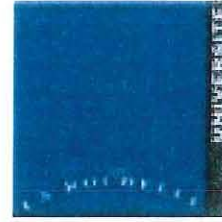


Ifremer

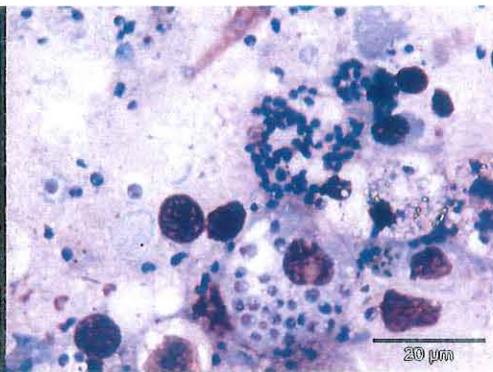
IFREMER, Laboratoire de Génétique et de Pathologie
Avenue du Mus du loup
17390 La Tremblade
TEL. 05.46.76.26.10



Institut Universitaire Technologique Génie Biologique
Option Analyses biologiques et biochimiques
15 rue F. de Vaux de Foletier
17026 La Rochelle Cedex 1
TEL. 05.46.51.39.00

Optimisation de la méthode de quantification de l'infection à Bonamia ostreae chez l'huître plate Ostrea edulis par P.C.R quantitative.

FA82
ES80
Dup.O.



Stage effectué du 16 avril au 23 juin 2007

Tuteur pédagogique : C.BARTHELEMY

DUPIN Clément
2nde Année option ABB

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 03716

Année 2006/2007

Sujet : Optimisation de la méthode de Quantification de l'infection à *Bonamia ostreae* chez l'huître plate *Ostrea edulis* par P.C.R quantitative

Lieu du stage : Laboratoire de Génétique et de Pathologie d'IFREMER, 17390 La Tremblade

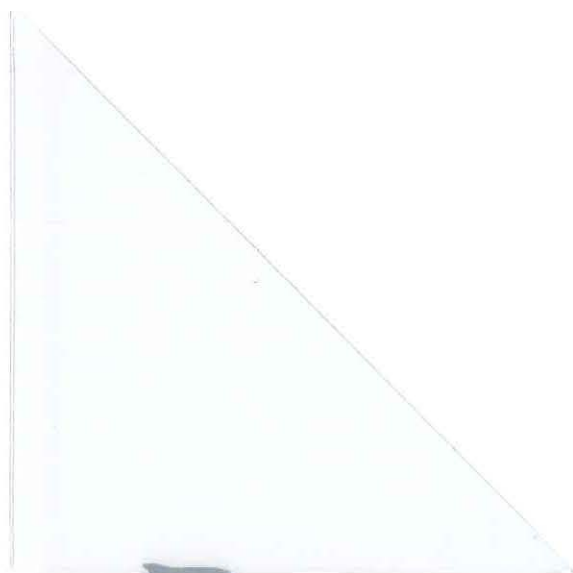
Nom : DUPIN

Prénom : Clément

Dates du stage : Du 16 avril au 22 juin 2007

Maître de stage : Isabelle ARZUL

Tuteur pédagogique : C.BARTHELEMY



Ifremer

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier madame ARZUL Isabelle et Mr RENAULT Tristan pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Je remercie Mlle ROBERT Maeva pour m'avoir encadré durant l'ensemble des manipulations, ainsi que toute l'équipe d'Ifremer pour leur accueil et leur bonne humeur.

Merci à Nicol, Benjamin, Mathilde, Laurence, Sabrina, Stéphanie, Leslie et Jessica pour tous ces moments passés ensemble et votre soutien.

Je tiens à remercier plus particulièrement Christopher et Benjamin pour leur patience et leur gentillesse à mon égard.

Je remercie également l'équipe pédagogique de l'IUT et tout particulièrement Mr Barthelemy, pour m'avoir inculqué les principes de la PCR.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	p 3
Liste des abréviations.....	p 6
Introduction	p 7
I. Présentation de la station d'accueil et d'IFREMER la Tremblade.....	p 8 à 9
II. Etude bibliographique/ Contexte.....	p 10 à 18
1) <u>Ostrea edulis et la production d'huîtres en France.....</u>	<u>p 10 à 12</u>
a. L'ostréiculture en France.....	p 10 à 11
b. Présentation de l'huître plate, Ostrea edulis	p 12
2) <u>La bonamiose due à Bonamia ostreae.....</u>	<u>p 12 à 17</u>
a. Historique et situation actuelle de la maladie	p 12 à 13
b. Description du parasite, Bonamia ostreae, et signes associés.....	p 13 à 14
c. Taxonomie	p 15
d. Mode d'infection de l'huître plate par le parasite.....	p 15 à 16
e. Moyens de lutte	p 16 à 17
f. Outils de diagnostics pour la détection de Bonamia ostreae.....	p 17
3) <u>Contexte du stage</u>	<u>p 18</u>
III. Matériel et méthodes.....	p 19 à 22
I. Matériel biologique utilisé	p 19
II. Extraction d'ADN	p 19
III. Réaction de polymérisation en chaîne (P.C.R)	p19 à 21
a. Principe.....	p19 à 20
b. Réalisation du gel d'agarose à 1% puis de l'électrophorèse.....	p 21
IV. P.C.R Quantitative.....	p 21 à 22
V. Clonage.....	p 22
IV. Résultats et discussion.....	p 23 à 32
I. Extraction d'ADN selon le manuel d'extraction QIamp Qiagen®	p 23
II. Optimisation en PCR-Q.	p24 à 31
a) Extraction d'ADN à partir de témoins négatifs.....	p24
b) Comparaison des prémix Brilliant® et Full Velocity®.....	p 24
c) Comparaison des résultats obtenus avec le prémix Brilliant® à une température d'hybridation des amorces de 55°C puis 60°C.....	p 25
d) Réalisation d'une gamme de concentration croisée en amorces :.....	p 25 à 26
e) Test de nouvelles amorces en PCR classiques	p 26 à 28
f) TestPCR-Q avec référence dye	p28 à 29

- g) Tests en PCR-Q des amorces Inma, Isa 1, Isa 2.....p29 à 30
- h) Test de sensibilité des amorces Isa 2 et Inma..... p 30
- i) Réalisation d'une gamme croisée de concentrations en amorces avec le couple Isa 2 (Bostact 1F, Bostact test R2)..... p 31
- III. Mise au point des courbes étalons..... p31

Conclusion..... p 32 à 33

Bibliographie..... p 34 à 37

Sommaire des annexes p 38

Annexes p 39 à 45

LISTE DES ABREVIATIONS

PCR : Polymerase Chain Reaction.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

TA : température ambiante

S : Seconde

T°C : Température en degré Celsius

Rpm : Rotation par minute

PCR-Q : P.C.R quantitative

T_m : Température d'hybridation des amorces.

Ct : Nombre de cycles auquel un produit d'amplification peut-être détecté.

Threshold : Seuil de détection des produits d'amplification.

NTC : témoin négatif en PCR-Q composé d'eau à la place d'une quantité en ADN.

bp : Paire de bases.

INTRODUCTION

L'ostréiculture représente une part économique importante avec une production d'environ 117 106 tonnes de coquillages par an (FAO, 2003). Cependant le développement de cette activité peut être limité par des mortalités, parfois massives, dues à des maladies infectieuses.

L'huître plate, *Ostrea edulis*, a subi deux maladies majeures : la marteiliose due à *Marteilia refringens* et la bonamiose due à *Bonamia ostreae*. Ces deux maladies à déclaration obligatoire ont fait chuter la production annuelle de 20 000 tonnes dans les années 70 à moins de 1 800 tonnes aujourd'hui.

Suite à ces mortalités, différents programmes de recherche ont été lancés par IFREMER pour tenter de préserver voire relancer la culture de l'huître plate.

Un de ces programmes concerne la bonamiose, maladie due au protiste *Bonamia ostreae*. Le diagnostic de la maladie repose essentiellement sur deux techniques : la cytologie par apposition de tissu cardiaque ou de branchies ainsi que l'histologie (Bachère, 1982 ; O'Neill et al., 1998).

Cependant la sensibilité de ces techniques reste relativement faible et peut contribuer à sous diagnostiquer les cas de préinfection ou d'infection peu intense. Des outils de biologie moléculaire tels que l'hybridation *in situ* (Cochennec et al. 2000 ; Carnegie et al. 2003) ou la PCR (Cochennec et al. 2000 ; Carnegie et al. 2000) ont été développés afin d'améliorer la spécificité et la sensibilité du diagnostic de la bonamiose.

Dans ce contexte, notre étude consistait à mettre au point une technique de PCR quantitative et à l'optimiser afin de pouvoir mesurer les degrés d'infection des huîtres par le parasite *Bonamia ostreae* et à terme modéliser la dispersion de la maladie au sein des stocks d'élevage. Le développement d'une telle technique nécessite l'établissement au préalable d'une courbe standard grâce à des échantillons contaminés par *Bonamia ostreae* dont la concentration est connue.

PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL.

L'IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, résulte de la fusion du Centre National d'Exploitation pour les Océans et de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes.

La présence de l'IFREMER sur l'ensemble du littoral constitue une des originalités et une des forces de l'institut. Elle permet à la fois d'assurer l'observation et la surveillance de l'environnement côtier et de rester proche du monde maritime et des professionnels de la mer.

L'IFREMER est présent dans 78 laboratoires ou services de recherche répartis sur 24 sites sur le littoral métropolitain ou dans les DOM TOM (voir figure 1).

L'IFREMER a pour mission d'évaluer, de prévoir l'évolution des ressources des océans, de protéger le littoral marin et côtier, de favoriser le développement socio-économique du monde maritime.



Figure 1 : Répartition d'Ifremer en France et dans le monde

LA STATION DE LA TREMBLADE.

Dépendant du centre de Nantes, située au cœur du bassin ostréicole de Marennes-Oléron, la station **IFREMER** de La Tremblade abrite deux laboratoires, celui de l'Environnement Ressources des Pertuis Charentais qui assure la gestion des différents réseaux de surveillance et le Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP).

Le stage a été effectué au sein du **Laboratoire Génétique et Pathologie (LGP)** à La Tremblade (17).

Les principaux objectifs du laboratoire, visent à développer des recherches chez les mollusques bivalves marins dans les domaines de :

la pathologie :

Surveillance des ressources conchylicoles, l'identification des agents pathogènes, la description de leur cycle de développement, la mise au point des techniques de reproduction expérimentale des maladies, le développement d'outils performants de diagnostic utilisables à des fins de recherche ou de contrôle, l'étude de l'impact de ces maladies et de leur évolution géographique et temporelle.

la génétique :

Etude des ressources génétiques, test de nouvelles espèces de mollusques, de nouvelles populations et d'hybrides pour limiter les risques liés à la monoculture. Obtention de souches résistantes ou tolérantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent en cause les productions.

Création de souches ou de lignées présentant de meilleures performances de croissance, de qualité de chair, une meilleure adaptation aux conditions de milieu d'élevage ou éventuellement de faibles besoins métaboliques, pour améliorer la productivité des entreprises.

En tant que laboratoire thématique, le **LGP** anime les programmes de recherche en génétique et pathologie ainsi que le réseau de surveillance en pathologie des mollusques (**REPAMO**).

En pathologie, le **LGP** est également **Laboratoire Communautaire de Référence (LCR)** pour l'Union Européenne pour l'étude des maladies des mollusques et **laboratoire de référence** pour l'**OIE** (*Office International des Epizooties*) pour la bonamiose et la marteillose.

I. Etude bibliographique- Contexte

1) Ostrea edulis et la production d'huîtres en France

a) L'ostréiculture en France

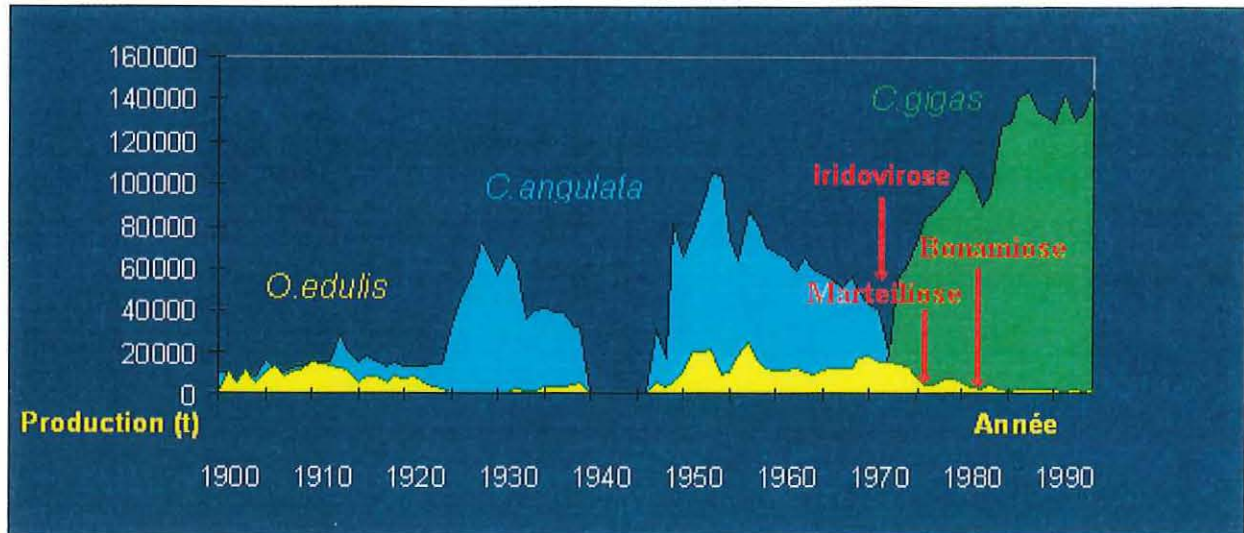


Figure 2 : Production d'huîtres en tonnes au cours du 20^{ème} siècle

L'huître plate, *Ostrea edulis* est l'huître indigène des côtes européennes. Sa consommation remonte à l'époque des romains. Du Moyen Age au 16^{ème} siècle, les bancs naturels sont intensément exploités. Face à cette exploitation intense, les premiers arrêtés, visant à limiter les récoltes pendant les périodes de reproduction sont promulgués dès 1750 (Héral, 1989). Les premiers essais de culture d'huîtres plates se mettent alors en place. L'ostréiculture moderne est véritablement née à partir du milieu du 19^{ème} siècle grâce à la possibilité de capter le naissain (jeunes huîtres) par l'utilisation de collecteurs en bois. C'est aussi à cette période que l'Etat prend en charge la gestion des côtes et établit des règles visant à mieux gérer cette activité. Malgré ces mesures et la possibilité de capter le naissain, la production d'huîtres plates reste insuffisante par rapport à la demande. Ainsi en 1857, le gouvernement autorise l'importation d'huîtres creuses *Crassostrea angulata* en provenance du Portugal (Marteil, 1960).

