

Découvrez un ensemble de documents, scientifiques ou techniques,  
dans la base Archimer : <http://www.ifremer.fr/docelec/>



**ifremer**

**Yohann DIDIER**  
RAPPORT DE STAGE (avril -juin 2000)

---

Apoptose et infections à virus de type  
herpès chez les bivalves marins : détection  
de séquences codant pour des protéines  
inhibitrices de l'apoptose

▪



## Remerciements

Je tiens à adresser mes remerciements à Monsieur André Gérard et Monsieur Tristan Renault pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade, et en particulier Monsieur Renault pour son enseignement et son soutien, ainsi qu'à Mademoiselle Isabelle Arzul pour m'avoir suivi, soutenu et guidé durant tout mon stage. Je la remercie aussi pour sa gentillesse et sa bonne humeur. Je remercie aussi Monsieur Stéphane Deniau.

Mes remerciements s'adressent aussi à l'ensemble de l'équipe travaillant à la station de La Tremblade pour leur accueil, leur bonne humeur, ainsi qu'à tous les stagiaires que j'ai pu rencontrer.

# SOMMAIRE

<b>I INTRODUCTION</b>	<b>2</b>
<b>II MATERIEL ET METHODES</b>	<b>4</b>
II.1 Matériels Biologique : Les échantillons	4
II.2 Principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR)	6
II.2.1 Le gène étudié et les amorces utilisées	6
II.2.2 Description du principe général de PCR	7
II.2.3 Mise en œuvre de la réaction de PCR pour la détection d'ADN viral de type herpès infectant les bivalves marins	9
II.3 Méthode PCR-RFLP	11
II.3.1 Principe de la méthode	11
II.3.2 Application à l'analyse du gène IA	11
II.4 Méthode SOUTHERN BLOT	13
II.5 Hybridation <i>in situ</i>	14
II.6 Clonage-Séquençage	15
<b>III RESULTATS</b>	<b>16</b>
III.1 Analyse du gène IA par PCR et RFLP	16
III.1.1 Analyses par PCR	16
III.1.2 Analyses par RFLP	20
III.2 Clonage et séquençage	22
III.2.1 Le clonage	22
III.2.2 Le séquençage	24
III.3 Hybridation <i>in situ</i>	24
III.3.1 Préparation de la sonde	24
III.3.2 Résultats de l'hybridation <i>in situ</i>	25
<b>IV DISCUSSION</b>	<b>26</b>
<b>V CONCLUSION</b>	<b>29</b>
<b>VI BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>30</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>32</b>

# Introduction

## I INTRODUCTION

Des infections virales impliquant des virus de type herpès ont été décrites chez plusieurs espèces de mollusque bivalve d'intérêt économique dans différentes régions du globe. Les examens réalisés en microscopie électronique à transmission d'échantillons de larves présentant des mortalités, ont permis de détecter la présence de particules virales associées à des lésions cellulaires importantes. La morphologie, la taille, la localisation intranucléaire et cytoplasmique des virus détectés sont identiques à celles des herpesvirus. La présence du virus est très généralement associée à des mortalités massives de larves ou de juvéniles. La reproduction expérimentale des mortalités sur individus sains à partir de matériel biologique infecté (Le Deuff *et al.*, 1994) a permis de démontrer le pouvoir pathogène effectif de ce virus pour les larves.

Le premier cas d'infection à virus de type herpès chez les bivalves marins a été rapporté en 1972 aux Etats-Unis chez des adultes d'huître américaine, *Crassostrea virginica* (Farley *et al.*, 1972). Depuis 1991, d'importantes mortalités de larves et de juvéniles d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, (Nicolas *et al.*, 1992 ; Renault *et al.*, 1994) et d'huître plate, *Ostrea edulis* (Comps et Cochenec, 1993) ont été observées en France en période estivale. Des mortalités concomitantes ont été rapportées pour des larves et des lots de naissain chez les deux espèces *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*, élevées dans les mêmes installations avec détection chez ces deux espèces d'un virus de type herpès (Renault, communication personnelle). En Nouvelle-Zélande un virus similaire a également été décrit chez des larves des espèces *Crassostrea gigas* et *Tiostrea chilensis* (Hine *et al.*, 1992 ; Hine *et al.*, 1998). De plus, des particules virales de type herpès ont été observées dans des hémocytes d'huître adulte de l'espèce *Ostrea angasi* en Australie (Hine et Thorne, 1997). En 1997 et en 1998, des analyses de larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* et de larves de palourde européenne, *R. decussatus* présentant de fortes mortalités et provenant d'une éclosure privée française ont également permis de mettre en évidence un virus de type herpès (Renault, communication personnelle).

Aussi, des virus de type herpès sont fortement représentés parmi les bivalves marins dans de nombreuses régions du monde. De plus, ces infections sont un frein économique important pour la conchyliculture, contribuant ainsi au développement de travaux de recherche au sein de laboratoires spécialisés.

Dans la mesure où les infections à virus de type herpès touchent de nombreuses espèces de bivalves marins, il est possible de se poser la question suivante : un seul et même virus est-il capable d'infecter différentes espèces ou différentes souches virales infectent-elles des hôtes différents ? En effet, l'existence ou non d'une diversité au sein des virus de type herpès infectant les bivalves marins, conditionne le diagnostic de l'infection, mais aussi les techniques d'élevage et les transferts des animaux.

La diversité potentielle au sein des virus de type herpès, est ainsi étudiée au Laboratoire de Génétique et Pathologie (IFREMER, station La Tremblade, Charente Maritime). Cette étude s'appuie d'une part sur l'utilisation d'outils moléculaires (Polymerase Chain Reaction : PCR, Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) et d'autre part sur la réalisation d'essais de transmission interspécifique de l'infection.

Mon travail s'inscrit dans l'étude de la diversité du génome viral. Il a porté plus particulièrement sur un gène nommé IA (inhibiteur d'apoptose) codant pour une protéine possédant des analogies avec des protéines inhibitrices de l'apoptose. Une série de 41 échantillons a été analysée en PCR et RFLP. Nous avons également cloné une partie de ce gène pour certains échantillons afin de les séquencer. L'intérêt d'un tel travail est de mettre en

avant l'existence ou non d'une diversité chez différentes espèces, mais aussi d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de défense des mollusques bivalves marins.

En ce qui concerne le séquençage du génome viral, celui-ci a été réalisé à partir d'ADN extrait de virus purifiés d'un lot de larves infectées d'huître creuse *Crassostrea gigas* (Le Deuff et Renault, 1999). Ce travail a été effectué par A. Davison (Medical Research Council Virology Unit, Glasgow, Royaume-Uni) dans le cadre d'un programme européen et a permis de définir un certain nombre de gènes d'intérêts pour la diversité. Parmi ceux-ci plusieurs gènes (5 ou 6) qui codent pour des protéines présentant des homologies avec des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) ainsi qu'un gène codant pour une glycoprotéine putative. Les glycoprotéines jouent, de façon générale, un rôle important dans l'infectiosité des virus puisqu'elles leur sont nécessaires pour entrer mais aussi pour sortir de la cellule hôte. De ce fait, elles sont susceptibles de présenter une certaine diversité selon l'hôte voire selon le type de cellule.

L'apoptose a déjà été décrit chez de nombreux êtres vivants. L'apoptose ou mort cellulaire programmée (MCP) est un phénomène que l'on retrouve chez les vertébrés et les invertébrés. Ce phénomène a été mis en évidence pour la première fois chez le nématode *Caenorabditis elegans* (Ellis et Horvitz, 1986). Chez l'huître, le phénomène est suspecté sur la base d'observations ultrastructurales et d'observations de fragmentation de l'ADN (Renault, 1998).

La MCP doit être différenciée de la nécrose. En effet, on retrouve des cellules apoptotiques isolées dans un tissu alors qu'on ne retrouve jamais une cellule nécrosée isolée. La nécrose touche un ensemble de cellules d'un même tissu. Mais, c'est surtout les modifications cellulaires observées qui permettent de différencier ces deux types de mort cellulaire. Contrairement à la nécrose, l'apoptose n'est pas associée à une perte d'intégrité de la membrane (premier phénomène observé lors de la nécrose).

L'apoptose peut être considérée comme un phénomène physiologique régulateur qui permet de conserver l'équilibre cellulaire d'un tissu. Celle-ci apparaît comme étant une forme de défense de l'hôte car elle empêche la dissémination d'agents infectieux (Vaux *et al.*, 1994), tels que les virus. De plus, des anomalies de ce mécanisme pourraient favoriser la prolifération cancéreuse (Kerr *et al.*, 1972 ; Wyllie, 1992). L'apoptose participe donc à la préservation de l'intégrité de l'organisme.

On peut diviser le phénomène de MCP en trois phases (Feldman, 1995) : la première serait caractérisée par l'apparition d'altérations nucléaires et cytoplasmiques, une condensation de la chromatine, une condensation et une désorganisation des organites. La seconde serait marquée par un crénelage de la membrane nucléaire, étape préliminaire à une fragmentation nucléaire et cytoplasmique (Wyllie *et al.*, 1980 ; Arends et Wyllie, 1991), associée à l'apparition des "corps apoptotiques" (fragments cellulaires libérés) phagocytés par des macrophages ou les cellules voisines (Kerr *et al.*, 1972). Enfin, la dernière phase est marquée par la dégradation de ces corps apoptotiques. Cette dégradation n'engendre aucune réaction inflammatoire (Kerr *et al.*, 1972) ce qui distingue à nouveau l'apoptose de la nécrose.

Le mécanisme d'apoptose est régulé au niveau cellulaire. En effet, le génome d'une cellule possède des gènes qui codent pour des protéines activatrices et inhibitrices de l'apoptose. Ces deux types de molécules sont en équilibre et déterminent ainsi la survie ou la mort de la cellule. Pour qu'une cellule soit viable, il faut donc qu'elle possède ces gènes codant pour des protéines inhibitrices de l'apoptose. La présence de ces gènes n'est qu'hypothétique chez les mollusques bivalves. Cependant, la présence de gènes codant pour des protéines homologues d'IAP au sein du génome de virus de type herpès laisse suspecter l'existence d'un tel processus chez les bivalves marins.

Matériels

et

Méthodes

## II MATERIEL ET METHODES

### II.1 Matériel Biologique : les échantillons

De nombreux échantillons de larves, de naissain et d'adultes de différentes espèces de bivalve marin et de différentes origines géographiques ont été analysés en PCR. Plusieurs couples d'amorces amplifiant différentes régions du génome viral ont été utilisés pour ces analyses. Quarante et un échantillons, ayant donné des résultats positifs ont été sélectionnés pour notre étude du gène IA (cf tableau I). Ce gène code pour une protéine présentant des homologies avec des inhibiteurs de l'apoptose.

Le traitement des échantillons varie selon le stade de développement de l'animal. A chaque stade correspond un protocole particulier :

❖ Les larves (de l'éclosion jusqu'aux environs de la troisième semaine, qui correspond à la fixation de l'animal) sont broyées en tube Eppendorf à l'aide d'un piston Pellet à usage unique. Le broyat est réalisé en eau bidistillée (X µl pour X mg de larves).

❖ Le naissain (entre 3 semaines et 18 mois) :

- lorsqu'il est de taille inférieure à 3 mm, il est réuni par lot de 5 individus dans des tubes Eppendorf, il est alors pesé (X g), puis broyé en présence d'eau bidistillée (2X ml) à l'aide d'un piston Pellet à usage unique.

- lorsqu'il est de taille supérieure à 3 mm, il est ouvert, séché, réuni par lot de 5 individus dans un sac Minigrip, puis dilacéré à l'aide d'un marteau. Environ 0,5 g du broyat ainsi obtenu est transvasé dans un tube Eppendorf après section d'un angle du sac. 1 ml d'eau bidistillée est ajouté. L'ensemble est mélangé à l'aide du Vortex.

Les broyats obtenus (larves ou naissain) sont ensuite placés au bain-marie pendant 10 minutes, puis centrifugés (10000 tours pendant 5 minutes à 4°C). Les surnageants recueillis sont immédiatement dilués au dixième en eau bidistillée et placés au congélateur à -20°C.

❖ Les adultes (>24 mois) sont ouverts. 50 mg de tissus sont prélevés et déposés dans 500 µl de tampon de digestion additionné en protéinase K. La digestion se fait à 55°C toute une nuit puis, l'ADN total (huître et virus) est obtenu par extraction au phénol-chloroforme.

Date	Ecloserie	Espèce	Stade	Numéro d'échantillon attribué	Série
08/07/1995	1	<i>C. gigas</i>	larves	1	1 <sup>ère</sup> Série
10/07/1995	1	<i>C. gigas</i>	larves	2	
25/07/1995	1	<i>C. gigas</i>	larves	3	
24/08/1995	1	<i>C. gigas</i>	larves	4	
01/04/1997	2	<i>C. gigas</i>	larves	5	
28/04/1997	3	<i>O. edulis</i>	larves	6	
28/04/1997	3	<i>O. edulis</i>	larves	7	
28/04/1997	3	<i>O. edulis</i>	larves	8	
juin-97	3	<i>C. gigas</i>	larves	9	
juin-97	3	<i>C. gigas</i>	larves	10	
juin-97	3	<i>C. gigas</i>	larves	11	
juin-97	3	<i>R. philippinarum</i>	larves	12	
juin-97	3	<i>R. philippinarum</i>	larves	13	
juin-97	3	<i>R. philippinarum</i>	larves	14	
07/06/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	15	
07/06/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	16	
07/06/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	17	
07/06/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	18	
07/06/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	19	
27/08/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	1	2 <sup>ème</sup> Série
27/08/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	2	
27/08/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	3	
23/09/1998	3	<i>C. gigas</i>	larves	4	
23/09/1998	3	<i>C. gigas</i>	larves	5	
30/09/1998	3	<i>R. decussatus</i>	larves	6	
30/09/1998	3	<i>R. decussatus</i>	larves	7	
30/09/1998	3	<i>R. decussatus</i>	larves	8	
30/09/1998	3	<i>R. decussatus</i>	larves	9	
09/06/1999	2	<i>C. gigas</i> 3n	larves	10	
17/06/1999	2	<i>C. gigas</i>	naissain	11	
17/06/1999	2	<i>C. gigas</i>	naissain	12	
17/06/1999	2	<i>C. gigas</i>	naissain	13	
17/06/1999	2	<i>C. gigas</i>	naissain	14	
27/06/1999	1	<i>O. edulis</i>	larves	15	
02/09/1999	3	<i>C. gigas</i>	larves	16	
06/12/1999	4	<i>C. gigas</i>	adulte	17	
08/02/2000	5	<i>C. gigas</i>	adulte	18	
13/03/2000	5	<i>C. gigas</i>	adulte	19	
17/03/2000	1	<i>C. gigas</i>	larves	20	
11/04/2000	2	<i>O. edulis</i>	larves	21	
11/04/2000	2	<i>O. edulis</i>	larves	22	

Tableau 1 : Présentation des échantillons analysés

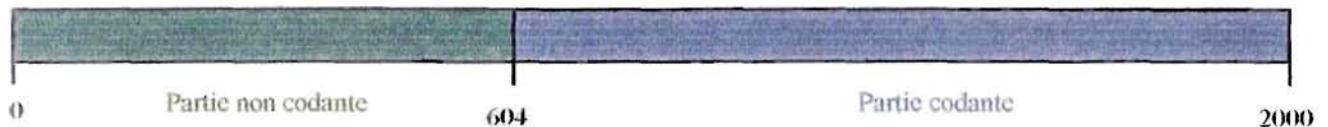
## II.2 Principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR)

La technique de PCR, mise au point en 1985 par Saiki (Saiki *et al.*, 1988), est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un segment d'acide nucléique situé entre deux séquences connues. Cette technique est largement utilisée et repose, notamment, sur l'utilisation d'amorces spécifiques du segment à amplifier et d'une ADN polymérase thermorésistante : la Taq polymérase, une enzyme issue de bactéries thermophiles vivant dans des sources d'eau chaude : *Thermus aquaticus* par exemple.

