μ l de surnagent pour la PCR1

II - Par chauffage et microdialyse

- 7- Préparer les échantillons comme décrit ci-dessus (étape I)
- 8- Récupérer 10 à 15 μ l de surnagent
- 9- Sous la hotte : mettre de l'eau distillée dans une boîte de Pétri
 - 10- déposer un filtre de microdialyse sans l'immerger
 - 11- déposer 10 à 15 μ l de surnagent d'échantillon sur le filtre
 - 12- refermer la boîte de pétri
 - 13- laisser dialyser 30 min
 - 14- transférer 10 à 15 μ l de la goutte après dialyse dans des tubes Eppendorf propres
- 15- Prélever 1 μ l de ce dialysât pour la PCR 1

PREPARATION D'ADN PROTOCOLE N°2

Ce protocole est encore en phase d'expérimentation. Il devrait permettre d'éliminer un certain nombre d'inhibiteurs présents dans les broyats de tissus d'huître. De plus, la précipitation de l'ADN permet de concentrer l'échantillon. Différentes étapes sont proposées qui sont réalisées de façon chronologique : 1, 2, 3 ou 1, 2', 3'.

ETAPE 1 TRAITEMENT PROTEINASE K

- A partir de 50 mg de larves en tubes Eppendorf bleus secs :
- Broyer dans 380 μ l de tampon de digestion.

Tampon de digestion :

10 mM NaCl;
10 mM Tris pH 8;
25 mM EDTA;
0.5 % SDS;
0.2 mg/ml protéinase K.

- Préparer d'abord du tampon de digestion sans SDS et sans protéinase K.

Pour 10 ml

200 μ l
100 μ l
500 μ l
(500 μ l)
(x μ l)
8.7 ml

Solutions stock

NaCl 5M
Tris pH 8 1M
EDTA 0.5M
SDS 10 %
protéinase K
H₂O distillée

- Après broyage des larves, ajouter 20 μ l de SDS 10 % (0.5 % final).
- Le volume total est de 380+20 = 400 μ l
- Ajouter 8 μ l de protéinase K (0.2 mg/ml final)
- Vortexer
- Laisser un nuit à 50°C au bain -marie

ETAPE 2 PHENOL-CHLOROFORME

- Après traitement à la protéinase K, les protéines sont éliminées :
- Echantillon = 1 volume (400 μ l)
- Ajouter un volume de phénol + un volume de chloroforme/alcool isoamylique
- Agiter à la main ou vortexer
- Centrifuger * 10 000 g, 10 min, 4°C pour les tubes Eppendorf
* 3 000 g, 20 min, 4°C pour les tubes de 50 ml.
- Prélever le surnagent et le transférer dans des tubes propres
- Refaire une extraction ou deux si nécessaire.
- Prélever le surnagent et transférer dans des tubes propres
- Ajouter un volume de chloroforme/alcool isoamylique
- Agiter à la main ou vortexer.
- Centrifuger * 10 000 g, 5 min, 4°C pour les tubes Eppendorf
* 3 000 g, 10 min, 4°C pour les tubes de 50 ml.
- Prélever la phase supérieure et la transférer dans des tubes propres.
- Si nécessaire, procéder à un nouvelle extraction chloroforme/alcool isoamylique.

ETAPE 3 PRECIPITATION DE L'ADN

- Ajouter à la phase aqueuse, dans l'ordre :
 - 1- 3 μ l de glycogène
 - 2- $\frac{1}{4}$ de volume d'acétate de sodium 3M
 - 3- Vortexer, puis ajouter 2 volumes d'éthanol absolu.
- Laisser précipiter à -80°C une heure au moins.
- Centrifuger 12 000 g, 20 min, 4°C.
- Eliminer le surnagent
- Ajouter 1 ml d'éthanol à 70% sans ressuspendre le culot.
- Centrifuger à 12 000 g, 15 min, 4°C.
- Eliminer le surnagent.
- Faire sécher les culots au speed vac environ 15 min ou à l'étuve à 37°C, 30 min environ.
- Reprendre les culot dans de l'eau distillée, le volume d'eau varie en fonction de la taille des culots (environ 50 μ l).
- Prélever 1 μ l pour la PCR 1.

ETAPE 2'
TRAITEMENT - NaCl 6M

- Après traitement classique à la protéinase K les protéines sont éliminées :
- Echantillon = 1 volume (400 μ l)
- Ajouter 100 μ l de NaCl 6 M
- Vortexer environ 15 secondes
- Centrifuger 2 500 g, 15 min, 4°C.
- Prélever le surnageant et le transférer dans un tube propre.

