

UNIVERSITE DES SCIENCES DE LA ROCHELLE

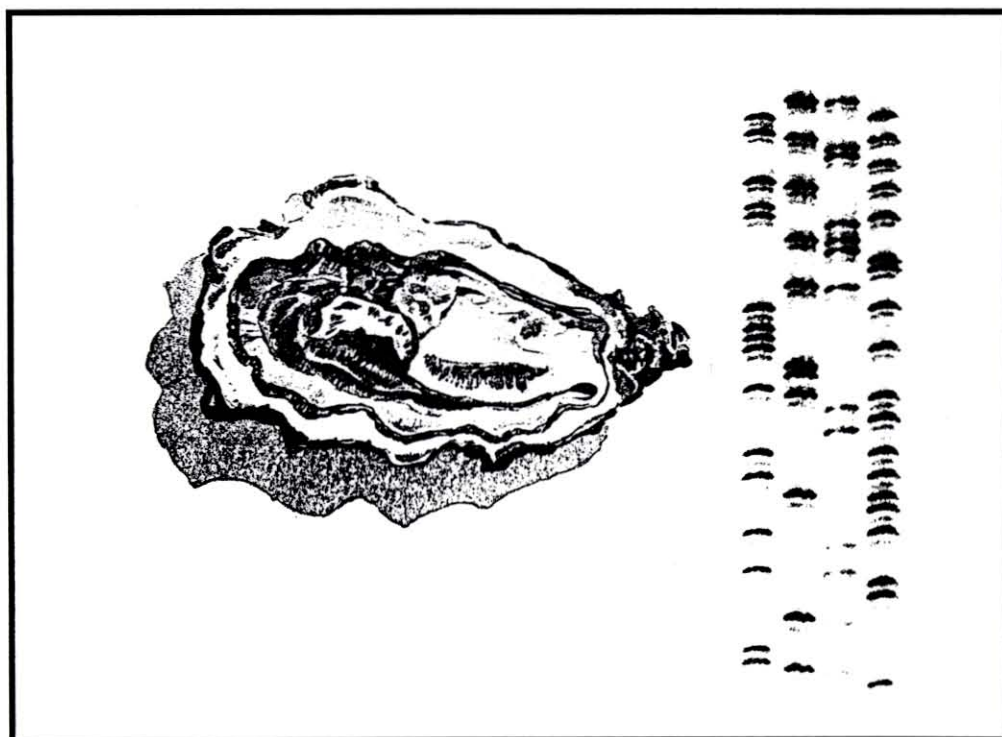
MAITRISE DE BIOCHIMIE

Hélène Délandes

Rapport de stage (mai - août 97)

IFREMER  
BIBLIOTHEQUE  
LA TREMBLAD

PHYLOGENIE MOLECULAIRE DES HUITRES DU GENRE *CRASSOSTREA*  
APPROCHE PAR LES TECHNIQUES DE RESTRICTION ENZYMATIQUE  
ET DE SEQUENÇAGE



70885  
E700.DEL  
P.

IFREMER

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie

B.P. 133 - 17390 La Tremblade

Responsable du laboratoire : A. GERARD

Responsable de stage : P. BOUDRY



IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 01424

# *Remerciements.*

*Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie de l'IFREMER de Ronce-les-Bains.*

*Je tiens tout d'abord à remercier André GERARD et Jean-Pierre FLASSCH pour m'y avoir accueillie.*

*Je remercie également Pierre BOUDRY, mon responsable de stage, pour l'encadrement scientifique dont j'ai bénéficié au cours de ces onze semaines.*

*Merci à tous ceux qui, par leurs conseils, m'ont permis d'avancer dans mes recherches et de rédiger ce rapport, en particulier, Arnaud HUVET, pour avoir suivi mes expériences tout au long de ce stage, Tristan RENAULT pour ses explications concernant le séquençage, Sophie LAUNEY et Marc BARRE pour les relectures, et enfin, Cécile LIPART, qui a eu la tâche ingrate de se charger de la mise en page et des reliures.*

*Je tiens également à remercier tout le personnel du laboratoire pour sa gentillesse à mon égard.*

*Enfin, merci à ceux qui, par leur humour, leur dynamisme, leur sensibilité, et tout simplement par leur présence, ont su transformer ce stage en un séjour inoubliable: Isabelle, Arnaud, Christophe et Xavier. Merci pour chaque instant passé en votre compagnie.*