### II.2.1 Le gène étudié et les amorces utilisées

Le gène nommé IA est un gène de 2000 nucléotides qui comprend deux parties :

- une partie non codante de 604 nucléotides,
- une partie codante de 1396 nucléotides.



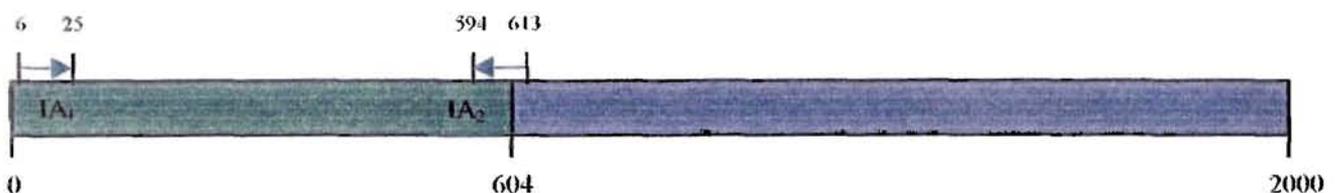
Les amorces utilisées (IA<sub>1</sub>, IA<sub>2</sub>, IA<sub>3</sub> et IA<sub>6</sub>) ont été dessinées via des systèmes informatiques disponibles sur internet (ex : [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www\\_results.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www_results.cgi)). Plusieurs paramètres doivent être précisés afin d'obtenir des séquences spécifiques de la région que nous voulons amplifier. Les paramètres que l'on peut modifier sont :

- ❖ la taille de l'oligonucléotide (entre 18 et 26 nucléotides), le pourcentage de bases GC (on choisit environ 50%),
- ❖ la température d'hybridation T<sub>m</sub> (en rapport avec le pourcentage de GC),
- ❖ la valeur représentant la capacité des amorces à s'hybrider entre elles (échelle de 0 à 6),
- ❖ la valeur représentant la capacité de l'amorce à se retourner et à s'hybrider sur elle-même (échelle de 0 à 6).

Le programme nous propose plusieurs couples d'amorces ; les séquences nucléotidiques retenues sont commandées chez des fournisseurs, EUROGENTEC ou OLIGO EXPRESS, qui les synthétisent (cf. annexes 1).

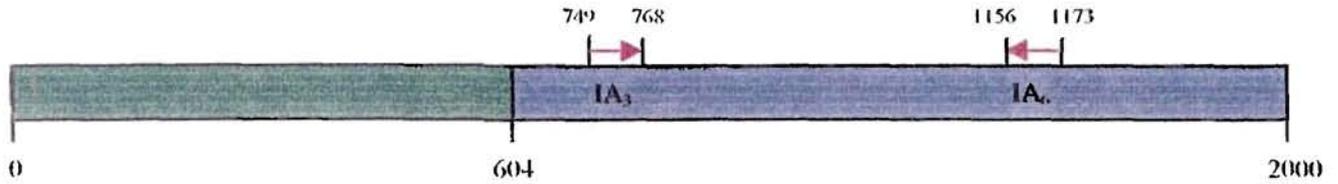
Les positions des couples d'amorces choisis sont les suivants :

- pour le couple IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> amplifiant la partie non codante :



La région amplifiée est donc de 608 paires de bases.

- pour le couple IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> amplifiant la partie codante :

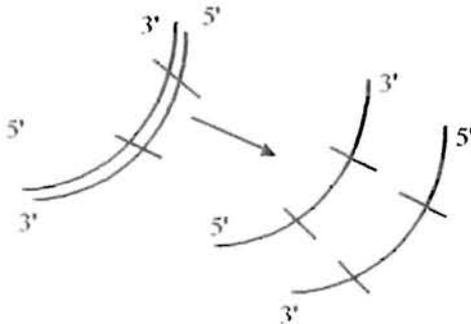


La région amplifiée est donc de 424 paires de bases.

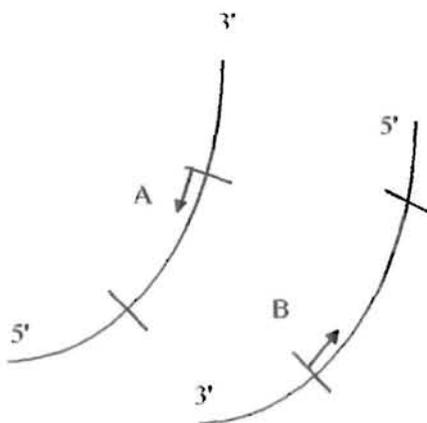
Les 2 amorces de chaque couple sont représentées sur le même brin pour simplifier le schéma. En réalité, les amorces sont orientées de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' et donc, chacune d'elles s'hybride sur l'un des 2 brins.

### II.2.2 Description du principe général de PCR

L'amplification de l'ADN par le biais de la PCR comprend trois étapes :



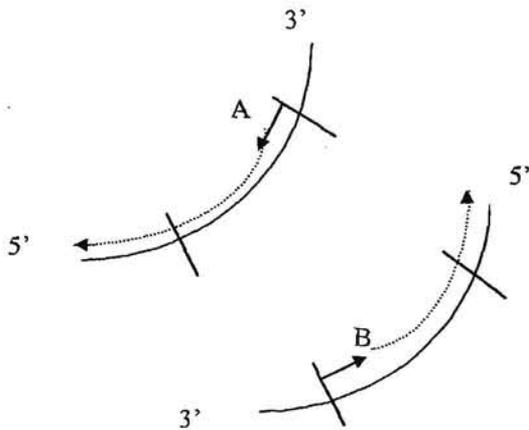
La première étape ou étape de **dénaturation** est réalisée à 94 °C. Sous l'effet de la température, les deux brins constituant l'ADN double brin sont séparés. On obtient alors de l'ADN simple brin qui servira de matrice pour l'amplification ultérieure et sur lequel les amorces spécifiques peuvent se fixer.



La deuxième étape ou étape d'**hybridation** est réalisée à la température choisie. Le choix de la température se fait selon une formule empirique :  $T_m$  (°C) - 5°C avec  $T_m = \%GC$ . A cette température, les amorces qui servent de point 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. 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 matrices entre eux.

Les amorces sont des oligonucléotides de synthèse, de séquence définie (18 à

35 nucléotides ou mers). La température d'hybridation est déterminée par la séquence des amorces.



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

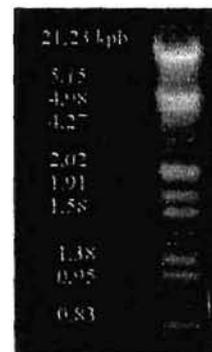
Le cycle décrit précédemment peut être répété une trentaine de fois sans qu'il soit nécessaire de modifier ou d'intervenir sur le mélange réactionnel. Au-delà, l'enzyme (la Taq polymérase) est trop dénaturée pour être encore efficace.

L'ADN amplifié est ensuite visualisé par électrophorèse sur un gel d'agarose additionné de BET (bromure d'éthyldium). Le BET est un agent intercalant c'est-à-dire qu'il peut s'intégrer entre les bases de l'ADN. Il prend une coloration violet-fluorescent sous UV ce qui permet alors de visualiser l'ADN amplifié. Si les produits d'amplification sont en quantité suffisante, ils apparaissent sous la forme d'une bande violet-fluorescent. Pour déterminer la taille des produits d'amplification, un marqueur de poids moléculaire est également déposé (cf. photo 1 et 2).

Marqueur 100



Marqueur MT2



**Photo 1 et 2 : Présentation des marqueurs de poids moléculaire utilisés**

### II.2.3 Mise en oeuvre de la réaction de PCR pour la détection d'ADN viral de type herpes infectant les bivalves marins

Un protocole de PCR a été mis au point au laboratoire IFREMER pour détecter l'ADN du virus de type herpes infectant les bivalves marins (T. Renault *et al.*, 2000, sous presse).

Le mélange réactionnel de la PCR est composé, pour un tube :

- de 31,5 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> = H<sub>2</sub>O bidistillée),
- de 5 µl de tampon de réaction 10X,
- de 5 µl de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>),
- de 5 µl d'une solution de dNTP contenant les quatre nucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dGTP et dCTP) nécessaires à la polymérisation de l'ADN,
- de 1 µl de chaque amorce A et B,
- de 0,5 µl de polymérase thermorésistante ou Taq polymérase.

A ces 49 µl de mélange réactionnel, 1 µl d'échantillon est ajouté.

A chaque analyse, trois témoins négatifs (A, B, C) et deux témoins positifs (T+ et T++) sont incorporés.

Les témoins négatifs correspondent à :

- ❖ 49 µl de mélange réactionnel
- ❖ 1 µl d'eau bidistillée.

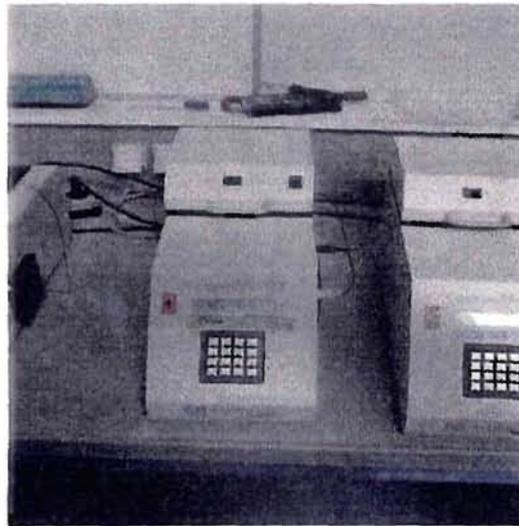
Ils permettent de détecter d'éventuelles contaminations des réactifs ou de la zone de travail au cours des manipulations.

Les témoins positifs correspondent à :

- ❖ 49 µl de mélange réactionnel
- ❖ 1 µl d'ADN extrait de virus purifié à raison de 10 ng/ml pour l'un (T++) et de 0,5 pg/ml pour l'autre (T+).

Les témoins positifs permettent de vérifier l'efficacité du milieu réactionnel et la qualité de la réaction de PCR.

L'amplification des séquences cibles se fait sur 35 cycles (1 cycle = 1 min à 94°C, 1 min à 50°C et 1 min à 72°C) dans un thermocycleur Crocodile III (Appligene Oncor)(cf. photo 3 et 4).



**Photo 3 et 4 : Le thermocycleur Crocodile III (Appligen Oncor)**

Enfin, les produits d'amplification sont analysés par **électrophorèse en gel d'agarose** à 1% additionné en BET (0,5 µg/ml).

## II.3 Méthode PCR-RFLP

### II.3.1 Principe de la méthode

Cette technique permet de mettre en évidence :

- ❖ des substitutions dans l'ADN viral qui seront caractérisées, par exemple, par la disparition d'un site de restriction sans perte de poids moléculaire,
- ❖ des délétions ou additions qui peuvent être caractérisées par l'apparition ou disparition d'un ou plusieurs site(s) de restriction et/ou une modification du poids moléculaire des fragments digérés.

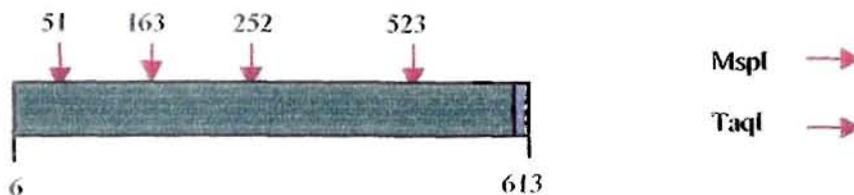
L'analyse par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) est largement utilisée pour le typage des virus et pour explorer l'hétérogénéité de séquence qui peut exister entre différents variants.

Dans notre étude, la méthode RFLP est appliquée sur des produits de PCR car la quantité d'ADN viral présent dans les échantillons serait insuffisante pour être visualisée sous UV après digestion, sans amplification préalable.