ETAPE 3'
PRECIPITATION DE L'ADN

- Ajouter 3 μ l de glycogène et vortexer
- Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu à température ambiante
- Laisser précipiter à -80°C une heure au moins.
- Centrifuger 12 000 g, 20 min, 4°C.
- Eliminer le surnageant
- Ajouter 1 ml d'éthanol à 70% sans resuspendre le culot.
- Centrifuger à 12 000 g, 15 min, 4°C.
- Eliminer le surnageant.
- Faire sécher les culots au speed vac environ 15 min ou à l'étuve à 37°C, 30 min environ.
- Reprendre les culot dans de l'eau distillée, le volume d'eau varie en fonction de la taille des culots (environ 50 μ l).
- Prélever 1 μ l pour la PCR 1

CE PROTOCOLE PERMET D'EVITER LES ETAPES PHENOL/CHLOROFORME

Matériel et précautions :

Dans la pièce réactifs :

1'- Utiliser des tubes Eppendorf de 0.5 ml pour PCR.

Utiliser des gants propres pour manipuler les tubes, les sortir du sachet stock, les fermer aussitôt puis les identifier.

2'-3'- Utiliser des tubes propres, et les remplir avec les flacons de solutions mères sans pipetter.

5'- Conserver le tube de préparation du mix dans la glace et distribuer les différents réactifs dans la glace.

Tous les réactifs de PCR sont aliquoter avant utilisation.

NE JAMAIS SORTIR LA TAQ DU CONGELATEUR, pipeter le volume nécessaire directement dans le congélateur.

7'- Utiliser les pipettes et les cônes réactifs.

Ne pas refermer les tubes une fois que le mix est distribué.

Dans la pièce PCR :

8'- Utiliser les pipettes et les cônes échantillons.

9'- Si le nombre de tube est très important, mettre les tubes contenant l'échantillon et l'huile, dans le bac de glace échantillons avant de lancer le programme du thermocycleur afin que ne se produisent pas de réactions aspécifiques le temps de la distribution de tous les échantillons.

PROGRAMME DES CYCLES DE PCR

Thermocycleur Cyclone - Programme :

94°C - 2 min
94°C - 1 min *
50°C - 1 min * 30 fois
72°C - 1 min *
72°C - 5 min

Durée du programme 3 heures 15.

ELECTROPHORESE

Préparation du gel d'agarose 1% en TAE 1X :

- 1- Dans une bouteille propre, peser 3g d'agarose.
- 2- Ajouter 300 ml de TAE 1X (150 ml d'agarose sont nécessaires pour un grand gel).
- 3- Mettre au micro-onde avec le bouchon de la bouteille dévissé d'1/4 de tour pendant environ 3 min (jusqu'à complète liquéfaction et transparence).
- 4- Faire refroidir l'agarose, sous l'eau si nécessaire.
- 5- Ajouter du Bromure d'Ethidium (ATTENTION = MUTAGENE), 5 μ l /100 ml.après avoir refroidi l'agarose.
- 6- Préparer le support (scotch + peignes)
- 7- Faire un joint avec une goutte d'agarose.
- 8- Couler sans faire de bulle.
- 9- Laisser durcir
- 10- Retirer les peignes et le scotch.
- 11- Immerger le gel dans la cuve contenant du TAE 1X.

Dépôts :

- 12- Sur un Parafilm déposer n gouttes ($n \times 2 \mu$ l) de tampon de dépôt 6X.
- 13- Déposer dans le premier puits du gel en haut à gauche, 10 μ l de marqueur de taille 2.
- 14- Déposer 10 μ l de chaque échantillon dans une goutte de tampon de dépôt, mélanger par aspiration/refoulement et déposer dans les puits du gel.
- 15- Les échantillons sont déposer à la suite les uns des autres en changeant de cône entre chaque échantillon.
- 17- Mettre sous tension : environ 100 Volts. (migration du - vers le +).