# *. # SOMMAIRE #.*

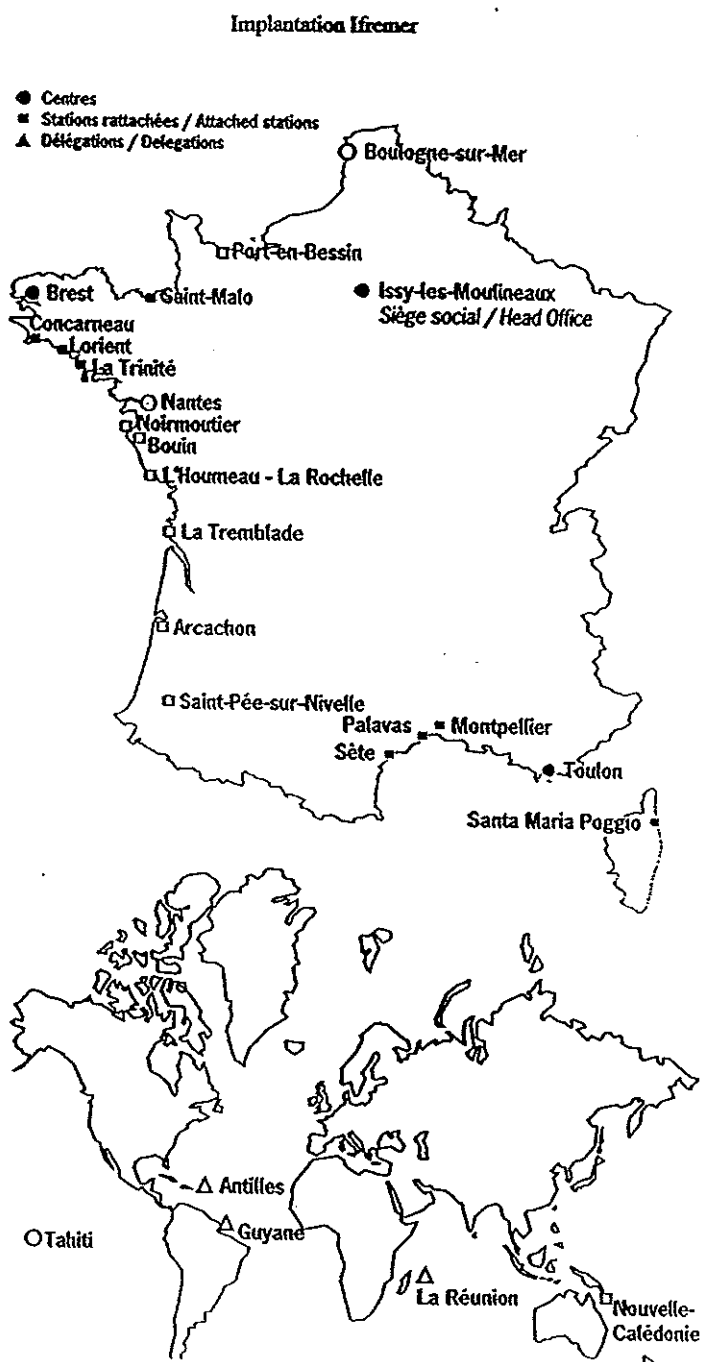
|   |        |
|---|--------|
| Présentation de l'IFREMER.  | 3      |
| 1 . L'IFREMER et ses implantations géographiques.                     | 3      |
| 2 . Présentation.   | 4      |
| 3 . Les missions.   | 4      |
| 4 . Station de La Tremblade.  | 5      |
| 5 . Le personnel.   | 7      |
| <br>Présentation du sujet.  | <br>8  |
| 1 . Le contexte scientifique.   | 8      |
| 2 . Objectif de mon stage.  | 9      |
| 3 . Travaux effectués antérieurement.                                 | 10     |
| 4 . Réalisation d'une telle étude.                                    | 10     |
| <br>Matériel et méthodes.   | <br>12 |
| 1 . Extraction de l'ADN.  | 12     |
| 2 . Amplification par PCR.  | 12     |
| a- Le principe.   | 12     |
| b- Les conditions de réalisation d'une PCR.                           | 13     |
| c- La spécificité et la sensibilité de la PCR / Conditions optimales. | 14     |
| d- Représentation schématique de l'amplification par PCR.             | 15     |
| e- Amplification des gènes codant pour l'ARN 28S et L'ARN 18S.        | 17     |
| 3 . Recherche de polymorphisme de restriction (RFLP).                 | 17     |
| 4 . Visualisation des produits de PCR.                                | 19     |
| 5 . Technique de séquençage.  | 19     |
| a- L'ADN matrice.   | 20     |
| b- Méthode de détection radioactive.                                  | 20     |
| c- Amorces et cycles thermiques.                                      | 20     |

|  |               |
|--|---------------|
| d- Visualisation et identification de la séquence obtenue.     | 21            |
| e- Conditions d'un séquençage correct.                         | 22            |
| f- Avantages de la méthode.                                    | 22            |
| <br><b>Résultats / Interprétation.</b>                         | <br><b>24</b> |
| 1 . Amplification par PCR.                                     | 24            |
| a- Mise au point des conditions optimales.                     | 24            |
| b- Critères de qualité d'une PCR.                              | 24            |
| c- Conclusion.   | 25            |
| 2 . Digestions enzymatiques et profils de restriction obtenus. | 27            |
| a- Tableaux récapitulant les résultats.                        | 27            |
| b- Conclusion.   | 28            |
| 3 . Séquençage.  | 30            |
| a- Premiers essais.  | 30            |
| b- Modifications apportées.                                    | 31            |
| c- Conclusion.   | 33            |
| <br><b>Conclusion.</b>   | <br><b>34</b> |
| <br><b>Bilan personnel.</b>                                    | <br><b>36</b> |
| <br><b>Bibliographie.</b>                                      | <br><b>37</b> |
| <br><b>Annexes.</b>  |               |