### II.3.2 Application à l'analyse du gène IA

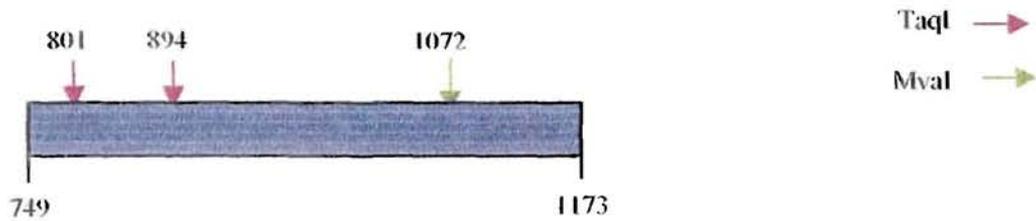
Des logiciels informatiques, disponibles sur Internet (ex : [http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/carteres\\_out.pl](http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/carteres_out.pl)) permettent d'analyser des séquences connues et de déterminer la carte de restriction de ces fragments. On obtient ainsi les différents sites de coupure d'endonucléases (ou enzymes de restriction) présents sur le fragment d'intérêt et les produits de digestion obtenus. Dans notre étude, nous avons digéré les produits de PCR amplifiés par les couples d'amorces IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> et IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> par, respectivement, les enzymes MspI, TaqI et MvaI, TaqI. Les produits de digestion attendus ont été repris sur la figure 1

- partie non codante amplifiée par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub>



Enzymes	TaqI	MspI
Fragments générés	51, 201 et 356	163, 360 et 85

- partie codante amplifiée par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub>



Enzymes	TaqI	MvaI
Fragments générés	52, 93 et 279	323 et 101

**Figure 1 : Représentation schématique des différents sites de restriction et de la taille des fragments générés.**

Les volumes de solution, pour un tube, sont :

- 10 µl de produits de PCR
- 2 µl de tampon spécifique de chaque enzyme
- 0,5 µl d'enzyme
- 7,5 µl d'H<sub>2</sub>O (eau bidistillée)

Les conditions de digestion (température et temps de digestion) sont spécifiques à chaque enzyme (cf. annexe 2).

## II.4 Méthode SOUTHERN BLOT

Le principe général de la méthode de l'hybridation moléculaire repose essentiellement sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des acides nucléiques et, en particulier sur la spécificité de la formation de la structure double brin. Ainsi, une séquence nucléotidique définie peut être utilisée pour identifier un virus avec une très grande spécificité. Toutefois cette spécificité peut varier en fonction des conditions de "stringence" (conditions de température et de force ionique) de la réaction d'hybridation. Plus les conditions sont strictes, donc plus la "stringence" est élevée, et plus la spécificité de la réaction est privilégiée. Lorsque les conditions sont optimales, il est possible de distinguer des séquences qui ne diffèrent que par une base (Richman *et al.*, 1991).

Ainsi, l'utilisation de sondes préalablement marquées permet de prospecter des fragments du génome viral. L'hybridation moléculaire permet également de confirmer ou non la spécificité de fragments obtenus en PCR, c'est le cas de la technique de Southern Blot (Southern, 1975).

Mise au point en 1975 par Southern, cette technique permet de vérifier la spécificité des produits de PCR et de PCR-RFLP obtenus. Elle consiste dans un premier temps à effectuer un transfert d'ADN contenu dans un gel d'agarose après migration vers une membrane de nylon. Cette membrane est destinée à être hybridée par une sonde spécifique et marquée (dans notre cas, à la digoxigénine). L'hybridation de la sonde pourra être révélée par la fixation d'un anticorps primaire de souris (IgG) qui reconnaît spécifiquement la digoxigénine, puis, par la fixation d'un anticorps secondaire de lapin (anti IgG) qui reconnaît spécifiquement les IgG de souris. Ce dernier est couplé à une peroxydase, qui, en présence d'un substrat chromogène donnera une coloration brune rendant visible les produits de PCR et de digestion s'il y a hybridation (cf. annexe 3).

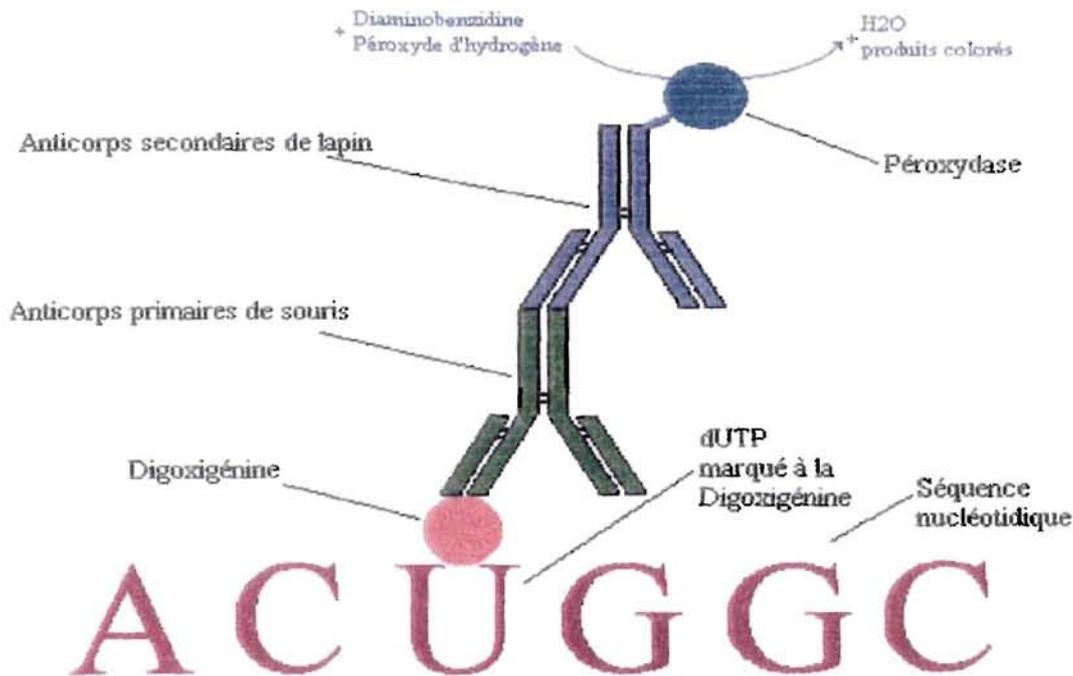


Figure 2 : Schéma général de la réaction de révélation de l'hybridation de la sonde par la méthode Southern blot (Southern, 1975).

## II.5 Hybridation *In Situ*

La technique d'hybridation *in situ* repose sur le même principe concernant les propriétés physico-chimiques de l'ADN, décrit précédemment (II.4). Elle est caractérisée par l'utilisation de sondes marquées spécifiques (Gall et Pardue, 1969). Son originalité est d'hybrider directement la sonde avec les acides nucléiques dans les tissus infectés. L'intégrité cellulaire étant conservée, cette technique permet donc de détecter l'agent infectieux mais aussi de le situer. L'utilisation de sondes spécifiques du génome viral peut aussi être appliquée à la détection, voire l'identification de variants. (protocole : cf. annexe 4).

La technique est réalisée sur des coupes histologiques (protocole : cf. annexe 5).

Pour cela, les animaux sont fixés en Davidson, puis, inclus en paraffine. Des coupes de 7 µm d'épaisseur sont déposées sur des lames silanisées. Celles-ci permettent une meilleure conservation des tissus ou des coupes tout au long des différentes étapes de la technique d'hybridation *in situ*.

Les lames sont mises au contact de la sonde spécifique marquée à la digoxigénine. L'hybridation de la sonde est ensuite révélée par la fixation d'un anticorps (IgG anti digoxigénine de mouton) couplé à la phosphatase alcaline.

En présence d'un substrat chromogène (NBT/BCIP), on peut observer une coloration bleue des cellules infectées après contre coloration des lames au jaune de Bismark. Le protocole est repris plus en détail dans l'annexe 6.

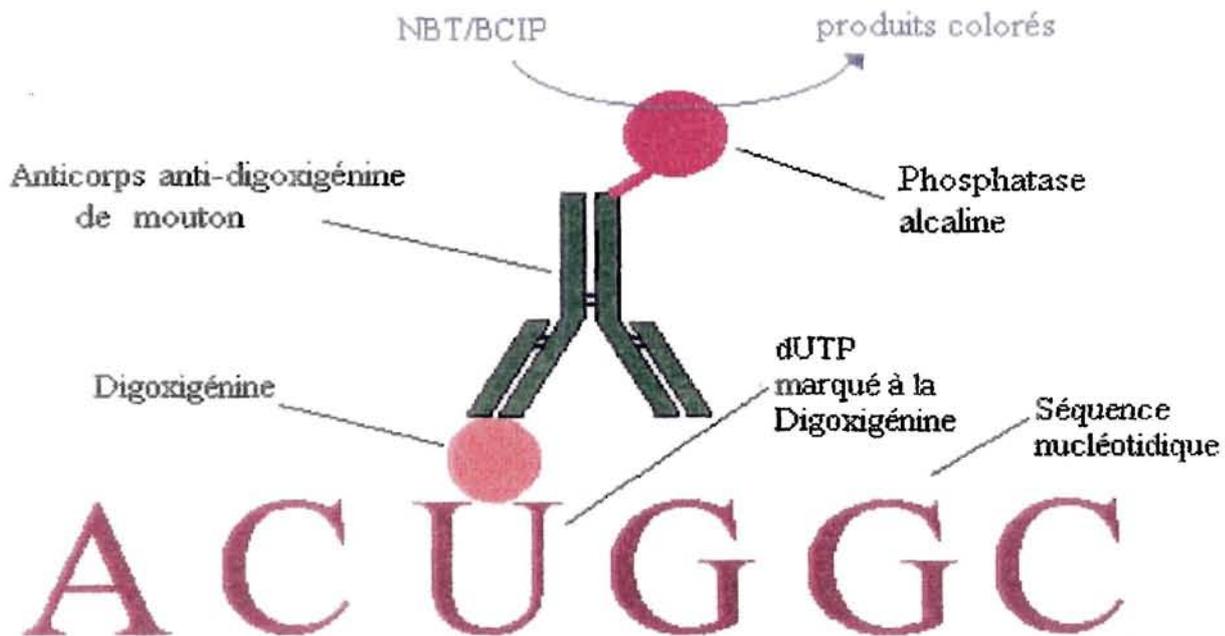


Figure 3 : Schéma général de la réaction de révélation de l'hybridation de la sonde en hybridation *in situ*.

## II.6 Clonage-séquençage

Le séquençage de l'ADN, qui consiste à déterminer l'enchaînement des nucléotides qui le constituent, est le moyen absolu de déterminer l'existence et la nature d'une mutation. En effet, les techniques de PCR et de PCR-RFLP ne nous permettent pas de différencier des ADN à la base près. Le clonage des produits à séquençer est préférable dans la mesure où il permet d'obtenir un ADN homogène de grande quantité.

Nous avons donc procédé au clonage des produits de PCR en obtenus avec les couples d'amorces IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> et IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub>, en suivant les instructions du fournisseur du kit utilisé (Invitrogen, Pays Bas) (cf. annexe 7).

Les fragments amplifiés par les couples d'amorces utilisés sont insérés dans un vecteur plasmidique (pCR<sup>®</sup> 2.1) puis, clonés par transformation de bactéries compétentes *E. coli* INVαF<sup>+</sup>.

L'ADN plasmidique est ensuite obtenu par extraction au phénol-chloroforme. Une fois extrait, l'ADN plasmidique est expédié à une société qui procède alors au séquençage des fragments insérés selon la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) en utilisant des amorces spécifiques du plasmide.

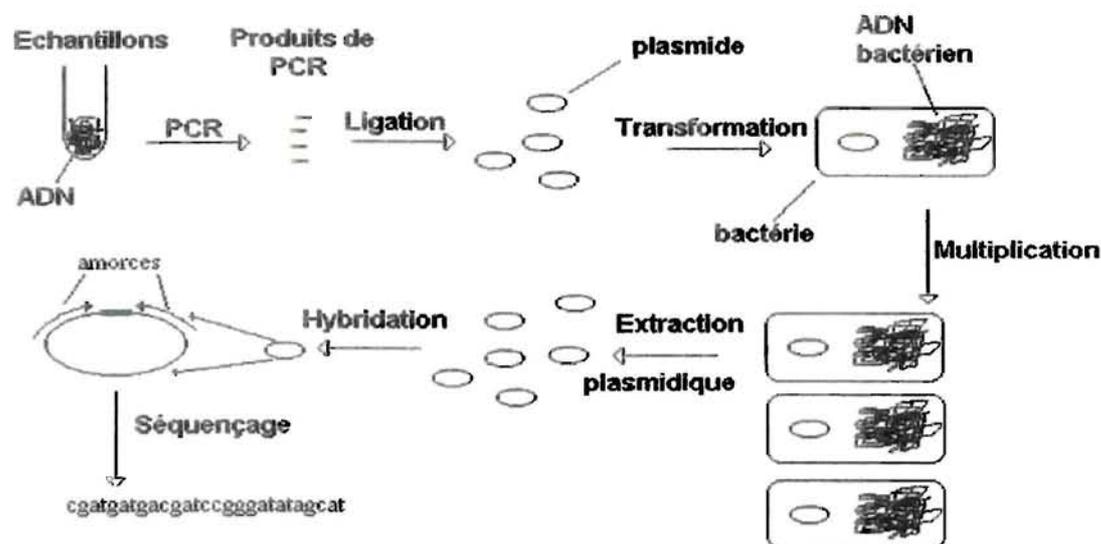


Figure 4 : représentation schématique du clonage et du séquençage.

Résultats

### III RESULTATS

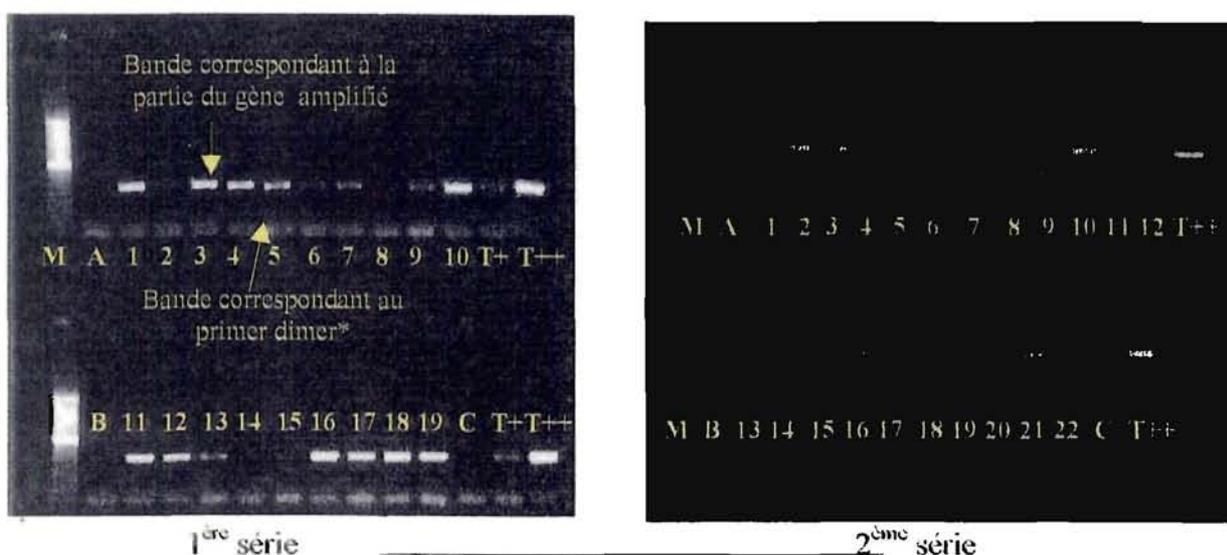
#### III.1 Analyse du gène IA par PCR et RFLP

41 échantillons, présentés en II.1, ont été analysés :

- en PCR en utilisant les couples d'amorces IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> et IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub>,
- en RFLP en digérant les produits de PCR obtenus par différentes enzymes (II.3.2).