Dès 1860 ces huîtres étaient importées depuis le Portugal vers le bassin d'Arcachon. Au cours d'un de ces transports, le bateau "Le Morlaisien" fut obligé, en pleine tempête, de jeter sa cargaison dans l'estuaire de la Gironde, et c'est ainsi que cette espèce se répandit largement sur nos côtes grâce à un pouvoir de filtration cinq fois supérieur à celui de l'huître plate.

En France, deux maladies virales (virus apparenté aux *Iridoviridae*) ont totalement décimé les populations d'huîtres creuses portugaises entre 1966 et 1971 (Figure 2) (Comps et Duthoit, 1976). Pour pallier à cette disparition, l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*, qui présente une absence de sensibilité à l'iridovirus, a été importée en France et a permis par son élevage la relance de l'économie ostréicole. C'est ainsi que le cheptel d'huîtres portugaises touché par de sévères pertes fût remplacé progressivement par l'introduction de cette nouvelle

espèce (Grizel et Héral, 1991). C'est à l'heure actuelle l'espèce d'huître majoritairement produite en France avec 140 000 tonnes par an (FAO, 2003).

Au milieu du 20^{ème} siècle la production de l'huître plate avoisinait les 20 000 tonnes mais deux maladies, la marteliose et la bonamiose ont induit une forte diminution de sa production qui est estimée à moins de 1 800 tonnes aujourd'hui (Figure 2).

A l'heure actuelle, l'huître plate est en majorité produite en Bretagne et dans une bien moindre mesure en Méditerranée (exemple: Sète, Leucate). La principale zone de captage d'*Ostreae edulis* se situe dans la baie de Quiberon (Morbihan), une petite partie du naissain provient également de la rade de Brest (Finistère) (Figure 3). Les zones de grossissement se situent principalement à Cancale (Côtes d'Armor) et également en baie de Quiberon (Figure 3). 50% des huîtres plates française sont commercialisés depuis Belon (Girard *et al*, 2005). Son âge de commercialisation est d'environ 3 ans.

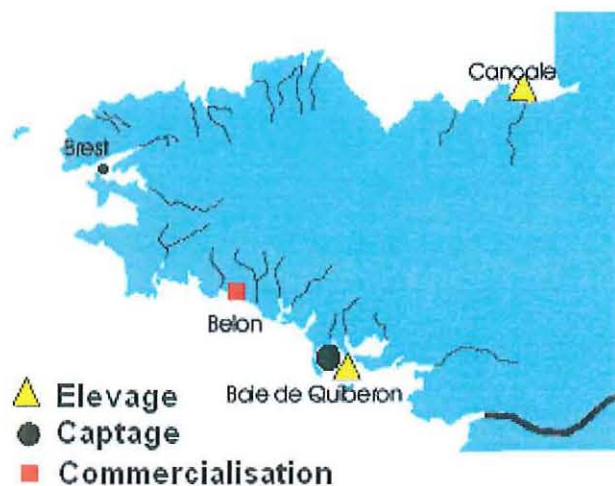


Figure 3 : Localisations des points stratégiques pour la production d'huîtres plates en France

b) Présentation de l'huître plate, *Ostrea edulis*

Le genre *Ostrea* se décline en 43 espèces présentes dans les eaux chaudes et tempérées de tous les océans.

Ostrea edulis (figure 4a et b) se répartit de la Norvège jusqu'à la mer méditerranée, l'Adriatique et la Mer Noire. Elle a été également introduite aux États-Unis pour des raisons commerciales.

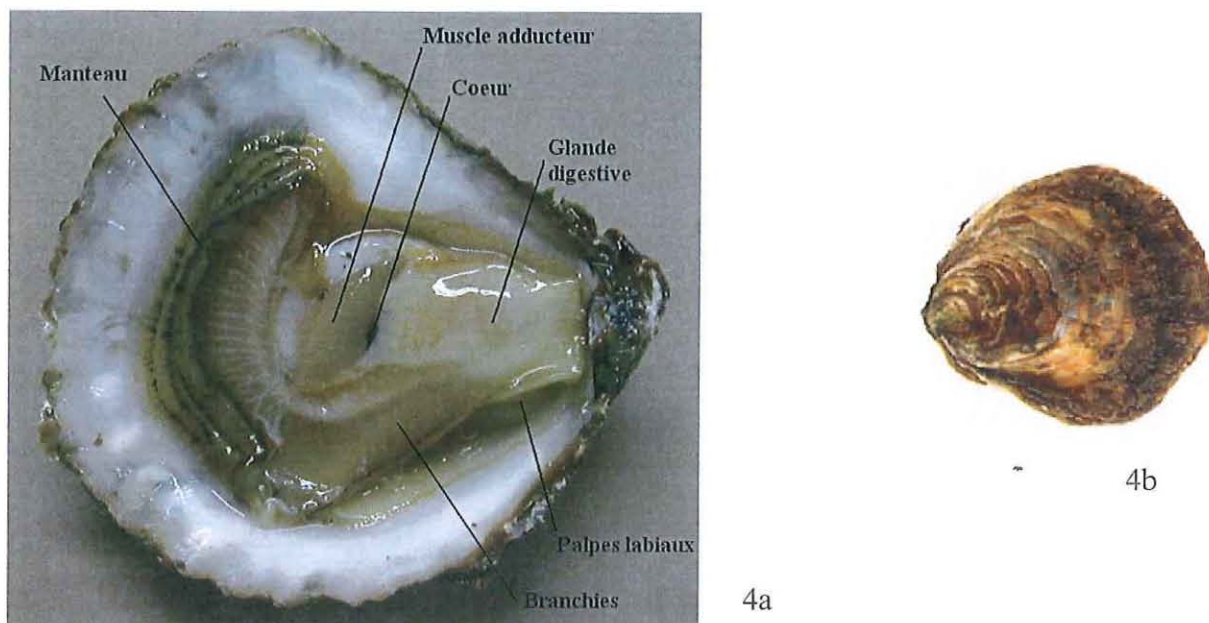


Figure 4 : *Ostrea edulis* en coupe (4a) et fermée (4b)

La coquille d'*Ostrea edulis* adulte est ronde, présentant deux valves inégales. Comme chez l'huître creuse, la coquille présente une structure feuilletée crayeuse. La valve gauche ou inférieure est plus concave et contient la chair de l'huître. Celle-ci vit accrochée par la valve inférieure à un substrat dur. C'est une espèce hermaphrodite, larvipare, c'est-à-dire que la fécondation des ovules par les spermatozoïdes s'effectue dans la cavité palléale où les œufs sont incubés pendant 6 à 8 jours. La durée de la phase planctonique des larves est fonction de la température de 5 jours dans les eaux à 26°C jusqu'à 14 jours à 17°C. L'huître plate se nourrit par absorption de substances organiques dissoutes dans l'eau de mer par filtration ou ingestion des particules en suspension.

2) La bonamiose due à *Bonamia ostreae*

Deux maladies ont affecté la production française d'huîtres plates au cours des années 1970 : la marteiliose et la bonamiose.

La marteiliose due à *Marteilia refringens* et la bonamiose due à *Bonamia ostreae* sont deux maladies à déclaration obligatoire en raison de l'impact économique considérable que ces maladies ont sur la production d'huître plate (Code Aquatique de L'Office International des Epizooties (OIE), Directive européenne 91/67/EEC).

Les travaux réalisés au cours de ce stage ont porté sur le parasite *Bonamia ostreae*, nous allons donc à présent décrire ce parasite ainsi que la maladie qu'il induit chez l'huître plate.

a) Historique et situation actuelle de la maladie

En 1979, suite à des mortalités massives dans des parcs d'élevages d'huîtres plates en Bretagne un parasite a été mis en évidence dans les hémocytes, cellules de l'hémolymphe des huîtres atteintes (Pichot *et al.* 1979 ; Comps *et al.*, 1980). Ce parasite appartient au groupe des microcells.

Le terme de microcells (Farley *et al.*, 1988) s'applique à des organismes non-sporulants, de petite taille (de l'ordre de quelques μm), habituellement ronds et possédant un noyau circulaire ou excentré. Ce groupe est composé d'organismes très pathogènes qui induisent de fortes mortalités chez leurs hôtes respectifs.

Actuellement en France, *Bonamia ostreae* est considéré présent tout le long des côtes Française à l'exception de la Côte Nord, depuis la rive droite de la Seine à la frontière Belge, (Figure 5).

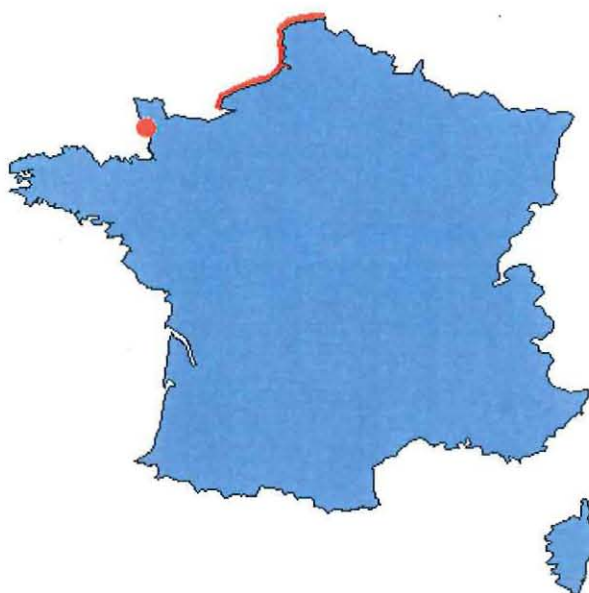


Figure 5 : Zones française indemnes de bonamiose (—)

b) Description du parasite, *Bonamia ostreae*, et signes associés

L'examen des mollusques atteints de bonamiose montre dans la majorité des cas une glande digestive normalement pigmentée et souvent la présence de produits de réserve. Toutefois, des observations plus poussées révèlent chez certaines huîtres une couleur légèrement grisâtre et une odeur nauséabonde caractéristique d'une phase pré-mortem.

Par ailleurs, des lésions branchiales peuvent être notées sur un ou plusieurs feuillets branchiaux. Si la présence de ces lésions est très souvent liée à celle du parasite, la maladie peut affecter une huître sans pour autant engendrer ces signes cliniques. Il y a une relation entre l'évolution de la maladie et celles des atteintes branchiales, les lésions étant plus importantes chez les huîtres fortement infectées. Les lésions branchiales peuvent se présenter sous forme de perforations plus ou moins grandes, situées dans le milieu du filament branchial

ou à sa base, et d'indentations localisées au niveau de la bordure des branchies (Tige *et al.*, 1980) (Figure 6).



Figure 6 : Indentation d'un feuillet branchial due à *Bonamia ostreae* chez *Ostrea edulis*

Le nombre de ces signes macroscopiques est variable et croît généralement avec l'intensité de la maladie. Le stade ultime de leur évolution est l'érosion très prononcée des feuillets branchiaux, entraînant dans ce cas une maigreur de l'hôte. Ces différentes lésions sont entourées d'un liseré jaunâtre caractéristique.

Le parasite infecte les hémocytes, cellules du système de défense de l'huître (Comps, 1983). Il se présente comme de petites cellules de 2 à 3 μm de diamètre au niveau du cytoplasme de l'hémocyte atteint (Figure 7). Lors d'infections avancées le parasite peut être observé en position extracellulaire. De plus, l'infection est souvent associée à une accumulation d'hémocytes au niveau des tissus atteints.

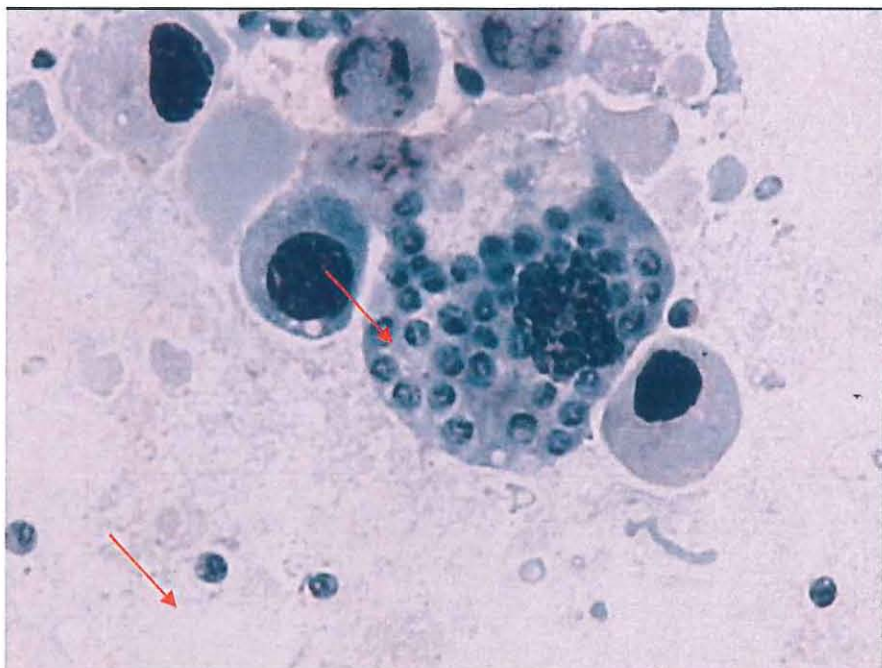


Figure 7 : Apposition cardiaque d'huître plate : présence de *Bonamia ostreae* dans un hémocyte et en position extracellulaire (→)

c) Taxonomie

Les organismes du groupe des microcells, auquel appartient *Bonamia ostreae*, ne peuvent se distinguer par les lésions qu'ils induisent, ni par leur hôte ou leur aire géographique. La taxonomie de ces microorganismes repose donc sur des études ultra-structurales mais aussi de plus en plus sur l'analyse et la comparaison de séquences de gènes d'intérêt phylogénétique (exemple: gène codant pour l'ARN 18S).