# Présentation de l'IFREMER.

# Présentation de l'IFREMER.

## 1 . L'IFREMER et ses implantations géographiques.



## **2 - Présentation.**

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) gère un budget de près d'un milliard de francs, qui provient en majeure partie de la subvention que lui verse l'état et à laquelle s'ajoutent des ressources propres que son statut d'EPIC (Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial) lui permet de développer; leur évolution constitue, chaque année, une priorité de l'Etablissement.

Environ mille deux cent cinquante ingénieurs, chercheurs, techniciens et administratifs participent aux multiples missions de L'IFREMER. Ces personnels travaillent au siège social, à Issy-Les-Moulineaux, et dans les cinq centres (Boulogne-sur-Mer, Brest, Nantes, Toulon, Tahiti), dans les stations réparties le long du littoral et dans les DOM-TOM.

A ces mille deux cent cinquante agents, il faut ajouter environ six cents personnes qui travaillent dans les filiales pour valoriser la politique de recherche de l'institut auprès, notamment, des professionnels de la mer, et gérer les moyens de la flotte océanographique.

## **3 - Les missions.**

L'IFREMER est le seul organisme de recherche français dont la vocation soit exclusivement maritime.

Il a reçu des missions multiples par le texte fondateur de l'institut (décret de 5 juin 1984).

Organisme de recherche finalisé, il mène ses actions propres dans le domaine des connaissances fondamentales et appliquées et des techniques liées à de grands enjeux scientifiques et technologiques ou de société (évaluation et mise en valeur des ressources de la mer - en particulier des ressources vivantes -, protection de l'environnement côtier).

En tant qu'EPIC, il a la mission de valoriser le résultat de ses travaux dans les entreprises. Il doit donc développer et mobiliser ses compétences pour renforcer la compétitivité des entreprises françaises du secteur maritime (industrie, pêche, aquaculture) pour affronter la concurrence internationale.

Il doit aussi jouer un rôle stimulant sur les projets et programmes de tous les acteurs de la recherche nationale en s'appuyant sur l'expertise de ses propres laboratoires.

Centre d'expertise, il apporte à l'état, aux collectivités locales et à l'administration son concours pour l'exercice de leurs responsabilités, sous forme d'avis, notamment pour le contrôle de la qualité des produits de la mer et du milieu marin.

Agence de moyens, L'IFREMER a la charge de la construction, de la programmation et de la mise en oeuvre de la flotte océanographique française et des moyens lourds associés; ceux-ci doivent être au service de la communauté scientifique nationale. Par ses actions de recherche technologique, l'institut contribue à perfectionner et à renouveler les engins et l'instrumentation, nécessaires à la recherche pour l'exploitation des données satellitaires

Centre de production et de diffusion de connaissances scientifiques et techniques, l'IFREMER contribue également à la formation à la recherche et par la recherche, d'ingénieur et de techniciens.

C'est enfin, un acteur de la politique extérieure de la France, notamment par le déploiement de la flotte océanographique française sur les océans et par l'accueil, à bord, de scientifiques étrangers.

## **4 - Station de La Tremblade.**

Le laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie (GAP), a été créé à la fin de l'année 1994, suite à une réorganisation de l'ancien laboratoire des Ressources Aquacoles de La Tremblade, puis remanié en 1996.

Initialement composé de quatre unités de recherche:

- l'unité de Recherche en Génétique (URGE),
- l'unité de Recherche Aquacole en Poitou-Charentes (URAPC),
- L'unité de Recherche Aquacole en Pays de Loire (URAPL),
- L'unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales (URPIG),

le laboratoire est désormais éclaté en trois laboratoires distincts:

- le laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie (GAP), sous la direction d'André GERARD,
- le laboratoire Régional Conchylicole de Poitou-Charentes (RCPC), sous la direction de Philippe GOULLETQUER,
- le laboratoire Conchylicole des Pays de Loire (RCPL), sous la direction de Jean-Pierre BAUD.

Les programmes menés au GAP, sous la responsabilité de la Direction des Ressources Vivantes (DRV), concernent la conchyliculture.

Comme son nom l'indique, les activités de la DRV couvrent l'étude de toutes les espèces vivantes de la mer, faune et flore, ainsi que l'exploitation qui en est faite. Le secteur économique de la pêche et de l'aquaculture est important, et la Direction des Ressources



Vivantes travaille en concertation avec les professionnels, les administrations en charge de ce secteur, qu'elles soient nationales ou européennes.

La DRV se compose de trois départements et un service:

- le Département des Ressources Halieutiques (RH),
- le Département des Ressources Aquacoles (RA),
- le Département "Valorisation des Produits" (VP),
- le Service d'Economie Maritime (SEM).