##### III.1.1 Analyses par PCR

###### ❖ Echantillons analysés en PCR avec le couple d'amorces IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub>



M = Marqueur 100 (II.2.2)  
A, B et C = Témoins négatifs  
T+ et T++ = Témoins positifs  
\* primer dimer : cette bande correspond à l'appariement des amorces non hybridées.

**Photo 5 et 6 : Echantillons de la première et deuxième série amplifiés par les amorces IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> visualisés en gel d'agarose 1% additionné en BET, sous UV.**

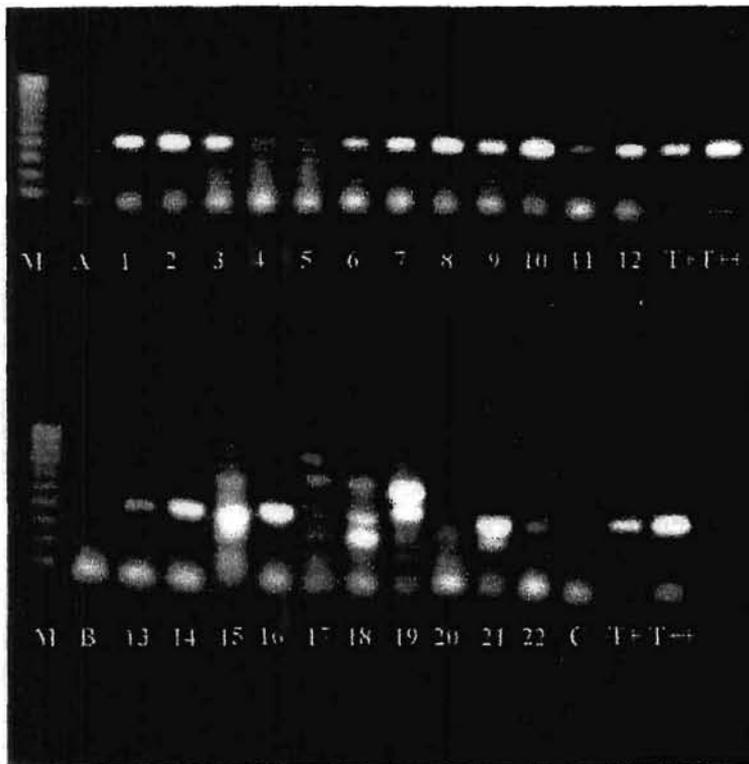
- Les témoins positifs présentent bien une bande à la taille attendue, c'est à dire de 604 paires de base. Pour les témoins négatifs aucune amplification n'est observable.
- Pour 18 échantillons de la première série, une bande de la taille attendue, donc identique à celle des témoins positifs, est observable en gel d'agarose à 1%. Une différence d'intensité est à noter entre les différents échantillons. L'échantillon 8 n'exprime pas de bande sur la photo 5 mais, la visualisation directe sous UV nous permet de confirmer sa présence (très faible intensité).
- Pour 15 échantillons de la deuxième série une bande de la taille attendue, c'est-à-dire identique à celle des témoins positifs est observable. Cependant, quelques échantillons apparaissent négatifs (6,15,20 et 22), la bande attendue n'est donc pas présente. D'autres présentent une bande de taille inférieure à celle attendue (17,18 et 19). Une différence d'intensité est aussi à noter entre les échantillons.

❖ Echantillons analysés en PCR avec le couple d'amorces IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub>



1<sup>ère</sup> série

M = Marqueur 100 (II.2.2)  
A, B et C = Témoins négatifs  
T+ et T++ = Témoins positifs



2<sup>ème</sup> série

**Photos 7 et 8 : Echantillons de la première et deuxième séries amplifiés par les amorces IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> visualisés en gel d'agarose 1% additionné en BET, sous UV.**

- Les témoins positifs expriment une bande à la taille attendue, c'est-à-dire 424 paires de bases. Les témoins négatifs n'en présentent aucune.
- Pour les échantillons de la première série, une bande à la taille attendue est observée, c'est-à-dire identique à celle des témoins positifs. Les bandes sont dans l'ensemble assez intenses. Seuls 2 échantillons (8 et 15) révèlent une bande de faible

intensité. L'échantillon 13 présente 2 bandes : celle de la taille attendue et une de taille légèrement supérieure.

▪ En ce qui concerne la 2<sup>ème</sup> série, l'ensemble des échantillons donne une bande de taille attendue, mis à part les échantillons 15, 17, 18, 19, 20, 21 et 22 qui présentent plusieurs bandes.

Certains échantillons présentent une ou plusieurs bande(s) inattendue(s). Une analyse en Southern Blot a donc été réalisée afin de vérifier la spécificité de ces produits de PCR.

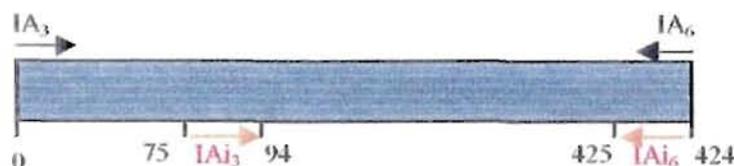
#### ❖ Echantillons analysés en Southern Blot

▪ Certains produits de PCR présentant des bandes de taille inattendue ont été analysés en Southern Blot. Il s'agit :

- de l'échantillon 15 de la 1<sup>ère</sup> série amplifié par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> (5),
- des échantillons 15, 17, 18 et 19 de la 2<sup>ème</sup> série amplifiés par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> (4, 3, 2 et 1).

Ils sont déposés sur un gel d'agarose 1% additionné en BET (cf. photo 9), puis l'ADN est transféré sur une membrane de nitrocellulose (cf. annexe 3 et figure 5).

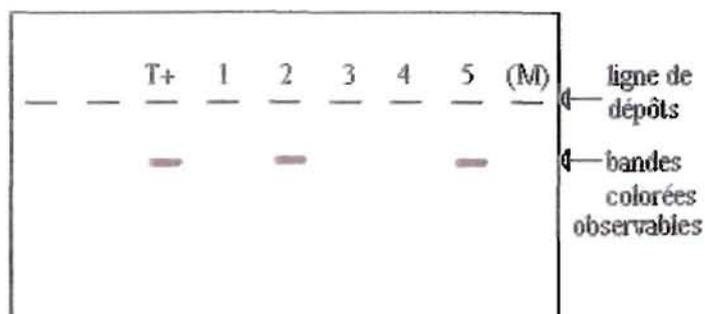
▪ Une sonde est produite par PCR en utilisant le couple d'amorces IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> dessiné à l'intérieur de la région IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub>. La sonde comporte 350 paires de bases.



Cette sonde marquée à la digoxigénine est mise au contact de la membrane de nitrocellulose.

▪ Après l'étape de révélation :

- une bande colorée est observable pour le témoin positif,
- une bande colorée est observable pour 2 échantillons (2 et 5).



**Figure 5 : membrane de transfert du Southern Blot**



**Photo 9 : Gel d'agarose 1% pour Southern Blot**

M = Marqueur 100 (II.2.2)  
T+ = Témoin positif

Date	Ecloserie	Espèce	Stade	Numéro d'échantillon attribué	IA <sub>1</sub> -IA <sub>2</sub>	IA <sub>3</sub> -IA <sub>6</sub>	Série
08/07/1995	1	<i>C. gigas</i>	larves	1	+	+	1 <sup>ère</sup> Série
10/07/1995	1	<i>C. gigas</i>	larves	2	+	+	
25/07/1995	1	<i>C. gigas</i>	larves	3	+	+	
24/08/1995	1	<i>C. gigas</i>	larves	4	+	+	
01/04/1997	2	<i>C. gigas</i>	larves	5	+	+	
28/04/1997	3	<i>O. edulis</i>	larves	6	+	+	
28/04/1997	3	<i>O. edulis</i>	larves	7	+	+	
28/04/1997	3	<i>O. edulis</i>	larves	8	+	+	
jun-97	3	<i>C. gigas</i>	larves	9	+	+	
jun-97	3	<i>C. gigas</i>	larves	10	+	+	
jun-97	3	<i>C. gigas</i>	larves	11	+	+	
jun-97	3	<i>R. philippinarum</i>	larves	12	+	+	
jun-97	3	<i>R. philippinarum</i>	larves	13	+	2 bandes	
jun-97	3	<i>R. philippinarum</i>	larves	14	+	+	
07/06/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	15	+	+	
07/06/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	16	+	+	
07/06/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	17	+	+	
07/06/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	18	+	+	
07/06/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	19	+	+	

Tableau 2 : 1<sup>ère</sup> série d'échantillons analysés en PCR (taille inf = bande de taille inférieure, ? = ininterprétable : plusieurs bandes)

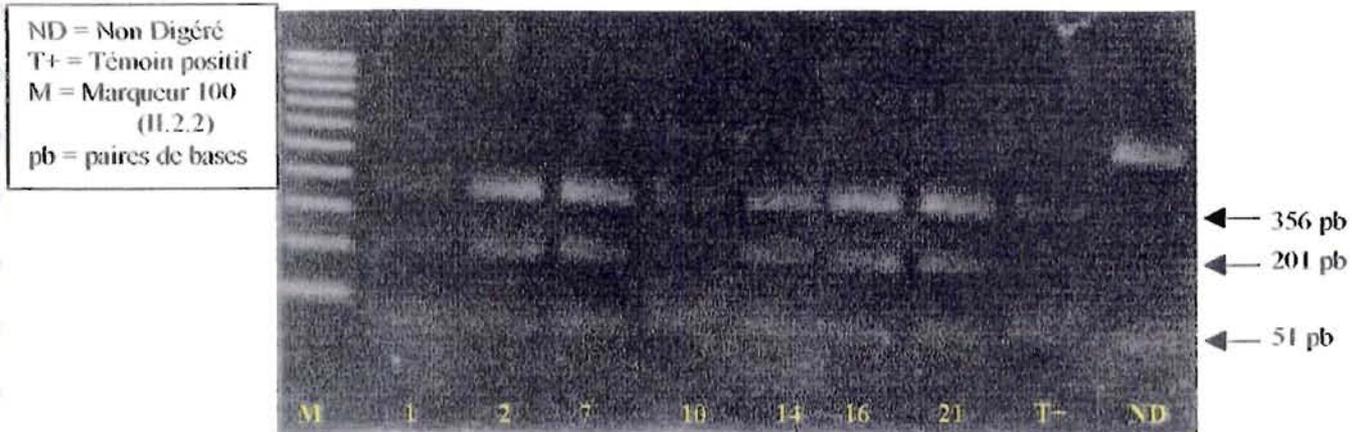
Date	Ecloserie	Espèce	Stade	Numéro d'échantillon attribué	IA <sub>1</sub> -IA <sub>2</sub>	IA <sub>3</sub> -IA <sub>6</sub>	Série
27/08/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	1	+	+	2 <sup>ème</sup> Série
27/08/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	2	+	+	
27/08/1997	3	<i>C. gigas</i>	larves	3	+	+	
23/09/1998	3	<i>C. gigas</i>	larves	4	+	+	
23/09/1998	3	<i>C. gigas</i>	larves	5	+	+	
30/09/1998	3	<i>R. decussatus</i>	larves	6	-	+	
30/09/1998	3	<i>R. decussatus</i>	larves	7	+	+	
30/09/1998	3	<i>R. decussatus</i>	larves	8	+	+	
30/09/1998	3	<i>R. decussatus</i>	larves	9	+	+	
09/06/1999	2	<i>C. gigas</i> 3n	larves	10	+	+	
17/06/1999	2	<i>C. gigas</i>	naissain	11	+	+	
17/06/1999	2	<i>C. gigas</i>	naissain	12	+	+	
17/06/1999	2	<i>C. gigas</i>	naissain	13	+	+	
17/06/1999	2	<i>C. gigas</i>	naissain	14	+	+	
27/06/1999	1	<i>O. edulis</i>	larves	15	-	taille inf	
02/09/1999	3	<i>C. gigas</i>	larves	16	+	+	
06/12/1999	4	<i>C. gigas</i>	adulte	17	taille inf	?	
08/02/2000	4	<i>C. gigas</i>	adulte	18	taille inf	?	
13/03/2000	4	<i>C. gigas</i>	adulte	19	taille inf	?	
17/03/2000	1	<i>C. gigas</i>	larves	20	-	-	
11/04/2000	2	<i>O. edulis</i>	larves	21	+	+	
11/04/2000	2	<i>O. edulis</i>	larves	22	-	+	

Tableau 3 : 2<sup>ème</sup> série d'échantillons analysés en PCR (taille inf = bande de taille inférieure, ? = ininterprétable : plusieurs bandes)

### III.1.2 Analyses par RFLP

#### ❖ Digestion de la zone amplifiée par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub>

##### • Digestion par TaqI



**Photo 10 : Produits de PCR de la 2<sup>ème</sup> série amplifiés par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> et digérés par TaqI**

- Les témoins positifs digérés présentent les 3 bandes attendues de 356, 201 et 51 paires de bases.
- Le témoin non digéré a une taille de 608 (356+201+51) paires de bases, c'est-à-dire la taille de la zone amplifiée par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub>.
- Les produits de PCR des 41 échantillons ont été amplifiés par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> puis digérés par TaqI :
  - La plupart des échantillons présente les 3 bandes attendues de 356, 201 et 51 paires de bases.
  - Les échantillons 6, 15, 20 et 22 de la 2<sup>ème</sup> série ne révèlent après digestion aucun fragment.
  - Les échantillons 17, 18 et 19 de la 2<sup>ème</sup> série apparaissent non digérés.