Des travaux récents ont permis la caractérisation d'autres gènes d'intérêt phylogénétique dont le gène de l'actine I qui a été retenu dans cette étude pour le développement de la PCR quantitative. (Lopez-Flores et al., accepté à parasitology)

Les parasites du genre *Bonamia* partagent certaines caractéristiques ultra-structurales avec les parasites du genre *Haplosporidium*, en particulier la présence de corps denses appelés haplosporosomes. Cependant, l'absence de spores, habituellement décrites pour les haplosporidies, peut remettre en question la position taxonomique de *Bonamia spp.* au sein des haplosporidies. L'étude de la séquence du gène de l'ARN 18S a permis de montrer une forte similarité entre les parasites du genre *Bonamia* et d'autres parasites tels que *Haplosporidium nelsoni* ou *H. costale*, corroborant ainsi l'hypothèse de l'appartenance des *Bonamia spp.* aux haplosporidies (Cochennec et al., 2000 ; Carnegie et al., 2000 ; Cochennec et al., 2003 ; Hine et al., 2001 ; Reece et al., 2004).

Donc, à l'intérieur du groupe des haplosporidies, se trouvent entre autres, les parasites du genre *Bonamia*, dont *Bonamia ostreae*.

d) Mode d'infection de l'huître plate par le parasite

Le cycle parasitaire de *Bonamia ostreae* n'est pas complètement connu. Le parasite s'introduirait dans l'huître lorsque celle-ci filtre l'eau de mer pour se nourrir. Il prendrait alors pour cibles les hémocytes qui sont les cellules du système de défense. Il adhère aux hémocytes et se fait phagocyter par eux, par invagination de leur membrane plasmique. Il se trouve à l'intérieur de l'hémocyte dans une vacuole ressemblant à un phagosome.

Il semble capable de survivre et de se multiplier à l'intérieur de ces cellules en évitant les mécanismes post-phagocytaires de défense des hémocytes (enzymes lysosomiales, enzymes protéolytiques, oxydants toxiques...). Il induit par la suite les lésions citées précédemment (I-2-b).

Une étude en microscopie électronique réalisée par Montes et al., (1994) a permis de décrire la présence de *Bonamia ostreae* dans des cellules épithéliales de branchie. La présence du parasite à ce niveau suggérerait qu'il soit libéré dans le milieu par les cellules épithéliales. L'hypothèse que le site d'entrée du parasite puisse être aussi les branchies ne peut toutefois être exclue. En effet, les branchies sont continuellement en contact avec l'eau de mer qui peut contenir des parasites. En outre, elles ne possèdent qu'une mince couche protectrice de cellules à mucus séparant le milieu environnant du système circulatoire (hémocytes). D'autre part, les lésions histologiques, caractérisées par des réactions inflammatoires localisées, confirmeraient cette dernière hypothèse. On ne peut omettre l'élimination de parasites dans les fécès puisque des lésions au niveau de l'épithélium stomacal ont été rapportées (Comps,

1983). Enfin, il est probable qu'un grand nombre de parasites soit libérés peu après la mort de l'huître à la suite de la dégradation des tissus par la lyse cellulaire. Malgré ces études, le cycle complet de *B. ostreae* reste aujourd'hui inconnu avec cependant une constante : aucune spore n'a jamais été décrite. La possibilité pour le parasite de se transmettre à des huîtres saines par simple contact (cohabitation) avec des huîtres infectées a été démontrée expérimentalement, prouvant la non nécessité d'un hôte intermédiaire.

e) Moyens de lutte

Pour préserver les cheptels et réduire à leur plus bas niveau possible les risques d'introduction et de propagation d'agents pathogènes, les moyens de lutte sont en général basés sur la prophylaxie médicale, le contrôle zoosanitaire et l'amélioration zootechnique et génétique.

- La prophylaxie médicale :

L'absence de réponse immunitaire "spécifique" chez les coquillages rend la vaccination, au sens conventionnel du terme, impossible. Les huîtres ne possèdent pas de lymphocytes, cellules directement impliquées chez les vertébrés dans les réponses vis-à-vis d'un agent pathogène pouvant être stimulées au moyen de la vaccination.

D'autre part, les traitements médicaux, ne peuvent déboucher sur des applications pratiques, soit en raison de leur inefficacité, soit en raison de leur difficulté d'application car les huîtres sont élevées dans un milieu ouvert (Grizel, 1985). Ce type d'approche ne semble donc pas une voie à privilégier.

- Le contrôle zoosanitaire :

Outre un arsenal législatif (OIE, Directives européennes et législation nationale), le contrôle zoosanitaire repose sur la fiabilité des techniques de diagnostic pour détecter précocement la maladie et limiter les transferts d'huîtres infectées et contrôler ainsi la dissémination de la maladie. Les textes nationaux imposent un contrôle zoosanitaire du cheptel conchylicole français. Ce contrôle vise en particulier à déterminer le statut de la production vis-à-vis des agents pathogènes à déclaration obligatoire que sont *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*.

- L'amélioration zootechnique et génétique :

Elle a permis, suite aux plans de relance successifs, d'améliorer les techniques d'élevage afin de limiter l'impact de la bonamiose.

L'IFREMER, à partir de 1985, a adopté une démarche de sélection pour la résistance à *Bonamia ostreae*.

Le programme de sélection, tel qu'il est défini aujourd'hui, vise à sélectionner des animaux résistants à la bonamiose mais s'attache aussi à améliorer les performances de croissance pour essayer "de prendre de vitesse" le développement de la maladie. En effet, les conséquences économiques de la maladie peuvent être surmontées de deux manières: soit en améliorant la survie au cours des deuxième et troisième années d'élevage, soit en obtenant des huîtres de taille commerciale plus rapidement.

f) Outils diagnostiques pour la détection de *Bonamia ostreae*

Les mesures de contrôle reposent sur la détection et l'identification de *Bonamia ostreae*, et, par conséquent sur la sensibilité et la spécificité des techniques de diagnostic.

Histologie et cytologie :

Le diagnostic de la bonamiose repose essentiellement sur l'histologie, la maladie se caractérisant par la présence de petites cellules (2-3 μm) à l'intérieur des hémocytes ou libres dans les tissus conjonctifs, en particulier ceux de la glande digestive et des filaments branchiaux. L'histologie présente l'avantage de considérer l'animal dans son ensemble; cependant cette technique est relativement lourde, peu sensible et nécessite du personnel compétent pour les lectures.

La technique d'histologie a été simplifiée peu à peu par la cytologie par apposition de tissu cardiaque (Bachère *et al.*, 1982, Zabaleta et Barber, 1996, O'Neill *et al.*, 1998) ou de branchies. Cette technique n'a pas permis d'améliorer la sensibilité, mais la relative simplicité de mise en œuvre a réduit considérablement le délai de réponse. Aujourd'hui, cette technique est essentiellement utilisée dans le cadre de suivis d'épidémiologie-surveillance de sites déjà contaminés par le parasite.

Histologie et cytologie sont toujours retenues par l'Office International des Epizooties (Manuel de diagnostic pour les maladies des animaux aquatiques, OIE, 2003) comme techniques de référence pour le diagnostic de la bonamiose.

PCR :

Des outils moléculaires à la fois plus sensibles et plus spécifiques ont été développés pour la détection et l'identification de *Bonamia ostreae* tels que l'hybridation *in situ* et la PCR.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Kary Mullis et qui permet d'amplifier *in vitro* une partie spécifique d'un acide nucléique donné (ADN ou ARN) afin d'en obtenir une quantité assez importante pour être détectée.

Deux amorces (sens et anti-sens) spécifiques s'hybrident sur l'acide nucléique cible en présence d'un excès de désoxynucléotides et de Taq polymérase (ADN polymérase stable à haute température). La technique de PCR est une technique rapide à mettre en œuvre, sensible et spécifique. Elle est un outil intéressant dans le cadre d'un diagnostic présomptif ou pour établir le statut d'une zone vis-à-vis d'un agent pathogène (indemne ou non indemne).

CONTEXTE

Comme nous l'avons déjà évoqué, le diagnostic de la bonamiose repose encore essentiellement sur la cytologie et l'histologie. De plus en plus de laboratoires utilisent cependant également la PCR « classiques » mais cette dernière technique ne permet pas de quantifier le parasite dans les échantillons testés.

La PCR quantitative est un outil de diagnostic intéressant. En effet, elle présente une sensibilité généralement plus élevée que la PCR simple et comme son nom l'indique, elle permet de quantifier la cible recherchée, en l'occurrence le parasite *Bonamia ostreae*.

Dans ce contexte, notre étude a porté sur le développement et la mise au point de la méthode de PCR quantitative sur une portion du gène de l'actine I de *Bonamia ostreae* récemment caractérisé par Lopez-Flores et al. (Accepté à *Parasitology*). Pour mener à bien cette étude, il a été nécessaire dans un premier temps de dessiner des amorces spécifiques du gène retenu et de constituer une « banque » d'échantillons négatifs et positifs. La préparation de ces échantillons a nécessité l'extraction d'ADN du parasite à partir de branchies d'huîtres plates contaminées (témoin +) et non contaminées (témoins -) conservées en éthanol et vérifiées par apposition.

Après avoir sélectionné le couple d'amorces le plus efficace en PCR « classiques », les conditions de PCR quantitative (concentration des différents réactifs ; programme d'amplification dont température d'hybridation) ont pu être déterminées en fonction des résultats obtenus pour les échantillons testés.

Enfin, une courbe standard a été préparée à partir de quantités connues de copies de gène codant l'Actine I de *Bonamia ostreae*, ces copies de gène ayant été obtenues par clonage.

MATERIELS ET METHODES

I) Matériel biologique utilisé :

Les échantillons positifs (témoins positifs) et négatifs (témoins négatifs) sont des morceaux de branchies prélevés et conservés en éthanol provenant d'individu adulte *Ostrea edulis*. Ce matériel à disposition, numéroté et daté était conservé au réfrigérateur à 4°C.

II) Extraction d'ADN :

L'ADN d'*Ostrea edulis* de nos échantillons positifs et négatifs a été extrait selon le protocole décrit dans le manuel d'extraction des kits QIamp de QIAGEN® à partir d'un fragment de tissu d'environ 25mg (Voir annexe 1).

III) Réaction de polymérisation en chaîne (P.C.R)

La PCR est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier le nombre de copie d'une séquence ciblée de l'ADN (amplicon). Cette technique est basée sur la capacité d'hybridation et de déshybridation de l'ADN en fonction de la température et de synthèse enzymatique d'une ADN polymérase ADN dépendante thermostable, la Taq polymérase (annexe 2). Tout ceci se réalise à l'aide d'amorces spécifiques du gène de *Bonamia ostreae* codant pour l'actine I dans un thermocycleur. Le thermocycleur est un appareil permettant de changer de cycles de montées et descentes en température.

a) Conditions de PCR classique utilisées :

PCR standard amorces Inma spécifiques actine 1/grand fragment :

F1 spécifique 5' AACTGGGATGACATGGA 3'

R1 spécifique 5' GGACCAGATTCATCATACTC 3'

Produits attendus : 869 bp

Couple nommé : Inma spé

Composition du Mix réactionnel (volume final de 49µL+ 1µL = 50 µL):

H2O : 37,7 µL

Buffer : 5 µL

dNTP (2 µM) : 5 µL

F1 (100 µM) : 0,5 µL

R1 (100 µM) : 0,5 µL

Taq polymérase (biolabs®) : 0,3 µL

+ Échantillon : 1 µL

Ensuite, le cycle de PCR réalisé est le suivant :

Dénaturation initiale à 95°C	pendant 1min	} durant 40 cycles
Dénaturation à 95°C	pendant 1min	
Hybridation des amorces à 50°C	pendant 1min	
Elongation à 72°C	pendant 1min	
Elongation finale à 72°C	pendant 10min	

PCR Inma amorces spécifiques actine 1/ petit fragment

Amorce BostAct 1F : 5'GCTTCGACCGAAAGTTCCG 3'
 Amorce BostAct 1R : 5'TTCAGACTGCACGCGGATATC 3'

Couple nommé : Inma
 Produit attendus : 264 bp

Composition du Mix réactionnel (volume final de 49µL+ 1µL = 50 µL):

H2O :	37,7 µL
Buffer :	5 µL
dNTP (2 µM) :	5 µL
F1 (100 µM) :	0,5 µL
R1 (100 µM) :	0,5 µL
Taq polymérase (biolabs) :	0,3 µL
+ Échantillon :	1 µL

Ensuite, le cycle de PCR réalisé est le suivant :

Dénaturation initiale à 95°C	pendant 1min	} durant 40 cycles
Dénaturation à 95°C	pendant 1min	
Hybridation des amorces à 55°C	pendant 1min	
Elongation à 72°C	pendant 1min	
Elongation finale à 72°C	pendant 10min	

Même conditions pour les couples d'amorces :

Bostact-test F1 5' GCTATCGGAAGCGAGTCATC 3'
 Bostact-test R1 5' AATATTTGCGCTCAGGAGGA 3'

Couple nommé : Isa 1
 Produits attendus : 240 bp

Et :

BostAct 1F : 5' GCTTCGACCGAAAGTTCCG 3'
 Bostact-test R2 : 5' GGCGAAGAGGTCTTTTCTGA 3'

Couple nommé : Isa 2
 Produits attendus : 201 bp

b) Réalisation du gel d'agarose à 1% puis de l'électrophorèse :

Un gel d'agarose à 1% dans du tampon TAE 1X (Tris base 40 mM; acide acétique 40 mM ; EDTA 1 mM.) additionné de 5% de BET, est réalisé afin de visualiser les résultats de la PCR classique.