Outre le développement de programmes thématiques spécifiques à la génétique et la pathologie générale, l'association au sein d'un même laboratoire de pathologistes et de généticiens, relève de particularités des maladies infectieuses chez les invertébrés marins, et plus particulièrement des moyens de lutte à mettre en oeuvre contre ces dernières.

Les principaux objectifs du GAP visent essentiellement à développer des programmes sur les mollusques bivalves dans les domaines de:

la génétique:

sélection de souches d'huîtres plates *Ostrea Edulis* résistantes aux parasitoses,  
sélection de souches d'huîtres creuses,  
polyploïdisation des principales espèces d'intérêt commercial,  
obtention de lignées pures et recherche de marqueurs génétiques  
acclimatation et hybridations inter-spécifiques de différentes espèces du genre *Crassostrea*,

et de

la pathologie:

surveillance des ressources conchyliques,  
identification des agents pathogènes,  
description de leur cycle de développement,  
mise au point des techniques de reproduction expérimentale des maladies,  
développement d'outils performants de diagnostic utilisables à des fins de  
recherche ou de contrôle,  
étude de l'impact de ces maladies et de leur évolution géographique et temporelle,  
étude des mécanismes cellulaires de défense mis en jeu par les mollusques dans  
certaines maladies.

C'est au sein de l'unité de Recherche en génétique du GAP que j'ai effectué mon stage de 11 semaines.

## **5 . Le personnel.**

Le responsable:

André GERARD

Les cadres:

Pierre BOUDRY            mon responsable de stage  
Marc BARRE  
Franck BERTHE  
Emmanuel GOYARD  
Tristan RENAULT  
Anne THEBAULT

Les techniciens:

Bruno CHOLLET  
Nathalie COCHENNEC  
Philippe HAFFNER  
Serge HEURTEBISE  
Cécile LIPART  
Christophe LEDU  
Pascal PHELIPOT

Les doctorans:

Bertrand COLLET  
Sophie LAUNEY  
Quinggang XUE

# Présentation du sujet.

# Présentation du sujet.

## 1. Le contexte scientifique

En France, ainsi que dans de nombreux autres pays, l'histoire de l'ostréiculture est émaillée d'une succession de phases de développement, de surexploitation et d'apparition de maladies qui perturbent lourdement la profession.

Depuis la disparition massive de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, victime entre 1969 et 1971 d'une épidémie virale et l'effondrement de l'élevage de l'huître plate *Ostrea edulis* dû à deux parasitoses, la marteillose et la bonamiose, l'ostréiculture française connaît actuellement une situation de monoculture de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*, suite à l'introduction de l'espèce entre 1971 et 1975 (Grizel et Héral, 1991).

Pour tenter de remédier à cette situation de monoculture, qui reste une des inquiétudes majeures des professionnels, la région Poitou-Charentes a apporté une aide financière pour la création d'un "conservatoire de souches", implanté dans les locaux du Laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie de La Tremblade.

Les principaux objectifs sont d'étudier les possibilités d'acclimatation des huîtres étrangères dans les eaux françaises afin de diversifier la production ou de préparer une éventuelle substitution à *C. gigas* en cas d'épizootie majeure, de développer des hybrides intra et inter-spécifiques au sein du genre *Crassostrea* (performants en ce qui concerne la résistance aux maladies parasitaires, la croissance et la fertilité) et enfin d'effectuer une étude de la différenciation génétique (intra et inter-spécifique).

La différenciation des huîtres repose sur plusieurs paramètres qui sont :

- l'origine géographique,
- la morphologie (forme et longueur de la coquille, longueur de la charnière ...),
- la possibilité de croisements entre deux espèces ce qui entraîne la production d'hybrides (dont on étudie la viabilité et la fertilité)

Cependant, ces paramètres ne sont pas suffisants pour classer correctement toutes les populations du fait de la plasticité phénotypique (c'est à dire que deux individus d'une même espèce peuvent évoluer différemment en fonction des conditions du milieu et de ce fait, présenter des caractères morphologiques quelque peu modifiés), c'est pourquoi il faut se tourner vers des méthodes plus précises et utiliser des outils moléculaires et génétiques (Palumbi, 1996). La recherche de marqueurs moléculaires est en effet un des moyens les plus efficaces pour caractériser les populations et les espèces. Elle peut se faire à différents niveaux: sur l'ADN nucléaire ou mitochondrial (Banks et al., 1993; O'Foighil, 1992).

La technique qui a été privilégiée jusqu'à aujourd'hui repose sur la recherche de polymorphisme de fragments de restriction, fragments préalablement amplifiés par PCR.

Cette méthode a notamment été sélectionnée car elle présente un certain nombre d'avantages :

- c'est une technique relativement légère et applicable à un grand nombre d'échantillons,
- il y a possibilité de mise en oeuvre au Laboratoire de biologie moléculaire de La Tremblade,
- il y a "compatibilité" avec les marqueurs microsatellites (collections d'ADN génomique),
- il y a possibilité, par la suite, de séquencer ces fragments directement à partir des produits de PCR, et cela afin d'obtenir des informations sur les relations phylogéniques entre les espèces.