##### • Digestion par MspI



**Photo 11 : Produits de PCR de la 2<sup>ème</sup> série amplifiés par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> et digérés par MspI**

- Les témoins positifs digérés présentent les 3 bandes attendues de 360, 163 et 85 paires de bases.

- Le témoin non digéré a une taille de 608 (360+163+85) paires de bases, c'est à dire la taille de la zone amplifiée par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub>.

- Les produits de PCR des 41 échantillons ont été amplifiés par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> puis digérés par MspI.

- La plupart des échantillons présente les 3 bandes attendues de 360, 163 et 85 paires de bases.
- Les échantillons 6, 15, 20 et 22 de la 2<sup>ème</sup> série ne révèlent après digestion aucun fragment.
- Les échantillons 17, 18 et 19 de la 2<sup>ème</sup> série apparaissent non digérés.

❖ Digestion de la zone amplifiée par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub>

- Digestion par MvaI



**Photo 12 : Produits de PCR de la 1<sup>ère</sup> série amplifiés par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> et digérés par MvaI**

- Les témoins positifs présentent les 2 bandes attendues de 323 et 101 paires de bases.

- Le témoin non digéré a une taille de 424 (323+101) paires de bases, c'est-à-dire la taille de la zone amplifiée par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub>.

- Les produits de PCR des 41 échantillons ont été amplifiés par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> puis digérés par MvaI :

- La plupart des échantillons présente les 2 bandes attendues de 323 et 101 paires de bases.
- L'échantillon 20 de la 2<sup>ème</sup> série ne révèle après digestion aucun fragment.
- L'échantillon 13 de la 1<sup>ère</sup> série présente, en plus des fragments attendus, une bande de taille supérieure au produit non digéré.
- Les échantillons 15, 17 et 19 de la 2<sup>ème</sup> série présentent de nombreuses bandes, aucune correspondant aux fragments attendus.

• Digestion par TaqI



**Photo 13 : Produits de PCR de la 1<sup>ère</sup> série amplifiés par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> et digérés par TaqI**

- Le témoin positif digéré présente 2 bandes de taille attendue, c'est à dire 279 paires de bases et 93 paires de bases. La troisième bande de 52 paires de bases n'est pas très visible sur la photo (mais distinguable directement sous UV).

- Le témoin non digéré a une taille de 424 (279+93+52) paires de bases, c'est-à-dire la taille de la zone amplifiée par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub>.

- Les produits de PCR des 41 échantillons ont été amplifiés par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> puis digérés par TaqI.

- Pour la plupart des échantillons, seules 2 bandes sont visibles comme pour le témoin positif, c'est-à-dire 279 paires de bases et 93 paires de bases. La troisième bande de 52 paires de bases est très faible en intensité.
- L'échantillon 20 de la 2<sup>ème</sup> série ne révèle après digestion aucun fragment.
- Les échantillons 15, 17 et 19 de la 2<sup>ème</sup> série présentent de nombreuses bandes, aucune correspondant aux fragments attendus.

## III.2 Clonage et séquençage

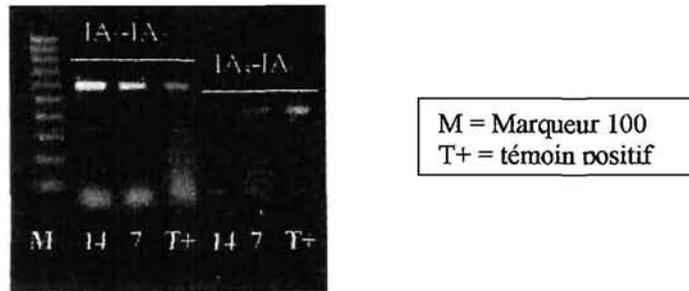
### III.2.1 Le clonage

2 échantillons (échantillons 14 de la 1<sup>ère</sup> série et 7 de la 2<sup>ème</sup> série) ainsi qu'un témoin positif (correspondant à de l'ADN de virus purifiés à partir de larves d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* infectées) ont été dans un premier temps amplifiés par les couples d'amorces IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> et IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub>.

Après avoir vérifié les produits de PCR sur gel d'agarose (cf. photo 14), ceux-ci ont été incorporés dans un plasmide, introduit par la suite dans des bactéries compétentes. Certains clones, obtenus après étalement des bactéries transformées, sont contrôlés en PCR (5 par transformation) en utilisant le couple d'amorces adéquat (cf. photo 15). Selon les résultats obtenus, les clones suivants sont sélectionnés :

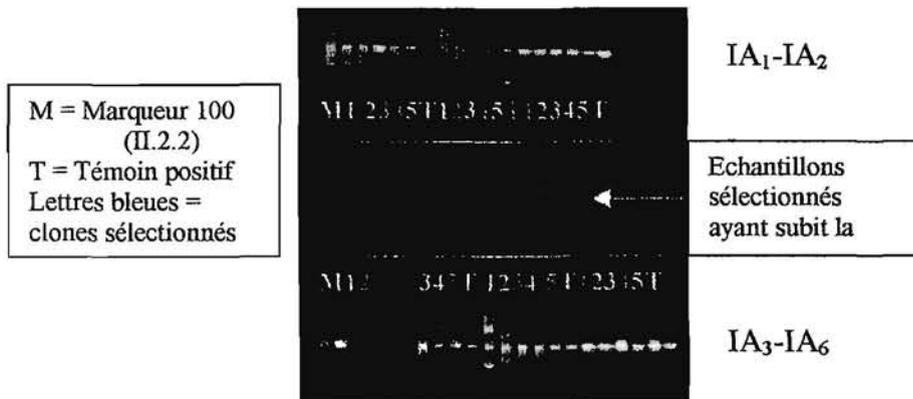
- ❖ échantillon 14 de la 1<sup>ère</sup> série amplifié par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> : clones 4 et 5
- ❖ échantillon 7 de la 2<sup>ème</sup> série amplifié par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> : clones 3 et 5
- ❖ témoin positif amplifié par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> : clones 1 et 2

- ❖ échantillon 14 de la 1<sup>ère</sup> série amplifié par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> : clones 2 et 5
- ❖ échantillon 7 de la 1<sup>ère</sup> série amplifié par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> : clones 3 et 5
- ❖ témoin positif amplifié par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> : clones 1 et 4



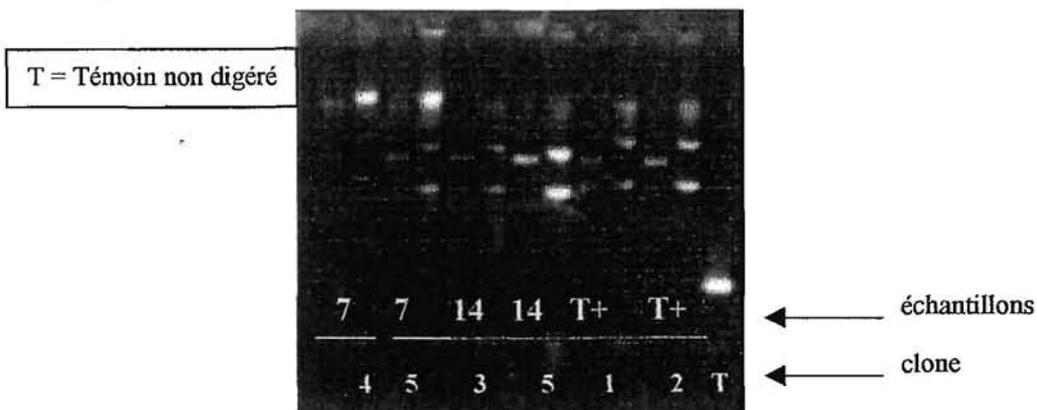
**Photo 14 : Vérification des produits de PCR pour le clonage et le séquençage**

L'ADN plasmidique de ces clones a été extrait selon le protocole décrit (cf. annexe 7).



**Photo 15 : Contrôle des clones par PCR**

Afin de contrôler la présence de l'insert et le rendement de la minipréparation, 2µl de l'ADN extrait est digéré par EcoRI (il présente des sites de restriction de part et d'autre du site d'insertion)(cf. photo 16).



**Photo 16 : Contrôle de la présence de l'insert par digestion par EcoRI**

Les résultats de la digestion sont observés sur le gel d'agarose en déposant en parallèle 2 µl d'ADN extrait non digéré (cf. photo 16).

Ainsi on constate que :

❖ l'ensemble de l'ADN plasmidique est bien digéré par EcoRI. En effet, lorsqu'il est digéré, l'ADN plasmidique se linéarise ce qui se traduit par la présence d'une seule bande légèrement inférieure à la bande correspondant à l'ADN plasmidique superenroulé.

❖ Seuls quelques clones présentent la taille correspondant à l'insert (le témoin positif amplifié par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> et le témoin positif amplifié par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub>). Ces résultats suggèrent un problème de digestion ou un déséquilibre entre les fortes quantités d'ADN plasmidique masquant alors les faibles quantités d'ADN inséré.

❖ Certains clones présentent une intensité beaucoup plus importante que d'autres. Ils seront choisis en priorité pour le séquençage puisqu'une forte intensité traduit une forte concentration en ADN.

### III.2.2 Le séquençage

Sur l'ensemble des clones traités, 3 ont été sélectionnés pour le séquençage.

Il s'agit des clones :

- 4 de l'échantillon 14 de la 1<sup>ère</sup> série amplifié par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub>,
- 5 de l'échantillon 7 de la 2<sup>ème</sup> série amplifié par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub>,
- 2 du témoin positif amplifié par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub>.

Puis la quantité de chaque échantillon a été estimée après dilution au 1/100<sup>ème</sup> par spectrométrie sachant que :

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{D.O.} \times 50 \times \text{dilution}/1000$$

La D.O. étant de 0,1 les échantillons contiennent alors 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  environ d'ADN extrait ( $C = 0,1 \times 50 \times 100/1000 = 0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

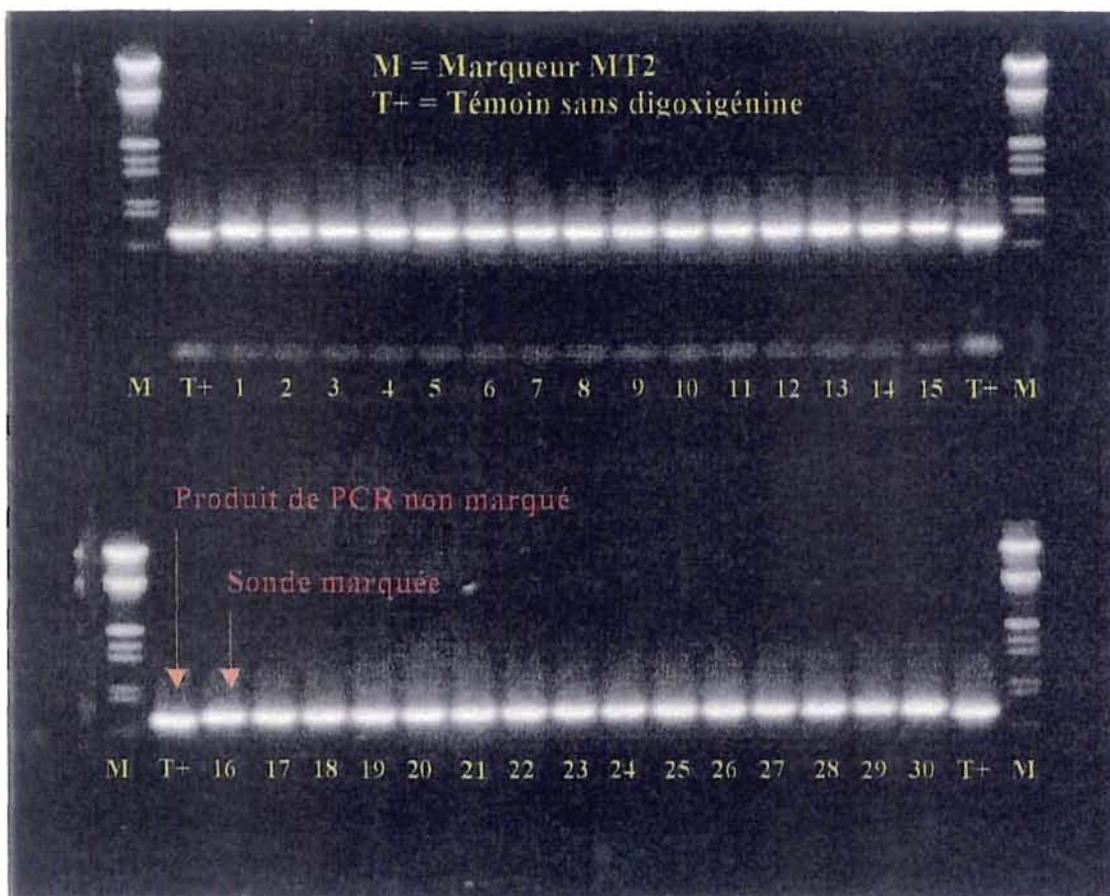
L'analyse des fragments amplifiés par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> sera réalisée ultérieurement. De plus, les résultats du séquençage ne nous sont pas parvenus à temps pour la rédaction de ce rapport.

## III.3 Hybridation *in situ*

### III.3.1 Préparation de la sonde

Après avoir réalisé la PCR en incorporant des dNTP\* marqués à la digoxigénine, le marquage du produit amplifié est contrôlé par comparaison avec la migration d'un produit non marqué à la digoxigénine.

En effet, ce dernier, moins lourd, migrera plus loin que la sonde marquée.