L'addition de BET (Bromure d'Ethidium) permet de visualiser sous lumière UV l'échantillon. Le gel est entièrement immergé dans une cuve pour électrophorèse contenant du TAE 1X afin de faciliter la migration. Un marqueur de poids moléculaire est déposé pour permettre d'évaluer la taille du produit de PCR qui a migré. Un volume de 10 µl d'échantillon additionné de 2 µl d'une solution de bleu de charge 6X, est déposé dans chaque puits. Le bleu de charge permet de faire descendre l'ADN dans les puits et d'éviter toute contamination. L'ADN, qui est une molécule chargée négativement, migre de l'électrode négative vers l'électrode positive. La migration est réalisée sur une période moyenne de 30 minutes à 150Volts/cm. Après migration, le gel est observé sous lampe UV.

IV) PCR quantitative :

La PCR-Q développée ici est une technique de PCR en temps réel basée sur une réaction enzymatique de PCR et sur la mesure en continu du nombre de copies du fragment cible. Du point de vue enzymatique, il n'y a aucune différence théorique entre la PCR classique et la PCR en temps réel, à l'exception des réactifs utilisés (Annexe 3).

Il existe différents appareils de PCR en temps réel. Dans notre cas, l'ensemble des résultats ont été obtenus grâce à un appareil Mx 3000 P™ de Stratagene®.

A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent (ici le SYBR Green). Le SYBR Green est un colorant intercalant de l'ADN qui entre en fluorescence lorsqu'il se fixe à l'ADN. Il détecte tout l'ADN produit, même aspécifique. Il est l'agent le plus fréquemment utilisé. Il présente divers avantages : il est relativement économique, facile à utiliser, possède une sensibilité supérieure au bromure d'éthidium, n'inhibe pas la réaction d'amplification et permet de garder les mêmes amorces utilisées en PCR classiques.

La technologie basée sur le SYBR Green ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité repose entièrement sur ses amorces (Bustin, 2000). D'où la nécessité de travailler sur l'optimisation des amorces.

L'émission de fluorescence est liée à l'état double brin de l'ADN. En effet, lors de la réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution émet peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. L'intensité de fluorescence est proportionnelle au nombre d'amplicon généré. Lorsqu'elle est suivie en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée pendant l'étape de polymérisation. L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (Bustin, 2000).

La PCR-Q en temps réel permet une quantification absolue, utilisée lors du stage, ou de réaliser une quantification semi-relative que nous n'aborderons pas.

L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible. Cette quantification absolue permet d'obtenir des valeurs en nombres de copies, en grammes, etc. Ceci nécessite la réalisation au préalable d'une courbe standard (voir paragraphe VI) avec au moins 5 points (dilutions).

La courbe d'amplification montre le changement du signal de fluorescence après chaque cycle. Les données de fluorescence peuvent donc être exprimées en logarithme afin d'identifier facilement la phase exponentielle et mesurable, qui prend alors une apparence linéaire. Cette partie, alors appelée « segment quantifiable », permet de calculer la quantité d'ADN initial par rapport au Ct (threshold cycle et le numéro du cycle auquel l'intensité de la fluorescence a dépassé le seuil fixé) obtenu en relation avec la courbe standard établie. La courbe de dissociation (meltcurve) permet de vérifier la spécificité des réactions d'amplifications par rapport au Tm (température où 50% de notre amplicon est dissocié) attendu (celui de nos amorces). Généralement plus le nombre de cycle auquel un produit d'amplification peut-être détecté (Ct) est petit et plus la quantité d'ADN initial est importante. Il est nécessaire avant toute manipulation de fixer le threshold (seuil de fluorescence) et de garder toujours le même afin que nos résultats soient comparables et représentatifs.

V) Clonage :

Le clonage correspond ici à la sélection d'un fragment d'ADN inséré dans un vecteur ou plasmide à l'aide d'un micro-organisme (*Escherichia coli*). Ce vecteur est ensuite inséré dans une bactérie rendue compétente. Le kit « TOPO-TA cloning® kit » (annexe 4) a été utilisé pour cette étude.

La seconde étape est celle de la transformation des bactéries avec le plasmide. Un choc thermique est réalisé (30 s à 42°C) pour faire pénétrer le plasmide dans la bactérie. On incube pendant une heure à 37°C dans du SOC. Ce qui permet de lancer la phase de multiplication bactérienne et éviter ainsi une phase d'adaptation sur milieu gélosé.

Puis un étalement sur milieu gélosé LB (lysogeny Broth) contenant de l'ampicilline à 50µg/ mL et du X-gal (40mg/ mL) (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-galactopyranoside) a été réalisé. Après étalement les boîtes ont été placées à l'étuve à 37°C.

Après 24 heures d'incubation, on peut observer les colonies bactériennes. Les colonies bleues correspondent aux bactéries ayant intégré le plasmide mais sans l'insert, les colonies blanches quand à elle ont bien inséré le plasmide contenant le produit de P.C.R. Le gène de la β-galactosidase est alors inhibé d'où la couleur blanche des colonies transformées. On réalise alors une extraction plasmidique selon le protocole FastPlasmid™ Mini de eppendorf (annexe 5). Le plasmide peut subir une étape de linéarisation si souhaité par l'enzyme Xho I. Pour cela il suffit de placer notre plasmide à 37°C pendant 1H, et le transférer dans une étuve à 65°C pendant 15 min pour inactiver l'enzyme.

Une PCR classique nous permet de visualiser si le plasmide incorporé possède bien l'insert. (Couples d'amorces Bostact 1F, Bostact test R2) programme BostInm. Cette étape étant nécessaire dans la réalisation de nos courbes standard.

RESULTATS / DISCUSSION

I) Extraction d'ADN selon le manuel d'extraction QIamp Qiagen® :

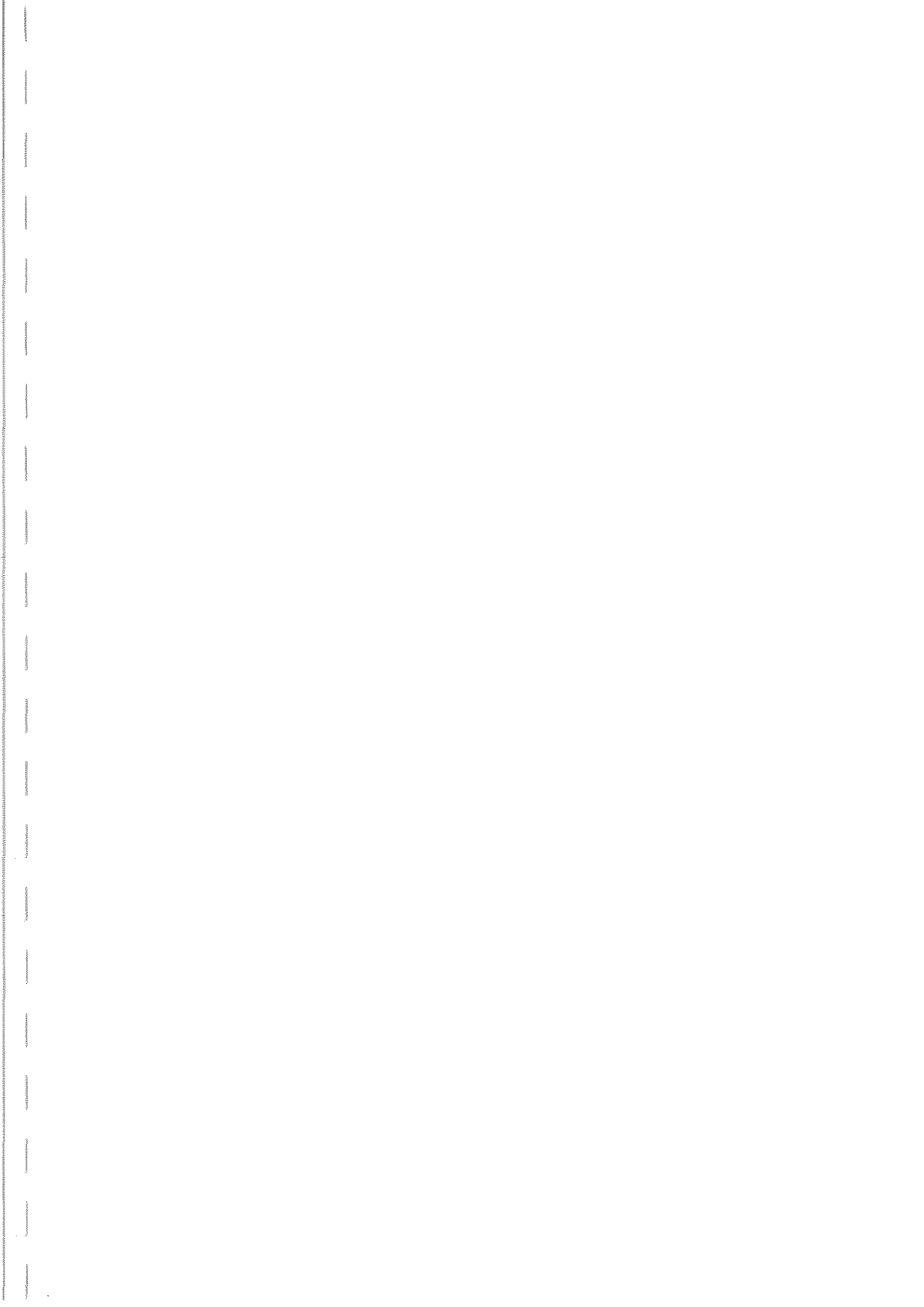
Ces extraits témoins permettront la réalisation de PCR classiques et de PCR quantitatives, dans le but d'optimiser notre méthode.

Tableau 1 : Résultats d'extraction réalisée sur des témoins négatifs en *Bonamia ostreae* provenant d'*Ostrea edulis* :

n° échantillon	concentration initiale en µg/mL	volume ADN en µl	volume d'eau en µl	volume final en µl	concentration finale en µg/mL
06/029/03	202,9	5	195	200	5,073
06/029/04	161,1	6	194	200	4,833
06/029/05	121,6	8	192	200	4,864
06/029/06	81,0	31	469	500	5,022
06/029/10	73,4	34	466	500	4,991
06/029/11	156,4	6	194	200	4,692
06/029/12	47,0	21	179	200	4,935
06/029/14	22,5	9	31	40	5,063
06/029/15	62,9	16	184	200	5,032
06/029/16	46,9	21	179	200	4,925

Tableau 2 : Résultats des témoins positifs en *Bonamia ostreae* provenant d'*Ostrea edulis* :

n° échantillon	concentration initiale en µg/mL	volume ADN en µl	volume d'eau en µl	volume final en µl	concentration finale en µg/mL
216	49,6	20	180	200	4,960
219	36,0	14	86	100	5,040
219'	86,8	12	188	200	5,208
219*	156,2	13	387	400	5,077
219°	83,2	12	188	200	4,992
321	119,4	17	383	400	5,075
324	153,6	13	387	400	4,992
324*	133,8	15	385	400	5,018
326	173,6	12	388	400	5,208
326'	81,7	12	188	200	4,902
341	53,5	19	181	200	5,083
341'	161,9	12	388	400	4,857
341*	115,6	17	383	400	4,913
354	63,7	16	184	200	5,096
380	67,7	15	185	200	5,078
490	135,3	15	385	400	5,074
499	102,1	20	380	400	5,105
499'	142,2	14	386	400	4,977
499*	140,3	14	386	400	4,911
499°	110,2	18	382	400	4,959
916	59,7	17	183	200	5,075
2198	78,2	13	187	200	5,083
b+	86,0	12	188	200	5,160



XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXXXX

II) Optimisation en PCR-Q :

a) Extraction d'ADN à partir de témoins négatifs :

La mise au point de notre technique nous incite à travailler avec des échantillons négatifs. Ces témoins négatifs permettent notamment de vérifier une absence d'amplification en l'absence du gène recherché que ce soit en PCR classique ou en PCR quantitative. C'est pourquoi nous avons décidé d'extraire l'ADN des échantillons négatifs d'*Ostrea edulis*, vérifié antérieurement par apposition afin de pouvoir travailler en PCR-Q et classique.

b) Comparaison des prémix Brilliant® et Full Velocity® :

Cette comparaison entre ces deux types de prémix, permettra selon les résultats obtenus de choisir celui donnant des résultats plus spécifiques au gène de *Bonamia ostreae* codant pour l'actine I (voir figure 8).

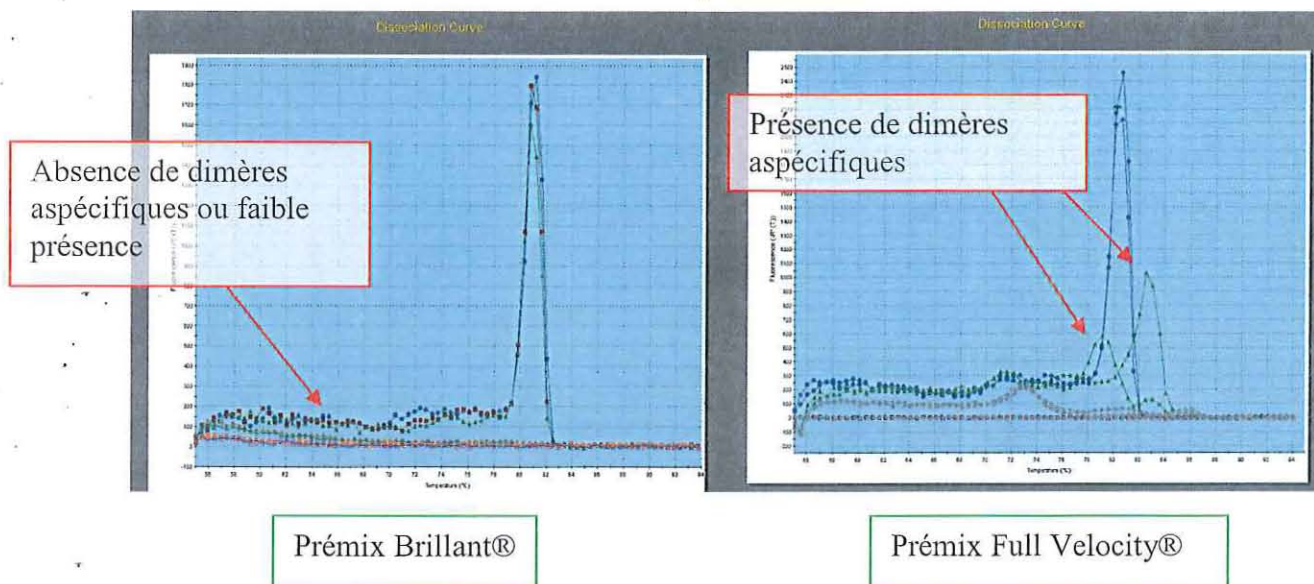


Figure 8 : Courbes de dissociations des deux prémix utilisés.