C'est aussi une étape nécessaire et incontournable dans l'étude des potentialités d'acclimatation de ces espèces sur les côtes françaises.

Au cours de mon stage, trois populations d'huîtres ont été mises à ma disposition:

- + des huîtres de palétuviers (Guyane - Mont Sinery) *Crassostrea Rhizophoreae*. Cette population est désignée "SIN"
- + des huîtres de Casamance (Sénégal - Kafountine) *Crassostrea Gasar*. Cette population est désignée "NOB"
- + des huîtres du Sénégal *Crassostrea Gasar*. Cette population est désignée "PIC"

Il semblerait que la côte Est Américaine soit peuplée d'individus de l'espèce *Crassostrea rhizophoreae* et que la côte Ouest Africaine, d'individus de l'espèce *Crassostrea Gasar*. Il apparaît intéressant d'essayer de déterminer si ces populations appartiennent à la même espèce ou non, étant donné leur répartition géographique, ce qui permettrait d'apporter des éléments nouveaux sur les éventuels transferts et importations, et sur une possible évolution à partir de la même espèce, en fonction des conditions environnementales.

## **2. Objectif de mon stage:**

L'objectif de mon stage est de déterminer si ces trois populations "NOB", "SIN" et "PIC", appartiennent à la même espèce ou non, et ceci dans le but de mieux connaître la phylogénie des huîtres du genre *Crassostrea*.

### **3 . Travaux effectués antérieurement:**

Il est à noter qu'au sein du laboratoire, cette étude a été entamée en début d'année 1997. En effet, un étudiant en BTS technologie (2<sup>ème</sup> année), Stéphane Croses, a débuté les recherches sur ces trois populations. Il a effectué des expérimentations sur de l'ADN nucléaire (le fragment 28 S qui code pour l'ARN 28 S de la grosse sous-unité du ribosome 80 S), de l'ADN mitochondrial (le fragment 16 S et le fragment COI (gène de la cytochrome oxydase c)). Après amplifications par PCR, il a soumis les produits obtenus à des digestions enzymatiques par des endonucléases de restriction. Les PCR n'ayant donné que de faibles résultats dans le cas des fragment COI et 28 S (produits peu amplifiés et donc non exploitables), les expériences ont été réalisées principalement sur l'ADN 16 S.

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence, les sites de coupures reconnus par les enzymes testées sont les mêmes pour les trois populations étudiées. Il n'a donc été observé aucun polymorphisme. De plus, il apparaît du point de vue phylogénétique que ces trois populations se placent de façon intermédiaire entre *Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica*.

Il ressort de ces travaux que les populations étudiées sont proches les unes des autres du point de vue de la phylogénie, mais il ne peut être affirmé, malgré les similitudes observées pour les sites de clivages, qu'elles appartiennent à la même espèce. (Dans le cas de différences, il est possible de conclure à des divergences d'espèces, mais dans le cas de similitudes, un test approfondi est nécessaire: le séquençage de l'ADN).

### **4 . Réalisation d'une telle étude:**

L'ADN utilisé lors des manipulations, préalablement extrait par la méthode classique dite au Phénol / Chloroforme, est soumis à une amplification par PCR, ceci dans le but d'obtenir suffisamment de matériel pour la suite des expériences. Les produits de PCR obtenus subissent ensuite des digestions enzymatiques par des endonucléases de restriction afin de déterminer le polymorphisme de restriction. Cela n'étant pas suffisant pour en déduire l'appartenance à une même espèce, les fragments étudiés sont séquencés à l'aide d'un protocole approprié.

Le matériel le plus utilisé lors des études de phylogénie est l'ADN codant pour l'ARN ribosomal, et cela parce qu'il est relativement bien conservé au cours de l'évolution, ce qui en fait un outil tout à fait approprié. De plus, ces ADN sont facilement extraits et peuvent être directement séquencés. Mon étude, elle, portera essentiellement sur l'ADN 28S qui code pour l'ARN 28S de la grande sous-unité ribosomale. Le choix d'un tel matériel est basé sur deux raisons principales:

- cet ADN est une séquence très conservée et relativement peu étudiée, et de ce fait représente un outil intéressant,
- la possibilité d'alignement des séquences d'après les travaux de Littlewood (1994).

Les digestions sont donc effectuées sur de l'ADN 28 S et de l'ADN 18 S (cela m'a par ailleurs permis de tester de nouvelles amorces 18 S), tandis que le séquençage est réalisé sur de l'ADN 28 S et de l'ADN 16 S (ceci dans le but de vérifier si le kit est fonctionnel et si le séquençage est correct, en contrôlant, sur des espèces comme *C.gigas*, dont les séquences 16 S sont déjà connues; et de plus, le séquençage sur l'ADN 28 S reste assez délicat, ce fragment ayant une longueur de 1300 paires de bases).