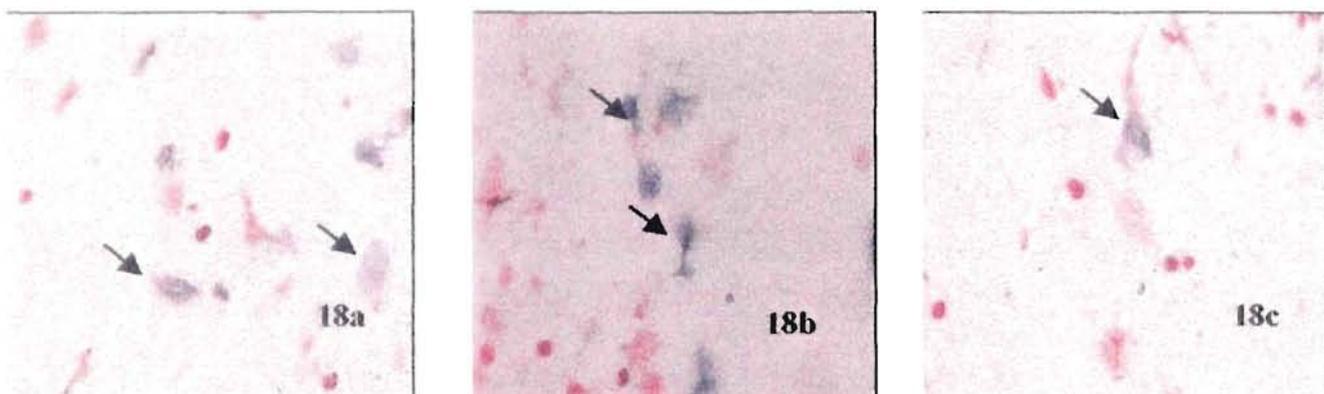


**Photo 17 : Vérification du marquage des sondes pour l'hybridation *in situ***

Les 30 essais de marquage de sonde ont bien intégré les dNTP\* marqués à la digoxigénine.

### III.3.2 Résultats de l'hybridation *in situ*

Du naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*, a été analysé en hybridation *in situ* en utilisant la sonde présentée ci-dessus. La lecture des lames a permis d'observer un marquage au niveau des cellules du tissu conjonctif. Ce marquage concerne le noyau mais aussi le cytoplasme des cellules (cf photos 18 a, b et c)

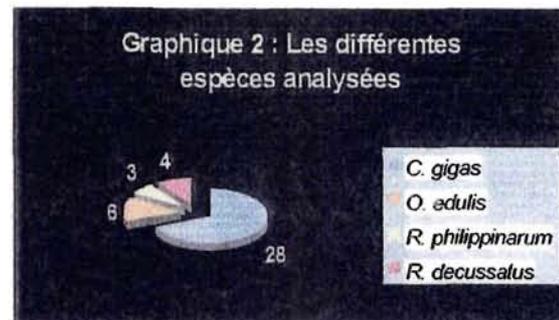
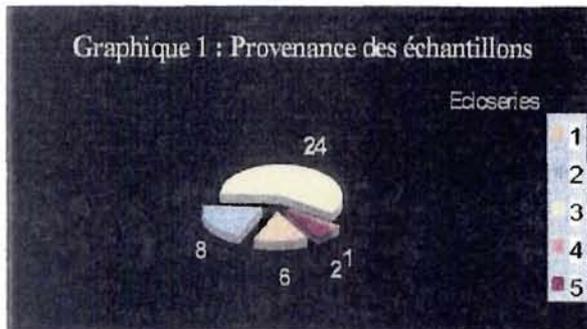


**Photos 18 a, b et c : Naissains d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* : analyse en hybridation *in situ* sur du tissu conjonctif. Flèches : cellules marquées.**

# Discussion

## IV DISCUSSION

Les échantillons analysés dans le cadre de l'étude du gène IA correspondent à plusieurs espèces de bivalves de stade de développement et de provenance divers (cf. tableau 1 et cf. graphe 1 et 2).

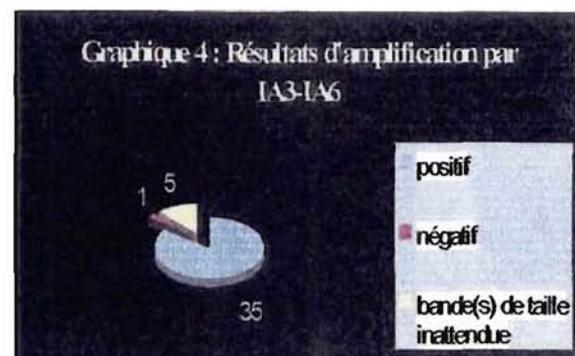
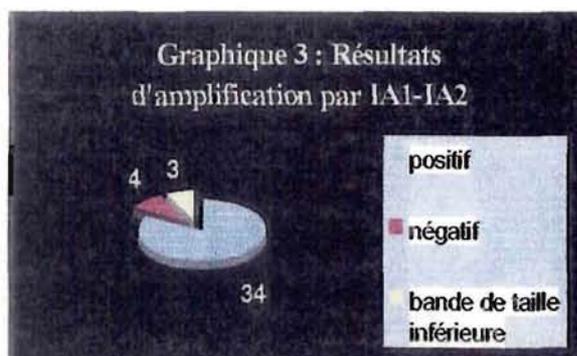


Ce panel d'échantillons offre un support intéressant pour appréhender l'existence potentielle d'une diversité du génome viral en fonction de l'hôte ou de son origine.

Cependant, l'ensemble des échantillons provient d'écloséries françaises (cf. graphique 1), puisque nous n'avons pas d'échantillons positifs d'autres pays à disposition. En effet, les échantillons australiens, néozélandais, espagnols ou anglais qui ont pu être analysés au laboratoire apparaissent négatifs en PCR. La non-détection d'ADN viral peut traduire une absence de virus ou une dégradation du matériel dans la mesure où les échantillons doivent parvenir congelés, ce qui n'est pas toujours le cas lorsqu'ils proviennent de pays éloignés.

- Pour l'ensemble des analyses en PCR, les témoins positifs présentent bien des résultats positifs et les témoins négatifs des résultats négatifs. Ainsi, les résultats obtenus pour les échantillons sont exploitables.

- Les analyses en PCR avec les couples IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> et IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> révèlent, à priori, la présence du gène IA dans la majorité des échantillons analysés (34 sur 41 échantillons) (cf. graphique 3 et 4).



Pour ceux-ci, une bande de taille attendue, identique à celle du témoin positif est observable après électrophorèse en gel d'agarose.

- En revanche, 7 échantillons sur 41 ne présentent pas les résultats attendus :

1. Ni le couple IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> ni le couple IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> ne permet d'obtenir des fragments amplifiés pour l'échantillon 20 de la 2<sup>ème</sup> série. Il semble donc que cet échantillon ne présente pas d'ADN viral.
2. Les échantillons 6 et 22 de la 2<sup>ème</sup> série présentent des résultats contradictoires selon le couple d'amorces utilisé. En effet, les échantillons 6 et 22 apparaissent négatifs avec le couple IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> mais positifs avec IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub>.

Ces résultats peuvent s'expliquer :

- par le fait que l'un des couples d'amorces utilisé soit moins sensible que l'autre,
- par un problème de contamination survenue lors de la manipulation,
- par l'existence d'un polymorphisme, une partie du gène ayant alors connue des modifications.

1. Enfin, certains échantillons (15, 17, 18 et 19 de la 2<sup>ème</sup> série) présentent une ou plusieurs bandes non attendues.

Ces résultats peuvent résulter :

- d'une hybridation non spécifique des amorces utilisées, celles-ci reconnaissant un ADN autre que l'ADN viral,
- d'une dégradation de l'ADN viral, celui-ci présentant après amplification des produits de PCR de plusieurs tailles,
- d'une modification de l'ADN viral suite à une addition ou à une délétion.

**Les analyses en PCR suggèrent une certaine homogénéité et conservation du gène IA entre les différents échantillons.**

**On peut cependant noter des variations d'intensité des bandes observées sur le gel d'agarose. L'intensité reflète la quantité d'ADN viral présente dans les échantillons, ceux-ci ne sont donc pas "infectés" de la même façon.**

Afin de confirmer ces données, l'ensemble des produits de PCR a été digéré par des enzymes de restriction.

On peut noter que :

- ❖ ces produits de PCR dont la taille est identique aux témoins positifs présentent les profils de restriction attendus,
- ❖ l'intensité des produits de digestion est directement proportionnelle à l'intensité des produits de PCR observés sur gel d'agarose,
- ❖ les échantillons apparaissent négatifs en PCR avec l'un des couples d'amorces ou les 2 (échantillon 20 de la 2<sup>ème</sup> série) ne présentent pas de fragments après digestion,
- ❖ l'échantillon 13 de la 1<sup>ère</sup> série présentait 2 bandes après amplification par IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub>, la bande inférieure ayant une taille identique au témoin positif. Après digestion, les fragments attendus sont visibles mais aussi une bande de taille supérieure au produit non digéré. Ainsi la bande supplémentaire ne semble pas spécifique,
- ❖ certains échantillons, les 15, 17, 18 et 19 de la 2<sup>ème</sup> série présentaient après PCR avec les 2 couples d'amorces IA<sub>1</sub>-IA<sub>2</sub> et IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> des résultats difficilement interprétables. Ces produits d'amplification ne présentent aucun fragments après digestion par les enzymes utilisées mis à part l'échantillon 18. Ainsi les résultats des analyses en PCR des échantillons 15, 17 et 19 ne semblent pas spécifiques à l'inverse de l'échantillon 18.

Ces résultats ont été confirmés par Southern Blot. En effet, 3 bandes colorées peuvent être observées après révélation :

- ❖ l'une d'entre elles correspond au témoin positif, celle-ci nous permet de valider l'analyse,
- ❖ les produits de PCR obtenus après amplification de l'échantillon 15 de la 1ère série par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> apparaissent spécifiques dans la mesure où une bande colorée révèle l'hybridation de la sonde sur des produits de PCR,
- ❖ parmi les différentes bandes obtenues après amplification de l'échantillon 18 par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub>, une seule apparaît colorée en Southern Blot ; celle-ci présente une taille identique au témoin positif et semble donc être spécifique.
- ❖ en revanche, les autres échantillons amplifiés par IA<sub>3</sub>-IA<sub>6</sub> (15, 17 et 19 de la 2ème série ) ne présentent pas d'hybridation avec la sonde utilisée. Les produits de PCR obtenus apparaissent donc non spécifiques.

**Les résultats obtenus après digestion enzymatique des produits traduisent une certaine conservation du gène IA. En effet celui-ci ne semble pas présenter de variation ni en fonction de l'espèce, ni en fonction de l'origine des échantillons.**

**Par ailleurs, ces résultats nous permettent de confirmer la spécificité des produits de PCR obtenus dans la mesure où ces derniers présentent, après digestion, le profil de restriction attendu.**

**L'analyse en Southern Blot de quelques échantillons difficilement interprétables démontre la spécificité de 2 d'entre eux.**

Les techniques de PCR et RFLP ne nous ont pas permis de mettre en évidence l'existence d'une diversité au niveau du gène IA. Cependant la seule technique permettant de conclure quant à la détection de mutation reste le séquençage.

De façon regrettable, les résultats des quelques clones sélectionnés ne nous sont pas parvenus dans les temps.

Enfin, nous avons pu localiser l'ADN viral en hybridation *in situ*. Le marquage correspond en effet à l'hybridation de la sonde de façon spécifique et donc la détection d'ADN viral et plus précisément du gène IA.

Le marquage nucléaire traduit l'existence d'une répllication virale. En effet, le virus utilise la machinerie cellulaire pour se multiplier. Le naissain analysé est donc bien infecté. On remarque que les cellules marquées sont situées presque exclusivement dans le tissu conjonctif.

Conclusion

## V CONCLUSION

De nombreux échantillons de bivalve (huîtres creuses, huîtres plates, palourdes japonaise et palourdes européennes) d'origine géographique différentes, ont été analysés en PCR en utilisant des couples d'amorces hybridant au niveau d'un gène codant pour une protéine IA. Cette protéine présente des homologies avec des protéines inhibitrices de l'apoptose. Les produits de PCR qui ont été digérés par les enzymes de restriction présentent le même profil. Aucune variabilité n'a pu être détectée par ces techniques. Ainsi, les herpesvirus infectant les mollusques bivalves ne paraissent pas présenter de diversité ni en fonction de l'espèce hôte ni en fonction de son origine pour le gène ciblé. Toutefois, seul le séquençage permet une analyse fine du génome. Ainsi d'autres résultats concernant l'étude de la diversité de ce virus ont permis de démontrer l'existence d'un polymorphisme au niveau d'une zone non codante. Pour compléter cette approche, une étude sur un gène codant pour une glycoprotéine putative est à venir. L'étude de ce gène reposera sur la démarche scientifique suivie dans le cadre de l'étude du gène IA.

L'étude de la diversité présente un intérêt pour la connaissance même des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*. Il est important de rappeler que les virus de type herpes décrits chez les bivalves sont les premiers éléments de cette famille à être rapportés chez les Invertébrés. D'autres part, l'existence d'une diversité au sein de ces virus conditionne le diagnostic de l'infection. En effet, s'il existe une hétérogénéité, le diagnostic reposera sur l'utilisation de sondes ou d'amorces reconnaissant les zones non variables du génome. Au contraire, si l'objectif est plutôt de distinguer les différents virus, le diagnostic reposera sur l'utilisation d'outils spécifiques des zones variables du génome. De plus, l'existence d'une diversité présente un intérêt évident et peut conditionner les techniques d'élevage ainsi que les transferts d'animaux. Dans ce cas, l'élevage concomitant d'espèces différentes est à éviter et se pose également le problème des échanges d'animaux entre différents bassins ou pays producteurs de bivalves et leur contrôle.

# Bibliographie

## VI BIBLIOGRAPHIE

Arends M.J., Wyllie A.H (1991). Apoptosis : mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol.* ; 32 : 223-54.

Comps M. et Cochenec N., (1993). A herpes-like virus from the European oyster *ostrea edulis*. *L. J. Inv. Pathol.*, 62.

Ellis H.M., Horvitz H.-R. (1986). Genetic control of programm death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mar* 28, 44(6) : 817-829.

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

Feldmann G., (1995). L'apoptose ou mort cellulaire programmée. *Ann. Pathol.*, 15(1), 92-109.

Gall JG, Pardue ML., (1969 Jun). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ; 63(2) : 378-83.

Hine P. M., Wesley B. et Hay B.E. (1992). Herpes virus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Dis. aquat. Org.* 29(3), 197-204.

Hine P. M. et Thorne E. T. (1997). Replication of the herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi* (Sowerby, 1871) : an ultrastructural study. *Dis. aquat. Org.* 29(3), 197-204.

Hine P. M., Wesley B. et Besant P. (1998). Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Triostrea chilensis* at ambient temperatures. *Dis aquat. Org.* 32, 161-171.