Les résultats obtenus en PCR-Q avec les amorces Bost Act 1F, 1R (couple Imma) avec un Prémix au Brilliant® semblent être plus spécifiques que ceux obtenu en Full Velocity®. Avec le prémix Brilliant®, les résultats obtenus sont nettement meilleurs. Les Ct obtenus sont plus faible donc les résultats obtenus sont plus spécifiques vis-à-vis du gène de l'actine I chez *Bonamia ostreae*. Les témoins négatifs et les NTC (échantillons composés d'eau) ne présentent aucune amplification et permettent donc de conclure sur ces deux types de méthodes. De plus, l'absence ou la faible présence de dimères confirme la spécificité des amorces employées.

Afin de corriger la faible présence de dimères et d'augmenter la spécificité de nos amorces vis-à-vis du gène recherché, nous avons testé d'élever la température d'hybridation des amorces.

c) Comparaison des résultats obtenus avec le prémix Brilliant® à une température d'hybridation des amorces de 55°C puis 60°C :

La réalisation de cette étape permet d'augmenter la spécificité de réaction de nos amorces vis-à-vis du gène recherché (voir figure 9).

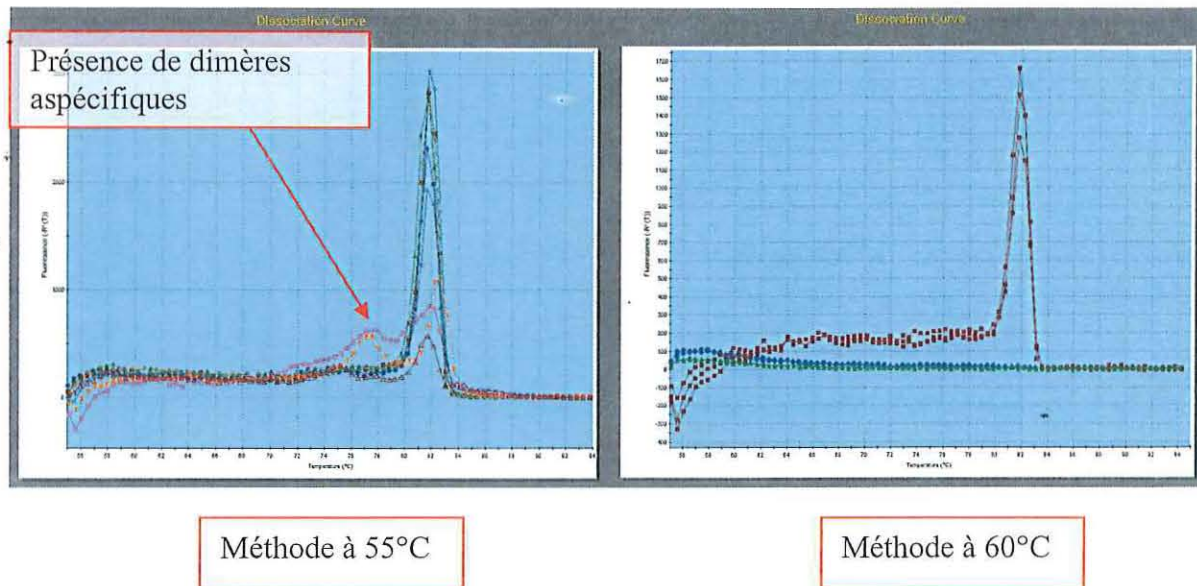


Figure 9 : Courbes de dissociation obtenues avec le prémix Brilliant® à une température d'hybridation de 55°C et 60°C

L'élévation de la température d'hybridation à 60°C a permis d'augmenter la spécificité de nos amorces comparativement à une température de 50°C. Les dimères d'amorces et les Ct obtenus sont un peu plus faibles.

Néanmoins, à ce stade l'optimisation de la température et la sélection du prémix ne donne pas de résultats optimum et souhaitables pour l'amplification du gène de l'actine grâce aux amorces Inma I. Nous avons alors envisager de réaliser une gamme de concentration croisée en amorces.

d) Réalisation d'une gamme de concentration croisée en amorces.

Cette gamme (75 – 300 nM) permet de déterminer la concentration adéquate en amorces donnant de meilleurs résultats et permettant ainsi une spécificité accrue. (Figure 10 ; tableau 3)

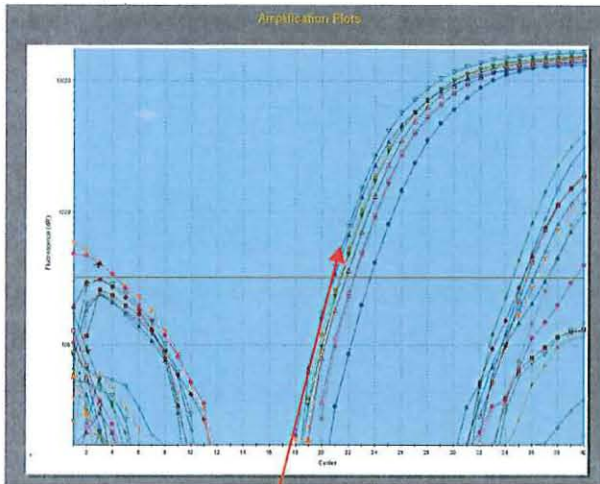


Figure 10 : Résultats de la gamme de concentration croisée en amorces.

Puits n° 22 sortant le premier sur la courbe d'amplification donc ayant le Ct le plus petit (voir tableau 3).

Tableau 3 : Résultats d'amplification obtenus grâce à la gamme croisée de concentrations d'amorces :

Concentration en nM Amorce sens/ Amorce anti sens	75 nM	150 nM	300 nM
75 nM	23,64	22,45	22,36
150 nM	21,81	21,29	21,45
300 nM	21,42	20,76	20,91

Une concentration en amorce sens (Bostact 1F) de 150 nM et antisens (Bostact 1R) de 300 nM, nous a donné un Ct de 20,76 qui s'avère être le plus faible. A cette concentration en amorce on obtient une meilleure spécificité. Malgré cette optimisation effectuée en P.C.R Q, on obtient toujours après dépôts des produits obtenus en PCR-Q sur gel, des doubles bandes aspécifiques.

Nous avons donc décidé de changer de couples d'amorces (Couple Bost Act test F1, R1 et Bost Act test R2, Bost Act 1F) et de tester leur efficacité en PCR classique.

e) Tests de nouvelles amorces en PCR Classique :

La réalisation de cette PCR classique, puis la migration sur gel permet de repérer les amorces fonctionnant (apparition de mono bandes spécifiques à la taille attendu) et de vérifier la formation de dimères et d'amplification aspécifique (témoin négatif dépourvu du gène recherché). En vert (figure 11), ce sont les couples d'amorces retenus et en rouge ceux non sélectionnés.

Marqueur, de taille de 100 bp.

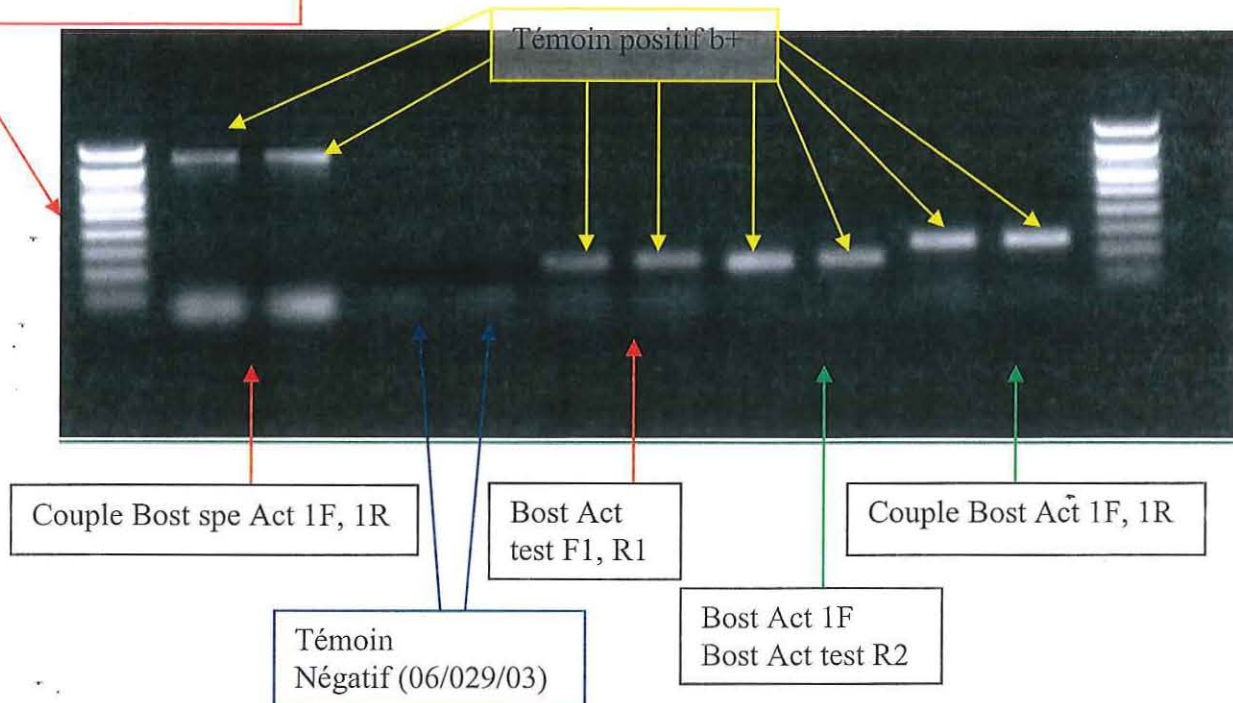


Figure 11 : Résultats de la sélection des amorces en PCR classiques.

Nous décidons de sélectionner les couples Bost Act 1F, 1R (Inma) et Bost Act 1F, Bost Act test R2 (Isa 2) car le produit de PCR est d'une taille attendue. De plus, l'intensité de la bande observée reflète le nombre d'amplicon et donc de la spécificité des amorces. Les couples d'amorces ont été sélectionnés (Bostact 1F, 1R – Bostact 1F, Bostact test R2) sur la base du profil en électrophorèse des produits de PCR (notamment l'intensité des bandes).

D'autre part, suites aux nombreux résultats difficile d'interprétation en PCR-Q, il nous a été nécessaire d'instaurer un mode standard d'utilisation de la PCR-Q. Les bandes multiples apparues devaient provenir de contaminations causées par les manipulations fréquentes de nos échantillons voir de nos amorces. C'est pourquoi, dorénavant, une eau stérile sera utilisée pour chaque expérience et les amorces seront aliquotées. Enfin, des précautions dans l'utilisation des réactifs seront prises.

Afin d'améliorer les résultats, un dye de référence (voir Figure 12) a été utilisé.

f) Tests PCR-Q avec référence dye :

Le dye de référence permet de lisser nos résultats. Le référence dye est une solution possédant une fluorescence de base. Cette solution permet que tous nos échantillons possèdent le même niveau de fluorescence en début de réaction. Ce qui permet de fixer un seuil de fluorescence basale pour chaque échantillon et donc de pouvoir plus facilement interpréter les valeurs de fluorescence.

La PCR-Q est réalisée avec un Prémix Full avec référence dye, un prémix Brillant avec référence dye, des résultats sans référence dye et les résultats des NTC avec référence dye. Cette étape permet de mettre en pratique le rôle du référence dye et de visualiser ces effets sur les résultats.

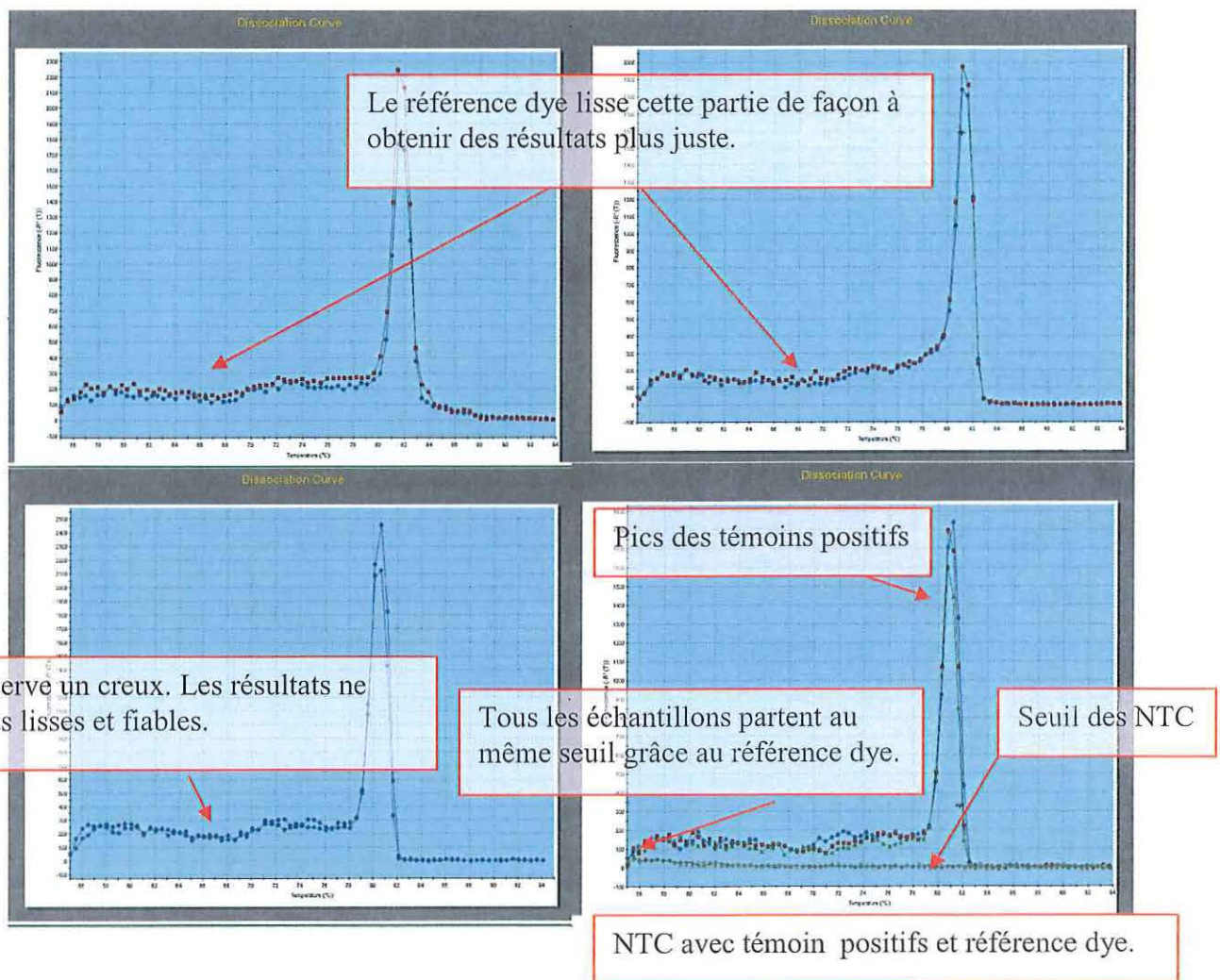


Figure 12 : Test PCR-Q sur l'utilisation du référence dye.