# Matériel et méthodes.



# Matériel et méthodes.

## 1 . Extraction de l'ADN

L'ADN utilisé lors des manipulations a été préalablement extrait à partir de tissus (manteau ou branchies), prélevés par biopsie. La technique d'extraction utilisée est celle dite au Phénol / Chloroforme. Elle se déroule selon trois étapes: (ANNEXE 1)

- **dissociation** des tissus et destruction des membranes cellulaires: les tissus sont déposés dans un tampon d'extraction contenant de la protéinase K (qui agit en détruisant les protéines), du sodium dodécil sulfate (SDS: détergent ionique qui se fixe uniformément sur toutes les protéines et les dénature en les chargeant négativement), et de l'EDTA (qui est un agent chélatant qui va complexer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  indispensables à la cohésion cellulaire et les ions  $\text{Mg}^{2+}$ , cofacteurs des DNases).

- **extraction** au Phénol / Chloroforme: le mélange, après une incubation d'une nuit à 55°C, est additionné de Phénol (déprotéinisant puissant). La phase aqueuse, qui contient les acides nucléiques, est prélevée après centrifugation. Pour éliminer les traces de Phénol, une extraction de Chloroforme + isoamylalcool peut-être effectuée.

- **lavage** par précipitation des acides nucléiques: il est réalisé par l'action d'une solution d'alcool à 70° à une température de - 20°C. Il y a alors précipitation des acides nucléiques (ARN et ADN), les produits utilisés lors de l'extraction peuvent être éliminés et le culot est redissout dans du tampon TE.

Nous obtenons, à la fin de ces manipulations, un mélange ADN / ARN. La présence de l'ARN n'est cependant pas gênante pour la suite des expériences car la Taq polymérase est une ADN polymérase / ADN dépendante.

## 2 . Amplification par PCR

### a . Le principe:

La PCR (Réaction de polymérisation en chaîne), inventée par K. Mullis en 1983, est une des techniques de base en biologie moléculaire.

Elle permet l'amplification de fragments d'ADN choisis en exploitant les caractéristiques du processus de réplication. En effet, le principe de la PCR consiste à effectuer de multiples réplifications de l'ADN *in vitro* à l'aide de deux amorces (amplimères) complémentaires des extrémités de la séquence à amplifier. Le nombre de copies croît de manière exponentielle avec le nombre de cycles.

Cette technique se décompose en trois étapes:

**-Dénaturation:**

la séquence d'ADN à amplifier doit se trouver sous forme monocaténaire. La PCR nécessite donc une étape de dénaturation de la double hélice d'ADN. Cette séparation complète des deux brins de la matrice est réalisée par un chauffage à 94°C.

**-Annealing ou hybridation des amorces:**

durant cette phase, la température est abaissée et les amorces vont s'apparier spécifiquement avec les régions flanquant le fragment à amplifier. La température doit être choisie avec soin de façon à ne pas favoriser les hybridations non spécifiques (ici à 50°C).

**-élongation:**

à partir de l'extrémité 3'OH libre des amorces, une polymérisation est réalisée par une enzyme, la Taq Polymérase qui est une ADN polymérase / ADN dépendante. Cette enzyme est extraite du micro-organisme *Thermus aquaticus* qui est une bactérie thermophile vivant dans des sources chaudes (eaux dont la température avoisine les 75°C) et résiste donc de manière convenable aux températures élevées. L'élongation est effectuée à 72°C.

L'ensemble de ces trois étapes constitue un cycle. La PCR est réalisée à raison de 30 cycles précédés d'une dénaturation initiale à 94°C pendant 1 minute et suivis par une élongation finale à 72°C pendant 7 minutes. (ANNEXE 2)

**b . Les condition de réalisation d'une PCR**

La PCR nécessite un certain nombre de facteurs pour fonctionner (Innis et Gelfand, 1990):

- une matrice d'ADN contenant le fragment à amplifier
- des amorces spécifiques des régions flanquantes de la séquence cible
- la Taq polymérase
- des dNTPs qui serviront lors de l'élongation

- du  $MgCl_2$  qui est un cofacteur de la Taq polymérase
- un tampon adéquat qui permettra de placer la Taq dans des conditions optimales de fonctionnement

### c . La spécificité et la sensibilité de la PCR / Conditions optimales

La spécificité dépend en particulier de la stabilité du complexe d'hybridation entre l'amorce et la région cible de la matrice. Les principaux facteurs qui déterminent cette spécificité sont:

+ le choix des amorces qui est fondamental pour le succès de la PCR. Elles doivent former un duplex stable avec les régions cibles dans les conditions expérimentales et ne pas s'hybrider entre elles ou sur elles-mêmes. Elles sont sélectionnées de façon à encadrer la séquence à amplifier.