Kerr J.F.R, Wyllie A.H, Currie A.R. Apoptosis (1972 Aug) : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26(4) : 239-57.

Le Deuff R.M., Nicolas J.L., Renault T. et Cochenec N. (1994). Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 142(2), 69-72.

- Le Deuff R.M., Renault T., (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 14(2), 69-72.
- Nicolas J.-L., Comps M. et Cochenne N. (1992). Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Ass. Fischpathol. 12(1), 11-13.
- Renault T., Cochenne N., Le Deuff R.-M. et Chollet B. (1994). Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 14(2), 64-66.
- Renault T., Le Deuff R.M., Lipart C., Delsert C, (2000). Developpement of a PCR procedure for the detection of an herpes-like virus infecting oysters in France. J. Virol. Meth., sous presse.
- Renault T., Le Deuff R.M., Chollet B., Cochenne N. et Gérard A. Concomitant herpes-like virus infections among hatchery- reared larvae and nursery-cultured spat of both oyster species *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Dis. aqua. Org. Soumis.
- Richman DD, Guatelli JC, Grimes J, Tsiatis A, Gingeras T., (1991). Dec Detection of mutations associated with zidovudine resistance in human immunodeficiency virus by use of the polymerase chain reaction. Infect. Dis. ; 164(6) : 1075-81.
- Saiki R.K., Sharf S., Falcoma F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. et Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of  $\gamma$ -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sichle cell anemia. Science 230, 1350-1354.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. Protein, (1977 Dec). Nucleotide DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74(12) : 5463-5467.
- Souther E.M. (1975). Detection of specific among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98, 503.
- Vaux DL, Haecker G, Strasser A (1994 Mar 11). Related Articles An evolutionary perspective on apoptosis. Cell. ; 76(5) : 777-9.
- Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie (1980). Cell death : the significance of apoptosis. Int Rev Cytol. ; 68 : 251-306.
- Wyllie A.H (1992 Sep). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues : an overview. Cancer Metastasis Rev. 11(2) : 95-103.

# Annexes

Annexe 1



**Taq I**

5'...T\*CGA...3'

3'...AGC\*T...5'

<b>Concentration</b>	8-12 U/ $\mu$ l										
<b>Source</b>	Thermus aquaticus YT1										
<b>Heat Inactivation</b>	No										
<b>Isoschizomers</b>	TthHB8 I										
<b>Compatible sites</b>	Acy I, BsaH I, Cla I, HinP I, Hpa II, Mae II, Msp I, Nar I, Sfu I										
<b>Incubation t°</b>	70 °C										
<b>Assay Conditions</b>	Violet buffer at 70 °C										
<b>Storage conditions</b>	10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 300 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA, 50% glycerol, -20 °C										
<b>Buffer chart</b>	<table><thead><tr><th>Violet</th><th>Blue</th><th>Green</th><th>Yellow</th><th>Apricot</th></tr></thead><tbody><tr><td><u>100</u></td><td>75-100</td><td>100</td><td>25-50</td><td>50-75</td></tr></tbody></table>	Violet	Blue	Green	Yellow	Apricot	<u>100</u>	75-100	100	25-50	50-75
Violet	Blue	Green	Yellow	Apricot							
<u>100</u>	75-100	100	25-50	50-75							

**Note** Incubation at 37 °C results in 10% activity. Blocked by overlapping dam methylation. Taq I does not cut TCGm6A but does cut Tm5CGA. Cleaves single stranded DNA slowly

## Annexe 1



### *Mva I*

5'... CC\*WGG ...3  
3'... GGW\*CC ...5

<b>Concentration</b>	8-12 U/ $\mu$ l										
<b>Source</b>	<i>Micrococcus varians</i> RFL19										
<b>Heat Inactivation</b>	No										
<b>Isoschizomers</b>	BSIN I, EcoR II, Apy I										
<b>Compatible sites</b>	none										
<b>Incubation t°</b>	37 °C										
<b>Assay Conditions</b>	Green buffer at 37 °C										
<b>Storage conditions</b>	10 mM KPO <sub>4</sub> (pH 7.0), 400 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA, 50% glycerol, -20 °C										
<b>Buffer chart</b>	<table><tr><td><b>Violet</b></td><td><b>Blue</b></td><td><b>Green</b></td><td><b>Yellow</b></td><td><b>Apricot</b></td></tr><tr><td>75-100</td><td>75-100</td><td><u>100</u></td><td>25-50</td><td>100</td></tr></table>	<b>Violet</b>	<b>Blue</b>	<b>Green</b>	<b>Yellow</b>	<b>Apricot</b>	75-100	75-100	<u>100</u>	25-50	100
<b>Violet</b>	<b>Blue</b>	<b>Green</b>	<b>Yellow</b>	<b>Apricot</b>							
75-100	75-100	<u>100</u>	25-50	100							
<b>Note</b>	Low salt and excess enzyme result in star activity										

## Annexe 1



### *Msp I*

5'... C<sup>+</sup>CGG ...3  
3'... GGC<sup>-</sup>C ...5

<b>Concentration</b>	8-12 U/μl				
<b>Source</b>	Moraxella species				
<b>Heat Inactivation</b>	65 °C for 20 minutes				
<b>Isoschizomers</b>	Hap II, Hpa II				
<b>Compatible sites</b>	Acc I, Acl I, BsaHI, BspD I, BstB I, Cla I, Hinf I, Hpa II, Mae II, Nar I, Taq I				
<b>Incubation T°</b>	37 °C				
<b>Assay Conditions</b>	Violet buffer at 37 °C				
<b>Storage conditions</b>	10 mM KPO <sub>4</sub> (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA, 50% glycerol, -20 °C				
<b>Buffer chart</b>	<b>Violet</b>	<b>Blue</b>	<b>Green</b>	<b>Yellow</b>	<b>Apricot</b>
	<u>100</u>	75-100	25-50	75-100	25-50
<b>Note</b>	Msp I does not cut m5CCGG but does cut m4CCGG, Cm4CCGG and Cm5CCGG. In contrast Hpa II does not cut m4CCGG m5CCGG, Cm5CCGG and Cm4CCGG				

## Annexe 2

### FICHE TECHNIQUE

OliGold

90011557

Client ARZUL  
Lieu F-17390 RONCE LES BAINS  
Réf.

Réf client	Echantillon N°	Echelle de synthèse	Chimie	Bases		
IA6	641229	40 nmol	ADN Oligos	18		
Séquence	5'-GGA-CAC-CTT-GGT-GCG-TTT-3'					
Composition	A 2	C 4	G 6	T 6	Autres 0	Mixte 0
Modification					6	
5'					7	
3'					8	
5					9	

% GC	55,56	Coefficient d'extinction	164400,00 l/(mol cm)
MM	5521,65 g/mol	Quantité µg	601 µg
Tm (2 AT + 4 GC)	56,00 °C	nmoles	109 nmol
Tm (% GC)	48,38 °C	unités DO	18 OD
Date de purification	26-04-2000	Mass spectr.	---

Mise en solution	Centrifuger peu de temps pour s'assurer que l'ensemble du produit lyophilisé est au fond du tube. Reconstituer dans un tampon TE ou de l'eau distillée à concentration appropriée pour l'usage attendu.
Commentaires généraux	Tm % GC calculé avec 50 mM NaCl et 0 % formamide (conditions PCR)
Condition de stockage	à 4° C sous forme lyophilisée, à -20° C dans un tampon TE, pH = 8 dans l'eau.
Commentaires spécifiques	

# Certificat de synthèse

Tel:33.(0)1.55.86.87.40 - Fax:33.(0)1.55.86.87.44

E-Mail:oligo@genomex.com

Date: 05/04/2000Numéro de lot: 00405047Nom de la séquence: IA2Type de séquence: DNASéquence(5' à 3'): AATCCCCATGTTTCTTGCTGLongueur de la séquence: 20Rapport purines/pyrimidines: 0,43Nombre de purines: 6Pourcentage GC: 45 %Nombre de pyrimidines: 14Température de fusion: 53.35 °CPoids Moléculaire: 6 034,00Poids sec: 308.64 µgDensité optique: 9 D.ONombre de moles: 51.15 nmolesCoeff. d'ext µmolaire: 175,95Commentaires:Date: 05/04/2000Numéro de lot: 00405048Nom de la séquence: IA3Type de séquence: DNASéquence(5' à 3'): AAAGTAGGCGAGGTGGATCALongueur de la séquence: 20Rapport purines/pyrimidines: 3,00Nombre de purines: 15Pourcentage GC: 50 %Nombre de pyrimidines: 5Température de fusion: 55.4 °CPoids Moléculaire: 6 255,17Poids sec: 252.32 µgDensité optique: 8.8 D.ONombre de moles: 40.34 nmolesCoeff. d'ext µmolaire: 218,16Commentaires:

## Annexe 2



# Certificat de synthèse

*Tel:33.(0)1.55.86.87.40 - Fax:33.(0)1.55.86.87.44*

*E-Mail:oligo@genomex.com*

Date: 05/04/2000

Numéro de lot: 00405046

Nom de la séquence: IA1

Type de séquence: DNA

Séquence(5' à 3'): CGCGGTTTCATATCCAAAGTT

Longueur de la séquence: 20

Rapport purines/pyrimidines: 0,82

Nombre de purines: 9

Pourcentage GC: 45 %

Nombre de pyrimidines: 11

Température de fusion: 53.35 °C

Poids Moléculaire: 6 092,06

Poids sec: 282.7 µg

Densité optique: 8.9 D.O

Nombre de moles: 46.4 nmoles

Coeff. d'ext µmolaire: 191,79

Commentaires:

## Annexe 3

### Southern Blot

#### 1 PCR et migration sur gel

Les produits de PCR sélectionnés sont déposés sur un gel adéquat (agarose 1 % par exemple, puis on migre au voltage correspondant).

#### 2 Dénaturation

- ❖ Faire tremper le gel 30 min à température ambiante dans une solution contenant :
  - 12,5 ml de NaOH (10 M)
  - 75 ml de NaCl (5 M)
  - qsp d'H<sub>2</sub>O distillée pour 250 ml
- ❖ Rincer à l'H<sub>2</sub>O distillée

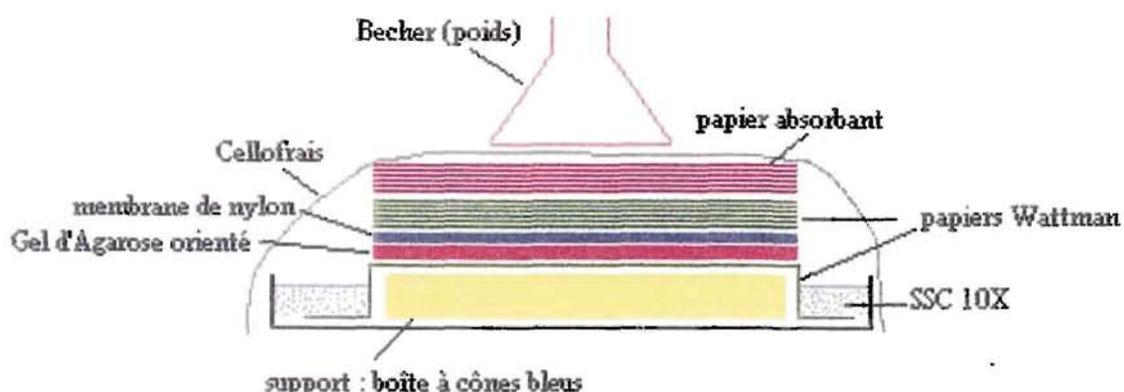
#### 3 Neutralisation

- ❖ Faire tremper le gel 30 min à température ambiante dans une solution contenant :
  - 125 ml de Tris pH 7,5 (1 M)
  - 75 ml de NaCl (5 M)
  - qsp d'H<sub>2</sub>O distillée pour 250 ml
- ❖ Rincer à l'H<sub>2</sub>O distillée

#### 4 Préparation du transfert

Faire tremper le gel 30 min à température ambiante dans une solution SSC 20X (Citrates de sodium 0,3M (88,2g) et NaCl 3M (175,3g), ajuster le pH à 7). Cette solution doit être assez stringente pour ne pas perdre l'ADN du gel.

#### 5 Transfert



**Figure 6 : schéma du dispositif expérimental pour le transfert**

La membrane de nylon est préalablement imprégnée d'H<sub>2</sub>O distillée puis de SSC 20X. Le transfert doit se faire durant toute une nuit.



## 6 Fixation de l'ADN

- ❖ Retirer la membrane
- ❖ Regarder le gel sous UV pour vérifier que le transfert est bien effectué
- ❖ Faire sécher à température ambiante
- ❖ Laisser une heure à 80°C pour fixer l'ADN (ou 3 min sous UV)
- ❖ Mettre au réfrigérateur

## 7 Préparation des sondes marquées

La sonde utilisée est marquée, dans notre cas, à la digoxigénine. Des dUTP\* marqués à la digoxigénine sont incorporés directement par PCR dans la séquence choisie comme sonde.

Pour un tube :

- H<sub>2</sub>Od                    ➔ 33,5 µl                    (H<sub>2</sub>Od = H<sub>2</sub>O distillée)
- Tampon 10X           ➔ 5 µl
- MgCl<sub>2</sub>                 ➔ 3 µl
- dNTP+dUTP\*       ➔ 5 µl                    (dUTP\* = DIG 11 dUTP)
- amorce 1 et 2       ➔ 1 µl de chaque
- Taq polymérase ➔ 0,5 µl
- + 1 µl de solution d'ADN (5.10<sup>5</sup> copies/ml)

Volume total 50 µl

## 8 Préhybridation

Faire tremper la membrane dans 8 ml de tampon d'hybridation ECL à 42°C pendant une nuit dans le four à hybridation.

## 9 Hybridation

- ❖ Ajouter 5 µl de sonde préalablement dénaturée 5 min à 94°C (ADN double brin se dénature en ADN simple brin, le produit est mis aussitôt sur glace pour conserver la structure simple brin).
- ❖ Laisser toute la nuit à 42°C sous agitation.

## 10 Lavage de la membrane

Les lavages sont effectués sous agitation, avec du SSC préalablement incubé à 42°C.