Le référence dye par sa fluorescence avec un seuil de base fixé comme référence ; lisse tout nos résultats que ce soit en Brillant® ou en Full Velocity®. Nous continuerons donc à travailler avec du référence dye permettant ainsi une meilleure approche de nos résultats, du

fait que tous nos échantillons même les NTC (témoin négatif car composé d'eau) soit comparable à une valeur fixée.

Les résultats obtenus s'avérant beaucoup plus nets, l'utilisation d'un dye de référence a été généralisée à l'ensemble des analyses menées par la suite. Un test de PCR-Q a été réalisé visant à déterminer quels couples d'amorces présélectionnés donne après optimisation de la méthode les résultats les plus satisfaisants (Figure 13).

g) Tests en PCR-Q des amorces Imma, Isa 1 et Isa 2 :

A cette étape l'optimisation de notre méthode était bien avancée. Cette optimisation se compose d'un Tm de 60°C, de l'utilisation du prémix au Brilliant® et le référence dye instauré. Cette étape a pour rôle de faire ressortir la ou les amorces fonctionnant le mieux en PCR-Q.

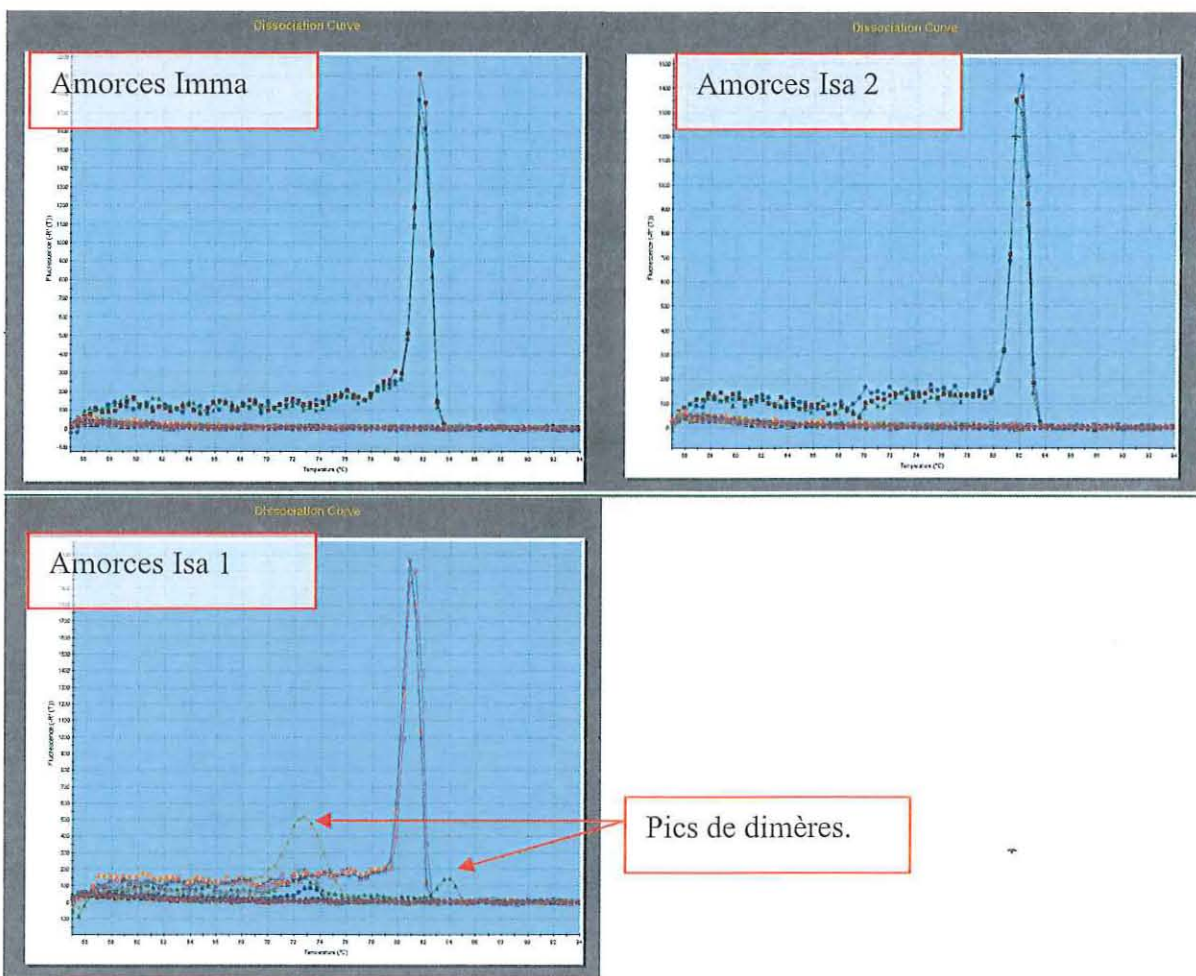


Figure 13 : Résultats de la spécificité de nos amorces présélectionnées en PCR-Q avec les conditions d'optimisation validées.

Les couples d'amorces les plus spécifiques après ces étapes d'optimisation sont les couples Imma et Isa 2. Nous décidons donc de travailler avec celles-ci. Malgré tout, en déposant les produits issus de la réaction de PCR quantitative sur gel, nous observons toujours

une bande aspécifique. Cela peut être imputable à la différence de température d'hybridation qu'il existe entre les protocoles appliqués en PCR classique et en PCR quantitative. Après réflexion et discussions, il se pourrait que ce produit aspécifique de taille proche à notre produit spécifique, soit tout simplement ce même produit mais retrouver de façon replier sur lui-même (linéarisé ou replié dans sa configuration spatiale). C'est pourquoi nous décidons de continuer tout de même dans ces conditions.

Ensuite, nous avons testés la sensibilité de nos amorces, en vue de les sélectionner, par l'utilisation de concentrations décroissantes d'ADN. Une fois cette étape réalisée, il ne nous restera plus qu'à effectuer une gamme de concentration croisée en amorces afin d'obtenir une plus grande fiabilité de notre méthode.

h) Test de sensibilité des amorces Isa 2 et Inma :

Ce test a pour but de faire ressortir l'amorce la plus sensible au gène recherché Figure 14). Car c'est cette amorce qui permettra de mieux visualiser une faible présence au gène de *Bonamia ostreae* codant pour l'actine I. L'amorce la plus sensible est celle qui est donc la plus spécifique au gène recherché. Pour ceci nous avons réalisé une gamme de dilution à partir de l'ADN de *Bonamia ostreae* extrait et de concentration connu. Cette gamme a une fourchette de $10\text{ng}/\mu\text{L}$ à $10^{-7}\text{ng}/\mu\text{L}$.

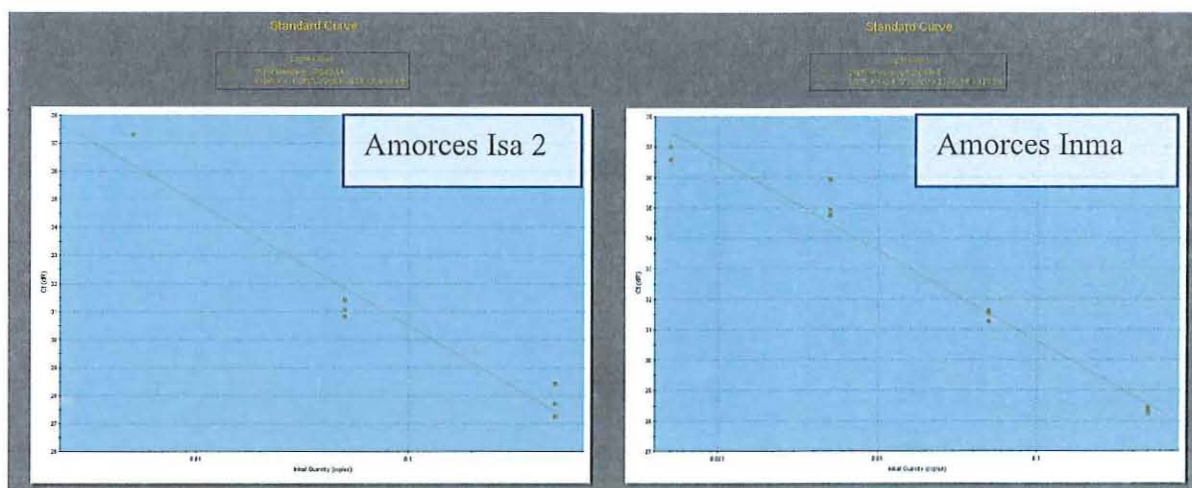


Figure 14 : Résultats du test de sensibilité vis-à-vis de nos amorces sélectionnées.

Le couple d'Isa 2 a 116,8 % d'efficacité contre 68,8%. Ces résultats sont obtenus par moyenne des triplicats réalisés pour chaque dilution. Le couple Isa 2 est donc plus sensible que le couple d'Imma. Nous travaillerons avec les amorces Bost Act 1F et Bost Act test R2.

Afin d'obtenir une plus grande fiabilité de notre méthode avec les amorces sélectionnées (couple Isa 2), il a été nécessaire de réaliser une gamme croisée de concentration en amorces.

i) Réalisation d'une gamme croisée de concentration en amorces avec le couple Isa 2 (Bostact 1F, Bostact test R2):

Cette gamme (75 – 300 nM) permet de déterminer la concentration adéquate en amorces donnant de meilleurs résultats et permettant ainsi une spécificité accrue. (Tableau 4)

Une concentration en amorce sens (Bostact 1F) de 300 nM et antisens (Bostact testR2) de 150 nM, nous a donné un Ct de 22,79 qui s'avère être le plus faible. A cette concentration en amorce on obtient une meilleure spécificité.

Concentration en nM Amorce sens/ Amorce anti sens	75 nM	150 nM	300 nM
75 nM	25,47	23,83	23,27
150 nM	24,57	23,41	22,79
300 nM	24,37	No Ct	23,94

Meilleur Ct obtenu de 22,79 à une concentration d'amorce sens de 300 μ M et antisens de 150 μ M

Tableau 4 : Résultats d'amplification obtenus grâce à la gamme croisée de concentration en amorces :

La réalisation d'une gamme de concentration croisée en amorce a permis d'obtenir la concentration adéquate pour laquelle nos amorces sont les plus spécifiques. C'est-à-dire à cette concentration en PCR-Q ou les Ct obtenus s'avèrent plus faible donc nos résultats plus spécifiques.

III) Mise au point des courbes étalons :

Une courbe standard est comme une gamme d'étalonnage effectuée par l'appareil de PCR-Q d'un échantillon de *Bonamia ostreae*. Cette courbe standard doit être réalisée à chaque fois que l'on a des échantillons à tester.

Une fois la PCR-Q optimisée, un clonage du fragment d'ADN de *Bonamia ostreae* codant l'actine I inséré dans un vecteur, par le kit FastPlasmid Mini d'Ependorf®, a été effectué pour la réalisation de nos courbes standard. Ces courbes standard permettront de quantifier de manière absolue nos échantillons à tester. La concentration en plasmide est connue. Une série de dilution est réalisée afin d'obtenir une droite possédant un spectre assez large. Le Ct obtenu pour chaque point permet de construire notre courbe standard. Les échantillons sont comparés à cette courbe pour pouvoir être quantifié.

Cette détermination est basée sur le rapport $Ct = f([ADN \text{ initial}])$

La mise au point des courbes standard n'a pas été achevée, nos premiers résultats n'ont été ni reproductibles ni interprétable (pas d'homogénéité dans les résultats) en utilisant le clonage du fragment recherché à partir d'huîtres infectées.

DISCUSSION

La mise au point d'une méthode quantitative dans la recherche d'une infection à *Bonamia ostreae* chez l'huître plate *Ostrea edulis* s'avère être une étape longue ou il est nécessaire d'avancer par pallier.

La recherche d'amorces spécifiques du gène souhaité a permis de pré-sélectionner nos amorces en PCR classique. L'optimisation en PCR quantitative a permis une meilleure approche du fait de sa plus grande sensibilité par rapport à la PCR classique. Cette PCR en temps réel nous a renseigné sur la spécificité et l'efficacité des amorces grâce aux Ct obtenus. L'amplification obtenue de nos produits, (à la même concentration en amorces pour les couples différents) l'absence de dimères aspécifique pouvant être observé lors d'altération des amorces causées par le nombre répétitif de cycles nous a permis de présélectionner les amorces intéressantes dans l'optimisation de notre technique.

L'optimisation des méthodes de travail n'a fait que renforcer l'efficacité de nos amorces, et les rendre plus spécifiques au gène recherché. (Prémix Brilliant, température d'hybridation des amorces à 60°C, utilisation unique et extemporaine des composants de la PCR-Q)

Le test de sensibilité de nos nouvelles amorces réalisé en PCR-Q a permis la sélection du couple d'amorces Isa 2 (Ici les amorces Bost Act 1F, Bost Act test R2). L'optimisation sur l'utilisation des meilleures concentrations en utilisant un tableau de concentration en amorces croisées, nous a permis de valider notre méthode. La concentration optimale d'amplification du fragment est de 300nM pour Bost Act 1F et de 150 nM pour Bost Act test R2.