PROTOCOLE DE PCR 2 ET DILUTIONS

- 1- Après PCR 1 et gel d'agarose les échantillons trouvés très positifs doivent être dilués.
- 2- Les dilutions peuvent varier selon l'intensité du signal, en général la dilution est au 1/50^{ème} en eau distillée.
- 3- Dilution : 49 μ l d'eau distillée + 1 μ l d'échantillon PCR1, vortexer, centrifuger.
- 4- Préparer les tubes de PCR 2 marqués "prime" et les tubes de dilution marqués "seconde" dans la *pièce réactifs* avec les même précautions que pour la PCR 1.
- 5- Préparer le Mix de PCR 2 comme le mix de PCR 1 en remplaçant les amorces 3 et 4 par les amorces 5 et 6.
- 6- Mettre de l'huile (50 μ l par tube).
- 7- Lancer le programme du thermocycleur Cyclone.
- 8- Gel d'électrophorèse.

ENREGISTREMENT DES IMAGES

Déposer le gel sans le support sur la table U.V.

Allumer l'écran de la caméra et de l'ordinateur.

Sélectionner l'option 1 sur l'écran de l'ordinateur.

Cliquer deux fois sur **GEL** (appareil photo).

SAISIE - VISU DE LA CAMERA

Régler la caméra et la mise au point

INTEGRATION

TEMPS D'INTEGRATION (entre 1000 et 2000) ENTER

NOMBRE DE SAISIE (0)

Allumer le banc U.V. **ENTER**

Esc quand l'image est OK

Eteindre le banc optique.

NETTOYER L'IMAGE - Non

OUTIL- Texte sur image - (herpès PCR - date)

Positionner la légende avec la souris **ENTER**

IMAGE- SAUVER- FORMAT Tif- écrire le nom du fichier

FIN -Confirmation -Oui

Retirer le gel de la table U.V. et nettoyer la table avec de l'eau distillée et un papier absorbant.

Soit le récupérer pour recyclage si il s'agit de la première utilisation, soit le jeter dans la caisse prévue à cet effet car le gel contient du Bromure d'Ethidium (produit MUTAGENE).

PREPARATION DES REACTIFS

Aqua Phénol pH 8- Appligène

Conserver les flacons à -20°C avant ouverture.

Au moment de la préparation :

- Laisser décongeler de flacon de phénol et le flacon de pH 8
- Dans un tube de 50 ml, mettre 45 ml d'eau distillée et ajouter 5 ml de solution pH8
- Ajouter ces 50 ml à la bouteille de phénol
- Ajouter de l'hydroxyquinoléine à 0.1 %
- Mélanger très vigoureusement
- Laisser décanter au moins 15 minutes
- Le phénol pH 8 est alors prêt à l'emploi et est stocké à +4°C
- C'est la phase inférieure qui est utilisée.

ATTENTION TOXIQUE : A PREPARER ET A UTILISER SOUS LA HOTTE EN PORTANT DES GANTS.

Chloroforme/alcool isoamylique

- Chloroforme 24 volumes
- Alcool isoamylique 1 volume

- Mélanger

ATTENTION TOXIQUE : A PREPARER ET A UTILISER SOUS LA HOTTE EN PORTANT DES GANTS.

PREPARATION DES REACTIFS

Nucléotides (dNTPs mix)

Solution stock : Eurogentech
Concentration : 20 mM (5 mM de chaque dNTP)
Conserver à -20°C

Préparation : Décongeler la solution stock sur glace
Aliquoter en tubes Eppendorf de 1.5ml en fraction de 100µl
Congeler les aliquots à -20°C

Reconstitution : Diluer 1 aliquot en ajoutant 900 µl d'eau distillée, la concentration est alors de 2 mM.
Faire des aliquots de cette dilution, au moins deux tubes de 500 µl ou 5 tubes de 200 µl.

Conserver à -20°C.

PREPARATION DES REACTIFS

Amorces

Séquences :

Amorce 3 - 5' GCCAACCGTTGGAACCATAACAAGCG 3'

Amorce 4 - 5' GCGAATGAGGTGAACGAAACTATAGACC 3'

Amorce 5 - 5' CGCCCCAACCACGATTTTTTCACTGACCC 3'

Amorce 6 - 5' CCCGTCTAGATATAGGATGAGATTTG 3'

Préparation :

Solution stock : A la réception, reprendre dans de l'eau de façon à avoir une concentration de $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (1 DO = $33\mu\text{g}$)

Aliquoter en tubes Eppendorf de 1.5 ml en fraction de $10\mu\text{l}$

Au moment de l'emploi diluer au 1/100 ($100\text{ ng}/\mu\text{l}$) en ajoutant $900\mu\text{l}$ d'eau distillée.

Aliquoter ces dilution en fraction de $100\mu\text{l}$.