+ la température d'hybridation: c'est l'étape critique de cette technique: il faut choisir avec soin la température à laquelle l'hybridation est la plus spécifique. Elle doit être suffisamment élevée pour ne permettre que les appariements avec des séquences complémentaires et donc favoriser une amplification efficace, mais ne doit cependant pas être trop forte car dans ce cas l'appariement est difficile et l'amplification de faible importance. Elle dépend en particulier des amorces (de leur longueur, du pourcentage en G-C...).

+ la concentration en  $MgCl_2$  dans le tampon de PCR: L'ADN polymérase a un besoin absolu en ions  $MgCl_2$  car ils interviennent dans la spécificité de reconnaissance des dNTPs.

+ la quantité de dNTPs présente dans le tampon: l'exactitude et la spécificité de la PCR augmentent quand la concentration en dNTPs diminue. Il doivent cependant être en quantité suffisante pour l'élongation, et il faut donc trouver un compromis.

+ la quantité de matrice: les solutions utilisées sont préparées à partir d'une solution d'ADN natif de concentration inconnue. J'ai effectué des dilutions à 5% et à 10% de cette solution mère.

+ le nombre de cycles: il est fixé à 30, car au bout d'un certain temps, l'enzyme perd de son efficacité et ne travaille plus de manière optimale.

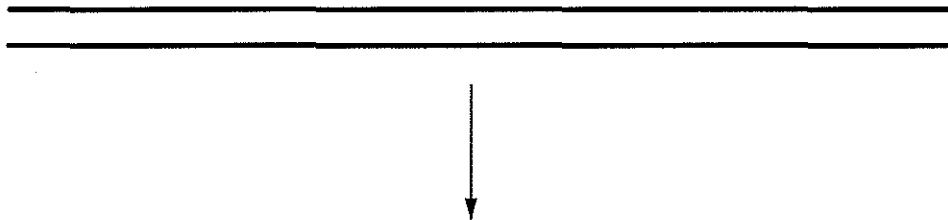
Lorsque ces conditions sont remplies, la PCR doit amplifier le fragment désiré, et seulement lui, de manière optimale.

La sensibilité de la PCR est considérablement augmentée par l'utilisation de la Taq polymérase car cette enzyme permet de travailler à des températures élevées qui favorisent les appariements spécifiques et évitent les hybridations non ou peu complémentaires des amorces avec les brins matrices. Cette ADN polymérase / ADN dépendante fonctionne bien à 72°C (sa température optimale) et reste raisonnablement stable jusqu'à 94°C.

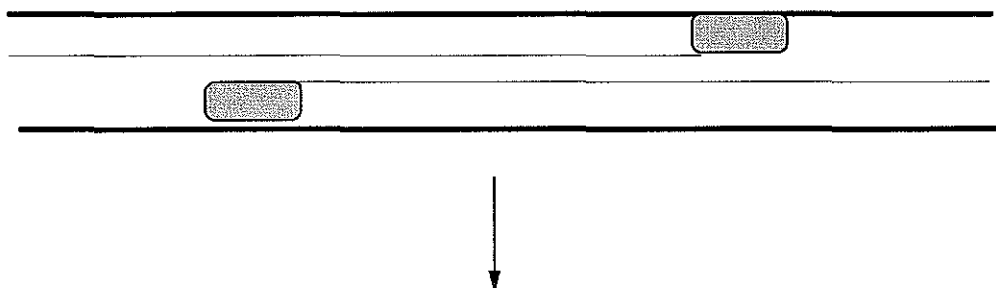
Cependant, dans les conditions de concentration et de température expérimentales, la Taq polymérase n'est pas capable d'une activité réparatrice en cas d'incorporation d'un nucléotide incorrect, et il est généralement admis que l'enzyme commet une erreur toutes les  $2.10^4$  bases.

#### **d . Représentation schématique de l'amplification par PCR**

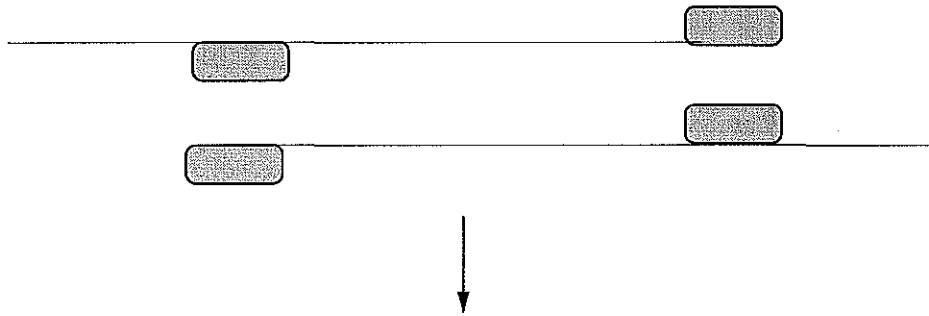
1°- Dénaturation de la matrice d'ADN.