Une fois ces étapes réalisées le passage à l'établissement de courbes standard a pu être envisagé dans le but de quantifier directement la concentration en ADN initial dans nos échantillons.

Les premiers résultats démontrent que l'établissement des courbes standard doit-être optimisé, car c'est à partir de ces courbes que la quantification de nos échantillons est réalisée.

Lorsque la mise au point sera terminée, cette méthode plus sensible, permettra une meilleure quantification et recherche du gène de *Bonamia ostreae* codant l'actine I. Par la suite cet outil pourra être utilisé en diagnostic c'est-à-dire révéler la présence de *Bonamia ostreae* chez les individus mais surtout de quantifier le niveau d'infestation. Ceci permettra par exemple de réaliser des transferts d'individus entre deux zones géographiques distinctes sans véhiculer le parasite, limitant, ainsi les impacts de la bonamiose. En effet, à l'heure actuelle il existe peu de moyen de lutte contre ce parasite. L'un des rares moyens de limiter une infection chez les mollusques hormis la résistance au parasite est de fermer la zone infectée et de détecter le plus précocement possible la maladie.

Cette technique permettra donc de mesurer les degrés d'infection des huîtres par le parasite *Bonamia ostreae* et à terme modéliser la dispersion de la maladie au sein des stocks d'élevage. C'est pourquoi il est nécessaire de continuer à travailler sur ce projet, afin de faciliter le diagnostic de la maladie.

CONCLUSION

Mon objectif de stage au sein du Laboratoire de Génétique et Pathologie de la station de la Tremblade avait pour but d'Optimiser la méthode de quantification de l'infection à *Bonamia ostreae* chez l'huître plate *Ostrea edulis* par P.C.R quantitative. Ce projet si mis à terme permettrait un diagnostic précoce de la bonamiose et ainsi limiter l'infections des mollusques.

Après avoir testé dans un premier temps le couple d'amorce utilisé pour la méthode de PCR Classique en PCR-Q selon une approche fixée, il a été nécessaire de tester de nouvelles amorces adaptées à la PCR-Q. Cette approche est la même pour chaque développement de méthode en PCR-Q. On utilise ou créer des couple d'amorces. On sélectionne le plus spécifiques en optimisant la température d'hybridation et en sélectionnant le protocole de travail le plus adéquat (Température d'hybridation des amorces, sélection du prémix et instauration des conditions de manipulations). Une fois le couple d'amorces sélectionné on établi une gamme croisée de concentrations en amorces, afin d'optimiser la spécificité. Chaque étape réalisée nécessite une vérification. Dans cette vérification on recherche l'absence de dimères observables sur gel après dépôts des produits provenant de la PCR-Q. Ce qui témoigne de la spécificité du couple sélectionné.

La majeure partie du stage a été de trouver les meilleures conditions de travail pour nos amorces et de sélectionner par la suite celui s'avérant le plus spécifique (Ici le couple Bostact 1F, Bostact test R2). Une fois cette étape de réalisée nous avons voulu procéder à l'établissement des courbes standards. Or nous nous sommes heurté à pas mal de difficultés qui n'ont permis à l'aboutissement du stage. Les différentes perspectives afin de finaliser la mise au point sont toujours en cours de discussions.

Ce stage m'a permis d'obtenir une certaine autonomie dans mon travail, et d'acquérir des connaissances et compétences du milieu marin, de la recherche et développement d'outils de diagnostics. De plus il m'a permis de mettre en application mes connaissances acquises lors de ma formation en IUT. Pour conclure, ce stage a été très enrichissant du point de vue professionnel et humain. Enfin, l'utilisation des différents outils documentaires utilisés est une compétence acquise durant mon stage.

BIBLIOGRAPHIE

BACHERE, E., 1982. *Bonamia ostreae* (PICHOT et coll., 1980) parasite de l'huître plate : comparaison de deux méthodes de diagnostic. Cons. int. Explor. Mer, 28 : 1-10.

BACHERE, E., DURAND, J., TIGE, G., 1982. *Bonamia ostreae* (PICHOT et coll., 1980) parasite de l'huître plate : comparaison de deux méthodes de diagnostic. Cons. int. Explor. Mer, 28 : 1-10.

BAUD, J.P., GERARD, A., NACIRI-GRAVEN, Y., 1997. Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae*-resistant and wild oyster *Ostrea edulis* in an intensive system. Mar. Biol. 130 : 71-79.

BEDIER, E., COCHENNEC-LAUREAU, N., LANGLADE, A., KOPP, J., GOYARD, E., GERARD, A., 2001. Recovery of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.) : new development. EAS, August 4-7, 2001, Trondheim, Norway.

BUSTIN, S., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 25(2):169-93.

CARNEGIE R., BARBER B.J., CULLOTY S.C., FIGUERAS A.J., DISTEL D.L. 2000. Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. Dis. Aquat. Org., 42, 199-206.

COCHENNEC, N., 1997. La Bonamiose : caractérisation du parasite *Bonamia ostreae* et étude de ses interactions avec l'hôte, l'huître plate *Ostrea edulis*. Mémoire Ecole Pratique des Hautes Etudes. Sciences de la Vie et de la Terre. Montpellier, 173 pp.

COCHENNEC, N., 2001. *Bonamia ostreae*, parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis* : sa position taxonomique parmi les parasites du groupe des «microcell», analyses des interactions hôte/parasite chez plusieurs populations d'huîtres plates. Thèse Doctorat d'Etat en Biologie Moléculaire, Université de La Rochelle, 211 pp.

COCHENNEC N., LE ROUX F., BERTHE F., GERARD A., 2000. Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. J. Invertebr. Pathol. 76 : 26-32.

COCHENNEC-LAUREAU N, REECE KS, BERTHE FCJ, HINE PM ,2003. *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation leads to the genus *Bonamia* (Haplosporidia). Dis Aquat Org 54(3): 209-217

COMPS, M 1970. Observation sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (*Ostrea edulis*, L.) dans le bassin de Marennes. Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 34(3) : 317-326

COMPS, M., 1983. Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des Mollusques bivalves marins. Thèse Doctorat d'Etat en Sciences Naturelles, Université de Montpellier, 128 pp.

COMPS, M. et DUTHOIT, J.L. 1976. Infection virale associée à la «maladie des branchies» de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. C.R. Acad. Sc., D, 283 : 1595-1596.

COMPS, M., TIGE, G., GRIZEL, H., 1980. Etude ultrastructurale d'un protiste de l'huître *Ostrea edulis* L. C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 290 : 383-384.

CULLOTY, S.C., MULCAHY M.F., 1992. An evaluation of anaesthetics for *Ostrea edulis* L. 4th internat. Colloq. Marine Aquaculture; 17-21 Sept., Vigo (Pontevedra), Spain.

FARLEY, C.A., WOLF, P.H., ELSTON, R., 1988. A long-term study of «microcell» disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g.n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp.n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp.n.). *Fishery Bulletin* 86:581-593.

GIRARD, S., PEREZ AGUNDEZ, J.A., MIOSSEC, L., CZERWINSKI, N., 2005. Recensement de la conchyliculture 2001. Agreste Cahiers de la Conchyliculture, Numéro 1, 89 p.

GRIZEL, H., 1985. Etude des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse Doctorat d'Etat en Sciences Naturelles, Université de Montpellier, 145 pp.

GRIZEL, H., et HERAL, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *J. Cons. Int. Explor. Mer*, 47, 339-403.

GRIZEL, H., COMPS, M., BONAMI, J.R., COUSSERANS, F., DUTHOIT, J.L., LE PENNEC, M.A., 1974. Recherche de l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis*, Linné. *Bull. Inst. Pêches. Marit.*, 240, 7-30.

HERAL, M., 1989. L'ostréiculture française traditionnelle. Dans *Aquaculture* (G. Barnabé ed.), Paris, Technique et Documentation, Lavoisier : 345-389.

HERRBACH, B. 1971. Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 35(1) : 79-87.

HERVIO, D., 1992. Contribution à l'étude de *Bonamia ostreae* (Asctospora), protozoaire parasite de l'huître plate *Ostrea edulis* (Bivalvia), et à l'analyse des interactions hôte-parasite. Thèse de 3^{ème} cycle en Biologie fondamentale et appliquée (Spécialité : Protistologie), Université de Clermont-Ferrand, 170 pp.

HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P.S., GRIFFITH, R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Bio-Technology* 10 (4), 413-417.

HINE PM, COCHENNEC-LAUREAU N, BETHE FC, 2001. *Bonamia exitiosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters, *Ostrea chilensis*, in New Zealand. *Dis Aquat Org* 47(2): 63-72

HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D., WATSON, R., GELFAND, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (16), 7276-7280.

HOMAN, WL., LIMPER, L., VERLAAN, M., BORST, A., VERCAMMEN, M., VAN KNAPEN, F., 1997. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. *Parasitol Res.* 83(3):285-9.

KUBISTA, M., ANDRADE, JM., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONAK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJOBACK, R., SJOGREEN, B., STROMBOM, L., STAHLBERG, A., ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Feb 2. *En cours de publication.*

MARTEIL, L., 1960. Ecologie des huîtres du Morbihan *Ostrea edulis* Linné et *Gryphaea angulata* Lamarck. Thèse d'Etat. Université des sciences de Rennes. 120 p.

MARTIN, A.G., GERARD, A., COCHENNEC, N., LANGLADE, A., 1993. Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae* : assessment of the resistance of a first selected generation. *European Aquaculture Society, Special Publication, Ghent, Belgium, 18 : 545-554.*

MIALHE, E., BACHERE, E., CHAGOT, D., GRIZEL, H., 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot and coll., 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture, 71 : 293-299.*

MONTES, J., ANADON, R., AZEVEDO, C., 1994. A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *J. Invertebr. Pathol.* 1-6.

NACIRI, Y., 1994. Sélection des mollusques : Bilan et nouvelles perspectives concernant la croissance, la qualité et les résistances aux maladies. *Bordeaux Aquaculture, 54-61.*

NACIRI-GRAVEN, Y., HAURE, J., GERARD, A., BAUD, P., 1999. Comparative growth of *Bonamia ostreae* resistant and wild flat oyster *Ostrea edulis* in an intensive system : II second year of the experiment. *Aquaculture* 171 : 195-208.

NACIRI-GRAVEN, Y., MARTIN, A.G., BAUD, J.P., RENAULT, T., GERARD, A., 1998. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 224 : 91-107.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000. Diagnostic manual for aquatic animal diseases. Third edition, 2000. Edt OIE, Rue de Prony, 75 017 Paris.

O'NEILL, G., CULLOTY, S., MULCAHY, M., 1998. The effectiveness of two routine diagnostic techniques for the detection of the protozoan parasite *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1980).

PERKINS, F.O., 1979. Cell structure of shellfish pathogens and hyperparasites in the genera *Minchinia*, *Urosporidium*, *Haplosporidium*, and *Marteilia* – taxonomic implications. *Mar. Fish Rev.* 41(Jan.-Feb.) : 25-37.

PICHOT, Y., COMPS, M., GRIZEL, H., RABOUIN M.A., 1980. Recherches sur *Bonamia ostreae*, gen. n. sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 43 : 131-140.

POITRAS, E., HOUDE, A., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology (Canada)*. Vol.2, No 2, pp.2-11.

REECE KS, SIDDALL ME, STOKES NA, Burreson EM. 2004. Molecular phylogeny of the Haplosporidia based on two independent gene sequences. *J Parasitol.* 90(5):1111-22.

STRATAGENE, 2004. Introduction to quantitative P.C.R, Methods and Application Guide, 48 p.

TIGE, G., GRIZEL, H., COMPS, M., 1980. Données sur le nouveau parasite de l'huître plate. Situation épidémiologique. – *Cons. Inter. Explor. Mer, Spec. Sess. Copenhague 1980*, N° 39, 7 p.

ZABALETA, A. et BARBER, B.J., 1996. Prevalence, intensity and detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* L : in the Damaniscotta River area, Maine. *J. Shellfish Res.* 15 : 395-400.

SOMMAIRE DES ANNEXES :

ANNEXE 1 : Extraction d'ADN selon le protocole décrit dans le manuel d'extraction des kits QIAamp® DNA Mini Kit de QIAGEN (figure 1') :

ANNEXE 2 : Principe de la P.C.R Classique (Figure 2') :

ANNEXE 3 : Composition et profil thermique des différentes méthodes utilisées en PCR-Q.

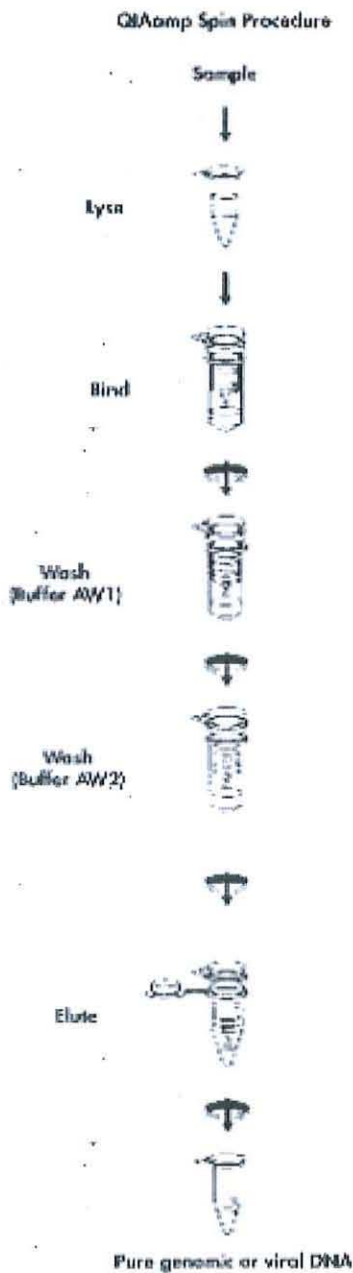
ANNEXE 4 : Clonage dans le plasmide pCR II :

ANNEXE 5 : Extraction d'ADN selon FastPlasmid™ Mini (Eppendorf):

ANNEXES

I. Extraction d'ADN selon le protocole décrit dans le manuel d'extraction des kits QIAamp® DNA Mini Kit de QIAGEN (figure 1') :

Protocole d'extraction pour les tissus .