Conserver à -20°C

PREPARATION DES REACTIFS

Tampon de dépôt 6 X

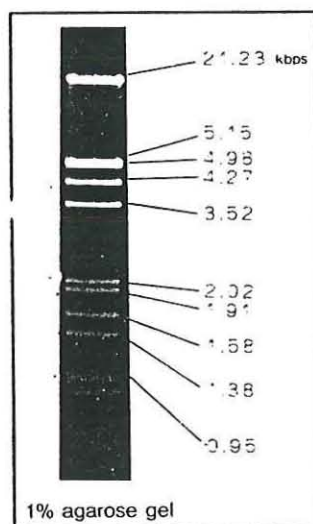
Bleu de bromophénol	0.25%
Xylène cyanol	0.25%
Sucrose poids/volume en eau	40%

Conserver la solution stock aliquotée à -20°C. L'aliquot en cours est conservé à 4°C.

PREPARATION DES SOLUTIONS

Marqueur de taille

Solution stock : Eurogentech Marker 2 Référence M W 002 10
Concentration : 500 $\mu\text{g/ml}$
Conserver à -20°C



Préparation :

Solution stock (500 $\mu\text{g/ml}$)	40 μl
TE 1X	160 μl
Tampon dépôt 6X	40 μl

	240 μl à 83.3 $\mu\text{g/ml}$

Conserver à 4°C .

PREPARATION DES REACTIFS

TE 1 X

Solutions stock

10 mM Tris pH 8
1 mM EDTA pH 8

Pour 100 ml

1 ml Tris pH 8
20 μ l EDTA 0.5 M
98.8 ml H₂O distillée

TAE 1X

Solutions stock 50 X

Pour 1 litre : 242 g de Tris base
57.1 ml acide acétique glacial
100 ml EDTA 0.5M
H₂O qsp 1 litre

TAE 1X

0.04 M Tris-acétate
0.001M EDTA

PREPARATION DES REACTIFS

Acétate de sodium 3M

Préparation :	Acétate de sodium 3H ₂ O	408.1g
	H ₂ O distillée	qsp 1 litre

NaCl 5M

Préparation :	NaCl	292.2g
	H ₂ O distillée	qsp 1 litre

SDS 10%

Préparation :	Electrophoresis-grade SDS	100g
	H ₂ O distillée	qsp 1 litre

Chauffer à 68°C pour dissoudre.

Tris 1M

Préparation :	Tris base	121.1g
	H ₂ O distillée	qsp 1 litre

Ajuster le pH à 8 avec de l'HCL concentré.

EDTA 0.5M

Préparation :	EDTA	186.1g
	H ₂ O	qsp 1 litre

Ajuster le pH à 8 avec du NaOH.

Protéinase k :

Préparation :	20 mg/ml dans de l'eau distillée.
----------------------	-----------------------------------

consommables	fournisseur	N° contrat ou remise	référence	quantité	prix (FHT) remise déduite
gants	CML	remise selon articles	GLP (taille 6/7) GLM (taille 7/8)	100	38,00
lames de rasoir	Janing		1-20087	100	138,00
boîtes de Pétri	CML	remise selon articles	BPS90GE	100	50,50
pipettes Pasteur	CML	remise selon article	PP230S	250	23,03
pistons Pellet avec microtubes	Polylabo	-20% après accord avec M. Germano	06163	100	367,20
cônes à filtre 20µl sur rack type Filtertip	Polylabo	-20% après accord avec M. Germano	66771	960	504,00
cônes à filtre 200µl sur rack type Filtertip	Polylabo	-20% après accord avec M. Germano	66755	960	504,00
cônes à filtre 1ml sur rack	Polylabo	-20% après accord avec M. Germano	66763	960	456,00
microtubes 1,5ml	CML	remise selon articles	CCE	1000	40,00
microtubes 0,5ml pour PCR Treff	Polylabo	2%	52803	1000	406,70
Tris base Trizma	Sigma		T8524	500g	377,00
EDTA	Sigma		E5134	500g	349,00
acide acétique glacial	Sigma		A6283	500ml	86,00
bromure d'éthidium	Sigma		E8751	250mg	55,00
xylène cyanoll	Sigma		X4126	10g	248,00
bleu de bromophénol	Sigma		B5525	10g	173,00
saccharose	Sigma		S0389	500g	180,00
huile minérale	Sigma		M5904	500ml	154,00
agarose	Appligene		130022	500g	2400,00
polymérase Goldstar	Eurogentech	offre 5NFE/96 (20%)	ME-066-10 ME-066-50	2x500 Unités 10x500 Unités	1316,00 5640,00
dNTP mix	Eurogentech	offre 5NFE/96 (20%)	NU-0010-10 NU-0010-50	20µmole 5x20µmole	214,40 858,40
marqueur de taille 2 (MT2)	Eurogentech	offre 5NFE/96 (15%)	MW-0020-10 MW-0020-50	80µg 400µg	160,70 642,60
oligonucléotides	Eurogentech	offre 5NFE/96 (20%)	Oligold	pour 4 oligonucléotides (26+26+28+28 bases)x40nmole	1080,00
pilluliers	CML	remise selon articles	TCUC30S	100	74,16