- Lavage avec du SSC 2X à 42°C pendant 20 min
- Lavage avec du SSC 1X à 42°C pendant 20 min
- Lavage avec du SSC 1X à température ambiante pendant 20 min
- Lavage avec du SSC 0,5X à température ambiante pendant 20 min

## 11 Saturation avec du lait en poudre (Régilait®)

Réaliser une suspension de 6 g de lait en poudre dans 100 ml de tampon PBS 1X (NaCl 9g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,48g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,43g/l, ajuster le pH à 7,2) et laisser tremper le gel 1 heure à température ambiante.

## 12 Fixation de l'anticorps primaire (IgG de souris)

L'anticorps reconnaît la digoxigénine fixée sur les dUTP\*.  
Réaliser une dilution au 1/250<sup>ème</sup> de la solution mère d'anticorps dans une solution de PBS 1X (20 µl de solution d'anticorps primaire + 4,980 ml de solution PBS 1X). Laisser agir à température ambiante, sous agitation.

## 13 Rinçage

Réaliser 8 rinçages de 5 min en solution PBS 1X sous agitation et à température ambiante.

## 14 Fixation de l'anticorps secondaire (anti IgG de lapin)

Les anticorps utilisés sont spécialement dirigés contre les anticorps de souris et couplés à une peroxydase. Cette fixation permet la révélation de la fixation de la sonde sur l'ADN viral par une réaction enzymatique utilisant un substrat chromogène (Diaminobenzidine).  
Pour se faire, on réalise une dilution de la solution mère d'anticorps au 1/250<sup>ème</sup> (20 µl de solution mère d'anticorps secondaires + 4,980 ml de solution PBS 1X) et on laisse agir dans l'obscurité, sous agitation et à température ambiante.

## 15 Rinçage

Réaliser 3 rinçages de 8 min en solution PBS 1X sous agitation et à température ambiante.

## 16 Révélation D.A.B. (Diaminobenzidine)

La révélation se fait en 10 min maximum sous agitation et dans le noir dans une solution contenant :

- 25 mg de D.A.B.
- 150 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 50 ml de PBS 1X

## 17 Etapes finales

- ❖ Rincer à l'eau courante puis H<sub>2</sub>O
- ❖ Faire tremper dans l'eau courante en ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique

## Annexe 4

### Préparation de la sonde pour hybridation *in situ*

Les sondes préparées sont marquées à la digoxigénine.

On réalise donc une PCR avec le milieu réactionnel suivant :

- H <sub>2</sub> O bidistillée	33,5 µl
- Tp 10X	5 µl
- MgCl <sub>2</sub>	3 µl
- dNTP*	5 µl
- amorce 1	1 µl
- amorce 2	1 µl
- Taq	0,5 µl

+ 1 µl d'ADN viral purifié à  $5 \cdot 10^5$  copies

## Annexe 5

### Lames histologiques

#### 1 Fixation des tissus

Le fixateur a pour rôle de maintenir les tissus dans un état aussi proche que possible de leur morphologie *in vivo* et de conserver les tissus pour qu'il ne se dégrade pas avec le temps. Les principaux fixateurs utilisés pour l'étude des mollusques marins sont le Davidson et le Carson. On utilisera le fixateur Davidson.

#### *Composition du liquide de Davidson :*

Eau de mer	1200 ml
Alcool à 95°	1200 ml
Glycérol	400 ml
Acide acétique cristallisable	10% (ajouter extemporanément)

Le liquide de Davidson, du fait de sa composition à base d'eau de mer, permet de bien préserver la structure des tissus. Les coupes de tissus fixés au Davidson peuvent être utilisées pour l'hybridation *in situ*.

#### 2 Déshydratation, imprégnation et inclusion des échantillons

L'inclusion des pièces en paraffine nécessite différentes étapes qui vont permettre d'éliminer progressivement l'eau contenue dans les tissus et de la remplacer dans un premier temps par l'alcool, puis du xylène et enfin par de la paraffine.

Après fixation au Davidson, les tissus sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol à 95°, puis d'éthanol absolu, afin d'éliminer l'eau des tissus. L'imprégnation des pièces par un solvant de la paraffine, le xylène, permet d'éliminer l'alcool contenu dans les tissus et facilite l'imprégnation ultérieure par la paraffine liquide à 60°C. Ces opérations sont réalisées à l'aide d'un automate LKB.

Des blocs sont réalisés en refroidissant les tissus dans des moules métalliques remplis de paraffine, sur une table réfrigérante (LKB).

#### 3 Confection des coupes

Après refroidissement des blocs sur une plaque réfrigérée qui permet de durcir la paraffine, des coupes histologiques de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome LKB. Les rubans ainsi obtenus sont déposés à la surface d'un bain-marie à 37°C. Après étalement des coupes, celles-ci sont récupérées sur des lames histologiques, égouttées et séchées une nuit à 37°C. Elles peuvent être conservées à cette température.

## Annexe 6

### Hybridation *in situ*

#### 1 Déparaffiner

- 2 bains de Xylène pendant 5 min
- 2 bains d'éthanol 100° pendant 5 min
- Séchage sous hotte chimique

#### 2 Protéolyse

- 200 µl de protéinase K (0,1 mg/ml en TBE) par lame
- Incubation en chambre humide pendant 15 min à 37°C
- Déshydratation :
  - Ethanol 95° pendant 1 min
  - Ethanol 100° pendant 1 min
  - Séchage sous hotte chimique

#### 3 Préhybridation

- 500 µl de tampon d'hybridation par lame pendant 1 heure à 42°C
- Eliminer le tampon d'hybridation avec du papier absorbant

#### 4. Hybridation

- Disposer les chambres autocollantes sur lames silanisées
- Déposer 100 µl de mélange sonde + mix (V/V = 1) par lame
- Recouvrir d'une lamelle plastique
- Dénaturer (94°C pendant 5 min)
- Incubation à 37°C pendant une nuit

#### 5. Détection

- Plonger les lames dans le tampon Tp DIG 1
- Couvrir les échantillons avec 200 µl de Tp DIG 2 en chambre humide, à température ambiante et pendant 30 min
- Rincer les lames en Tp DIG 1
- Diluer l'anticorps (anti DIG AP) au 1/500<sup>ème</sup> et déposer 100 µl par lame
- Incuber à température ambiante pendant 1 heure
- 2 lavage en Tp DIG 1 pendant 1 min
- 1 lavage en Tp DIG 3 pendant 5 min
- Préparer le révélateur (20 µl de NBT/BCIP + 1 ml Tp DIG 3)
- Déposer 100 µl par lame
- Laisser à l'obscurité pendant 30 min
- Bloquer la réaction avec le Tp DIG 4 après observation des lames sous microscope  
Contre coloration au jaune de Bismarck

## Annexe 7

### Clonage (kit Invitrogen)

#### 1 Ligation

La ligation est réalisée dans des microtubes. Elle consiste à intégrer le fragment choisi, amplifié par PCR, dans un plasmide (dans notre cas pCR<sup>®</sup>2.1).

Dans un microtube :

- ❖ Eau bidistillée :  $10 - (4 + x) = y$   $\mu$ l
- ❖ PT-ADVector (plasmide) : 2  $\mu$ l
- ❖ Tampon de ligation 10X : 1  $\mu$ l
- ❖ T<sub>4</sub> DNA ligase : 1  $\mu$ l
- ❖ x  $\mu$ l de produit de PCR ( $0,5 \mu$ l < x < 2  $\mu$ l)

Laisser toute la nuit à 14°C puis conserver à -20°C

#### 2 Transformation des bactéries

Pour un tube d'*E. coli*, on ajoute :

- ❖ 2  $\mu$ l de Mercepto-éthanol
- ❖ 2  $\mu$ l de produit de ligation

Laisser 30 min sur glace

Mettre au bain thermostaté à 42°C pendant exactement 30 secondes

Laisser 2 min sur glace

#### 3 Croissance des bactéries

Ajouter 250  $\mu$ l de milieu Soc par tube

Laisser agiter à 37°C pendant une heure dans une étuve à agitation (tubes à l'horizontal)

Mettre sur glace

#### 4 Préparation des boîtes

Etaler sur des géloses préalablement coulées (milieu LB) à l'aide d'une pipette rateau :

- ❖ 40  $\mu$ l de Xgal
- ❖ 40  $\mu$ l d'IPTG

Laisser sécher sous la hotte.

#### 5 Etalement des bactéries

Etaler 100  $\mu$ l d'un tube d'*E. coli* sur une boîte additionnée en Xgal et IPTG.

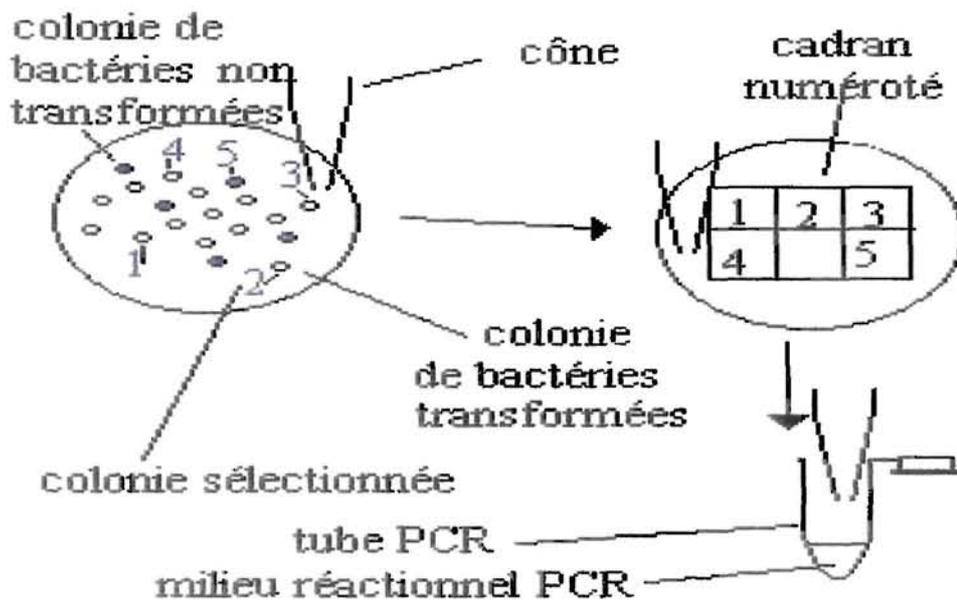
Mettre les boîtes à l'étuve à 37°C

#### 6 Sélection des clones

Préparer les milieux réactionnels de PCR contenant les amorces ayant servies à l'amplification du fragment cloné et les distribuer dans les tubes à PCR.

A partir des colonies présentes sur les boîtes de Pétri, sélectionner 4 colonies blanches correspondant aux bactéries transformées et une colonie bleue correspondant aux bactéries non transformées. Cadriller sur une boîte de Pétri et repérer l'emplacement des bactéries à repiquer.

Gratter une colonie à l'aide d'un cône stérile, repiquer la gélose dans le cadran correspondant et tremper le cône dans le mélange de PCR.



Incuber les boîtes nouvellementensemencées et réaliser une PCR à partir des mélanges réalisés.

Selon les résultats de PCR, les clones à analyser vont être sélectionnés et repiqués en milieu LB liquide. Ils seront incubés à 37°C sous agitation vive pendant une nuit.

## 7. Extraction Minipréparation d'ADN plasmidique

- ❖ Récupérer 1,5 ml de culture d'*E. coli* d'une nuit, centrifuger à 3000 tours/min pendant 2 ou 3 min.
- ❖ Eliminer le surnageant et reprendre le culot avec 200 µl de solution I (+ 400µg de RNase/ml) et 200 µl de solution II. Homogénéiser et laisser 5 min à température ambiante.
- ❖ Ajouter 200 µl de solution III et laisser 5 min sur glace.
- ❖ Centrifuger 5 min à 3000 tours/min à température ambiante.
- ❖ Ajouter 420 µl d'Isopropanol et homogénéiser au Vortex. Laisser 5 min à température ambiante.
- ❖ Centrifuger 10 min à 10000 tours/min.
- ❖ Eliminer le surnageant et faire sécher
- ❖ Ajouter 200 µl de Tampon T.E. et homogénéiser au Vortex.
- ❖ Ajouter 200 µl d'Aqua phénol sous hotte et homogénéiser au Vortex.
- ❖ Récupérer la phase supérieure et ajouter 200 µl de chloroforme isoamylalcool et homogénéiser au Vortex pendant 1 min.
- ❖ Centrifuger à 10000 tours/min pendant 5 min.
- ❖ Récupérer la phase supérieure et ajouter 20 µl d'Acétate de sodium (3M) et 500 µl d'éthanol absolu. Homogénéiser au Vortex. Conserver 10 min à -20°C.
- ❖ Centrifuger à 10000 tours/min pendant 10 min à 4°C.

- ❖ Eliminer le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol 70°.
- ❖ Centrifuger à 10000 tours/min pendant 2 min.
- ❖ Sécher sous vaccum.
- ❖ Reprendre le culot dans 20 µl de tampon T.E. et digérer par EcoRI
  - 2 µl d'ADN
  - 2 µl de tampon 10X EcoRI
  - 1 µl d'enzyme
- ❖ Laisser incuber au moins 1 heure à 37°C.
- ❖ Déposer la totalité dans un gel à 1% d'agarose additionné de BET.

Solution I : 100mM Tris-HCl (pH 7,5) et 10 mM EDTA

Solution II : 0,2 mM NaOH et 1% SDS

Solution III : 3M potassium, 5M acétate.

## Annexe 8

### Milieux de culture

#### 1. Milieu LB (Luria Bertani) liquide

❖ Tryptose Phosphat Broth	14,75 g
❖ Yeast extract	5 g
❖ NaCl	7,5 g

+ 950 ml d'eau bidistillée.

Ajuster le pH à 7 sous NaOH 5 M.

Compléter à 1 litre et autoclaver.

Amener à 55°C (température de surfusion) et additionner 1 ml/l d'Ampicilline (50 mg/ml)

#### 2. Milieu LB (Luria Bertani) solide

❖ Tryptose Phosphat Broth	19,75 g
❖ Yeast extract	5 g
❖ NaCl	7,5 g
❖ Agar	15 g

+ 950 ml d'eau bidistillée.

Ajuster le pH à 7 sous NaOH 5 M.

Compléter à 1 litre et autoclaver.

Amener à 55°C (température de surfusion) et additionner 1 ml/l d'Ampicilline (50 mg/ml)

Couler les boîtes et les conserver à l'envers à 4°C.