1°) Prélèver 25 mg de tissus de branchies d'huîtres que l'on place dans un tube de 1,5 ml et auquel on ajoute 180 µl de tampon ATL. Découper les tissus en petits morceaux à l'aide de ciseaux afin de faciliter leur lyse. Ajouter 20 µl de protéinase K.

2°) Vortexer, puis incubé à 56°C jusqu'à ce que tous les tissus soient lysés soit environ 3-4h d'incubation en mélangeant de temps en temps.

3°) Centrifuger brièvement les tubes puis ajouter 200 µl du tampon AL. Incuber 10 min à 70°C.

4°) Centrifuger brièvement les tubes, ajouter 200 µl d'éthanol, (96% à 100%) vortexer pendant 15 s. Centrifuger de nouveau les tubes.

5°) Transférer le tout dans une colonne de 2 ml. Fermer le bouchon et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute. Placer la colonne dans un nouveau tube. Jeter le précédent.

6°) Ajouter 500 µl de tampon AW1. Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute. Placer la colonne dans un nouveau tube. Jeter le précédent.

7°) Ajouter 500 µl de tampon AW2. Centrifuger à 14000 rpm pendant 3 minutes.

8°) Placer la colonne sur un tube de conservation. Déposer 50 µl d'eau distillée au centre de la colonne. Incuber 1 min à température ambiante. Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute.

Remarque : L'ADN est conserver à 4°C pour une utilisation courante ou à -20°C pour une utilisation ultérieure.

Figure 1' : Protocole d'extraction avec les kits QIAamp de QIAGEN®

II. Principe de la P.C.R Classique (Figure 2') :

Le milieu réactionnel doit donc contenir :

- > Les deux amorces oligonucléotidiques monobrins complémentaires chacune d'une des extrémités à amplifier.
- > Des désoxynucléotides libres dATP, dCTP, dGTP, dTTP qui vont être incorporés pour former le brin néosynthétisé.
- > L'enzyme permettant la synthèse d'un néobrin à partir des amorces ; il s'agit d'une ADN polymérase thermostable, la plus utilisée étant la Taq polymérase.
- > Un milieu favorable à l'activité de la Taq polymérase contenant en particulier du $MgCl_2$.
A ce mélange réactionnel est ajouté l'échantillon (ADN extrait) à tester. Au cours d'un cycle, l'ADN bicaténaire subit plusieurs transformations :

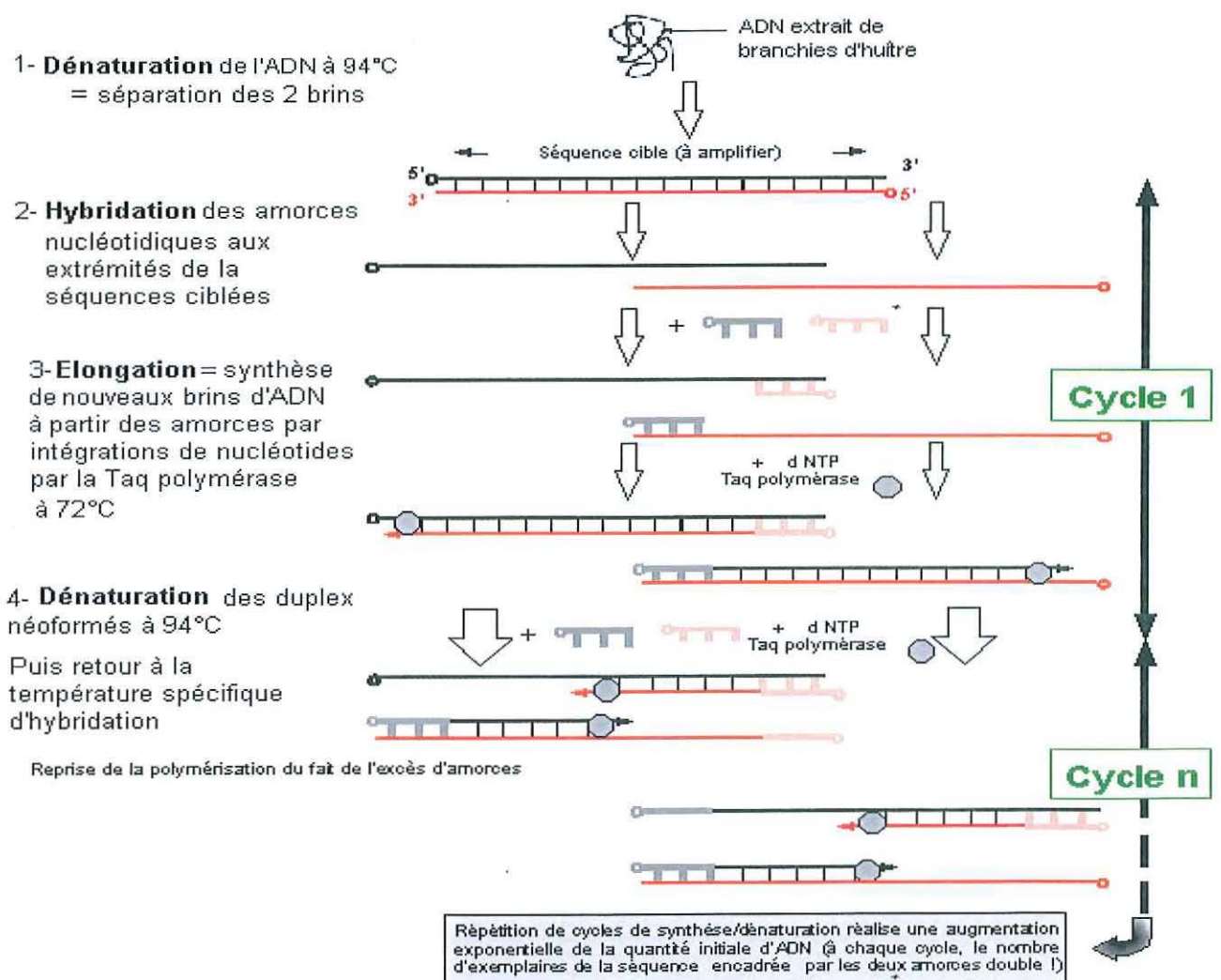


Figure 2' : Principe de la PCR-Q

III. Composition et profil thermique des différentes méthodes utilisées en PCR-Q.

méthode	Brillant :	Full Velocity
Composition du mix	Prémix Brillant : 12,5 µL	Prémix Full Velocity : 12,5 µL
	Eau : 2,5 µL	Eau : 2,5 µL
	Amorce sens : 2,5µL	Amorce sens : 2,5µL
	Amorce antisens : 2,185µL	Amorce antisens : 2,185µL
	référence dye : 0,315 µL	référence dye : 0,315 µL
Addition échantillon	5µL	5µL
Volume Final	25µL	25µL
Profil thermique	<p>Thermal Profile</p>	<p>Thermal Profile</p>

IV. Clonage dans le plasmide pCR II :

Préparation du pool réactionnel avec TOPO-TA cloning Kits :

Ligation :

. Solution saline	1 μ L
. Vecteur TOPO	1 μ L
. H ₂ O	1 μ L
. Produit de PCR frais	4 μ L

Mélanger doucement le mix contenant le produit de P.C.R

Incuber à T° ambiante pendant 5 à 30 minutes.

Le produit de ligation peut-être utilisé directement, ou conservé au congélateur à -20° C pour une utilisation ultérieure.

Transformation (Figure 3'):

- 1.) Equilibrer un bain-Marie à 42°C
- 2.) Mettre les boîtes de LB+Ampicilline (50 μ g/mL) à 37°C
- 3.) Centrifuger 10-15 s le mélange de ligation, maintenir sur glace.
- 4.) Prendre 1 tube de bactéries compétentes TOP 10 et le maintenir dans la glace
- 5.) Lui ajouter 2 μ L de produit de ligation en mélangeant délicatement.
- 6.) Laisser 30 min sur glace
- 7.) Choquer à 42°C pendant 30 sec
- 8.) Ajouter 250 μ L de SOC décongelé à température ambiante
- 9.) Incuber 1 heure à 37°C sous agitation à 350 rpm
- 10.) Pendant l'incubation étaler 40 μ L de X-Gal à 40 mg/mL sur la gélose LB+Ampicilline
- 11.) Après l'incubation étaler 100 μ L de mélange de transformation par boîte de géloses.
- 12.) Incuber 20 heures, boîtes retournées et paraffinées à 37°C.

Observation et sélection de clones : (Après 20 heures d'incubation à 37°C)

Colonies bleues : non transformé, ou segments non intégrés

Colonies blanches : bactéries transformées avec segments intégrés

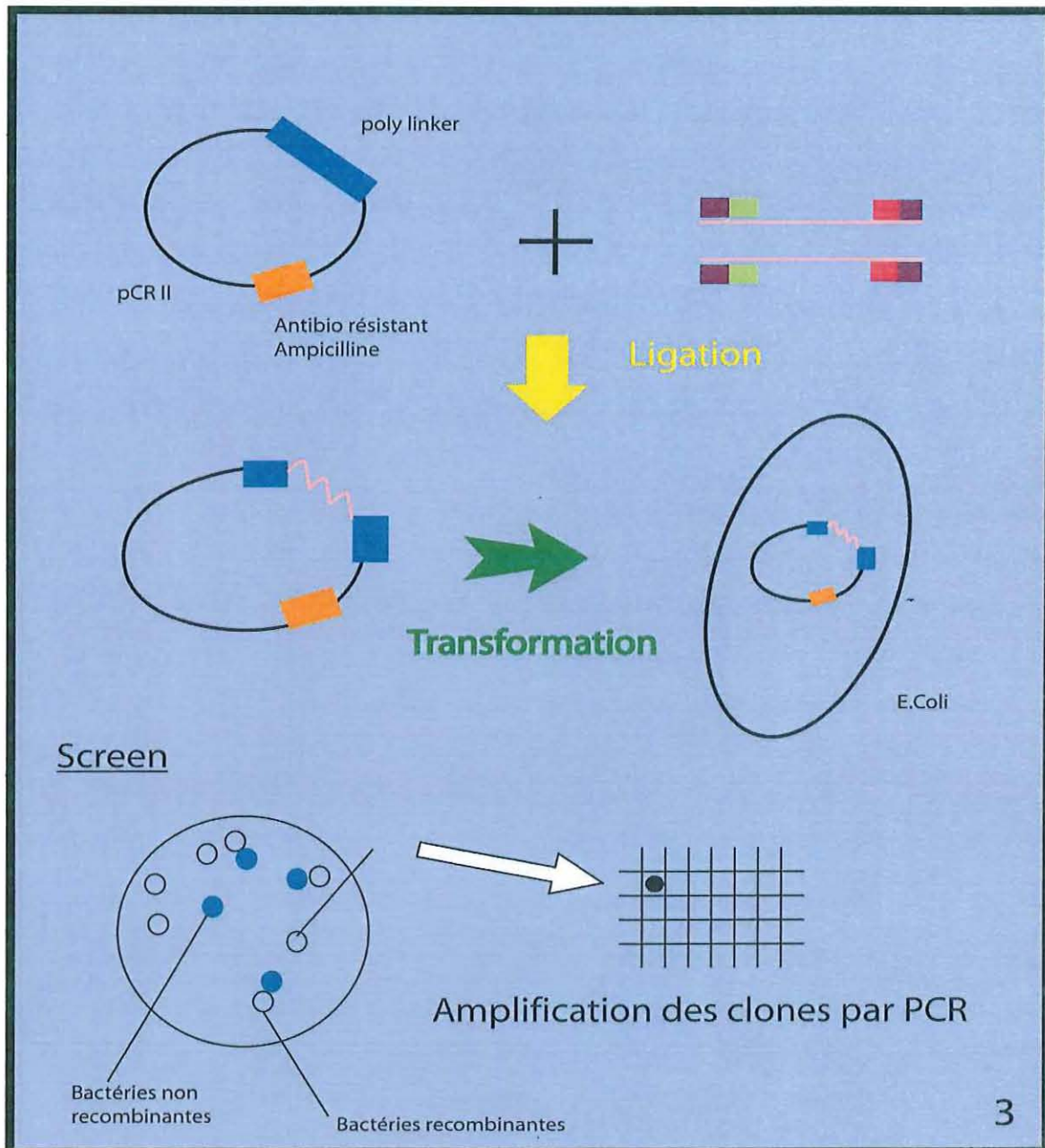


Figure 3' : Principe étape de transformation et sélection de clones.

V. Extraction d'ADN selon FastPlasmid[™] Mini (Eppendorf):

- 1.) Mettre à cultiver pendant une nuit en suspension[™] (milieu LB+ Ampicilline)
- 2.) Placer la solution de lyse dans la glace.
- 3.) Culoter 1,5 mL de culture bactérienne fraîche dans un tube de 2 mL en centrifugeant à 13.000 rpm pendant 1 min.
- 4.) Retirer le surnageant sans enlever le culot bactérien.
- 5.) Ajouter 400 µL de solution de lyse conservée sur la glace.
- 6.) Vortexer 30 secondes pour remettre en suspension le culot.
- 7.) Incuber pendant 3 min à température ambiante.
- 8.) Transférer le lysat sur la colonne « Spin Assembly ».
- 9.) Centrifuger pendant 30 sec à 16.000 rpm.
- 10.) Ajouter 400µL de solution tampon « Wash Buffer ».
- 11.) Centrifuger les colonnes pendant 30 secondes à 16.000 rpm.
- 12.) Placer les colonnes sur de nouveaux tubes.
- 13.) Centrifuger pendant 1 min à 16.000 rpm.
- 14.) Transférer les colonnes dans un tube de conservation.
- 15.) Ajouter 50µL de tampon d'élué directement sur le centre de la colonne.
- 16.) Centrifuger pendant 30 sec à 16.000 rpm.
- 17.) Jeter la colonne.
- 18.) L'ADN élué peut-être directement utilisé ou conservé à -20°C.