quantité par lot de naissain (30 animaux = 6 pools de 5)	consommables utilisés par lot	quantité par lot de larves (1 pool de 50 mg)
6	pilluliers	1
12	gants	2
6	lame de rasoir	0
6	boîte de Pétri	0
6	pipette Pasteur	1
6	piston Pellet et tube	1
6	cône à filtre 1ml	0
36 à 48	cônes à filtre Filtertip 20 et 200µl	7 ou 9
12 à 18	microtubes pour PCR 0,5ml	2 ou 3
6 à 9 Unités	Taq polymérase	1 ou 1,5 Unités
0,12 à 0,18 µmole	dNTP	0,02 µmole
0,002g	xylène cyanoll	0,002g
0,002g	bleu de bromophénol	0,002g
0,01g	saccharose	0,01g
pour 1 à 5 lots traités simultanément*	consommation supplémentaire	pour 1 à 30 lots traités simultanément*
1g	agarose	1g
8	gants	8
6 à 8	microtubes 1,5ml	6 à 8
22	cônes à filtre Filtertip 20 et 200µl	22
1,6 à 3,2µg	marqueur de taille MT2	1,6 à 3,2µg
2,42g	tris	2,42g
0,571ml	EDTA	0,571ml
0,146g	acide acétique	0,146g

* il faut ajouter éventuellement deux photos Polaroid (8F la photo)

DUREE APPROXIMATIVE DES ANALYSES PAR PCR (minutes)					
ETAPE	temps d'attente pour 1 à 5 lots de naissain* ou pour 1 à 30 lots de larves* traités simultanément	temps réel de manipulation par lot		temps réel de manipulation supplémentaire	
		naissain	larves	naissain : pour 1 à 5 lots traités simultanément	larves : pour 1 à 30 lots traités simultanément
préparation des échantillons	20	70	10		
préparation des réactifs et des tubes de PCR				20	20
distribution des échantillons		5	2		
TOTAL PREMIER JOUR	20	75	12	20	20
première amplification (la nuit)	(200)				
préparation des échantillons, du gel et distribution		10	5	15	15
électrophorèse	30				
analyse du premier gel et préparation des échantillons (dilutions)		5	2	5	5
préparation des réactifs et des tubes de PCR				20	20
distribution des échantillons		15	5		
seconde amplification	200				
préparation des échantillons, du gel et distribution		5	2	15	15
électrophorèse	60				
analyse globale des résultats		5	5		
TOTAL DEUXIEME JOUR	290	40	19	55	55
TOTAL	310	115	30	75	75

* 30 animaux sont traités pour chaque lot de naissain, sous forme de 6 pools de 5 animaux; 50 mg d'animaux sont traités pour chaque lot de larves (un pool).

équipement et petit matériel	quantité	coût approximatif
mixer automatique pour microtubes et pistons Pellet	1	450F
pipetman réglable (Gilson) 1ml	1	1500F
pipetman réglable (Gilson) 200µl	2	2x1500F
pipetman réglable (Gilson) 20µl	2	2x1500F
vortex	1	2000F
centrifugeuse réfrigérée	1	50000F
thermocycleur Crocodile III	1	30000F
générateur de courant	1	2500F
ensemble d'électrophorèse (maxi ou midicuve)	1	3000F
agitateur chauffant ou plaque chauffante	1	
four à microondes	mieux mais pas indispensable	
Polaroïd	mieux mais pas indispensable	30000F
table lumineuse en lumière ultraviolette	1	20000F
équipement de filtration d'eau ultrapure bidistillée	1	
congélateur (-20°C)	2	
réfrigérateur	1	
balance de précision	1	