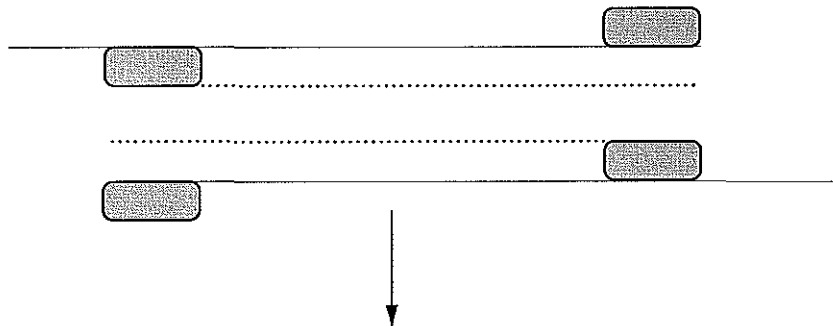
2°- Hybridation des amorces et extension à partir des extrémités 3'OH libres



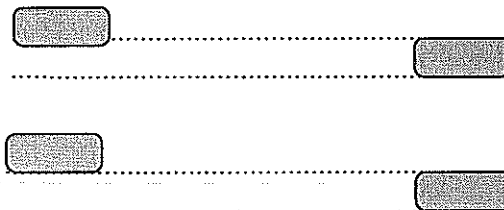
3°- Démarrage d'un deuxième cycle: après dénaturation, appariement des amorces.



4°- Extension à partir des nouvelles amorces.



5°- Au bout de plusieurs cycles, obtention d'un grand nombre de copies du fragment sélectionné



A la fin des trente cycles de PCR, le fragment choisi pour être amplifié est le produit présent en majorité dans le tube de réaction. Une vérification est effectuée sur gel d'agarose additionné de BET.

## **e . Amplification des gènes codant pour l'ARN 28 S et l'ARN 18 S.**

Dans le but d'effectuer des digestions à l'aide d'enzymes de restriction ainsi que du séquençage, l'amplification par PCR est réalisée sur de l'ADN 28 S qui code pour l'ARN 28 S de la grosse sous-unité (60 S) du ribosome et sur de l'ADN 18 S qui code pour l'ARN 18 S de la petite sous-unité (40 S) du ribosome 80 S.

**ADN 28 S :** C'est une séquence de 1300 paires de bases qui est relativement bien conservée du point de vue de l'évolution des espèces et cet état de conservation en fait un outil classique de phylogénie. (Hillis,1989).

**ADN 18 S :** C'est une séquence de 1900 paires de bases qui est, elle aussi, une région conservée et utilisée en phylogénie (Steiner G. et Müller M., 1996; Harasewych M.G et al., 1997).

L'amplification par PCR du fragment de 28 S est donc réalisée selon le protocole de l'ANNEXE 2 en utilisant les amorces données dans l'article de Littlewood (1994). Ces amorces sont spécifiques des régions flanquantes du segment à amplifier.

LSU 3 = 5'- TCCTGAGGGAACTTCGG - 3'

LSU 5 = 5'- ACCCGCTGAAYTTAAGCA - 3'

où Y= C ou T

L'amplification par PCR du fragment 18 S est réalisée selon le même protocole en utilisant les amorces données dans l'article de Medlin L. et al. ( 1988 ). Ces amorces ont cependant été modifiées, car le polylinker présent à l'extrémité 5' a été supprimé.

18 S F = 5'- AACCTGGTTGATCCTGCCAGT -3'

18 S R = 5'- TGATCCTTCTGCAGGTTTCACC -3

Une amplification est également effectuée sur de l'ADN 16S et les produits sont utilisés pour le séquençage. Les amorces utilisées sont:

16Sar = 5'- CGCCTGTTTATCAAAAACAT -3'

16Sbr = 5'- CCGGTCTGAACTCAGATCAGATCACGT -3'

## **3 . Recherche de polymorphisme de restriction (RFLP).**

Les endonucléases de restriction sont des enzymes purifiées à partir de bactéries. Les bactéries se protègent des invasions de DNA étrangers (comme les virus, par exemple ) en produisant des enzymes qui clivent le DNA infectant et empêchent ainsi la réplication et le développement des cellules parasites. Ces enzymes reconnaissent, dans le fragment d'ADN double brins, une séquence spécifique de 4 à 8 nucléotides appelé site de reconnaissance.

Une enzyme de restriction coupe la double hélice d'ADN en une série de segments spécifiques qui sont appelés fragments de restriction. En étudiant la taille de ces différents segments sur un gel d'agarose additionné de BET, il est possible de déterminer le polymorphisme inter-spécifique au niveau des sites de reconnaissance de cette endonucléase. Une taille différente dans les fragments obtenus équivaut à une différence de longueur de la séquence ou à une mutation dans le site de clivage.

Les enzymes sont déposées dans les tubes contenant les produits de PCR et maintenues en contact avec l'ADN pendant 1 à 3 heures à 37°C (sauf Taq 1 qui nécessite une incubation à 60°C). Ici, le temps d'incubation est de 2 heures. ANNEXE 3

Les endonucléases utilisées ici sont :

| Enzyme          | Origine   | Séquence reconnue |
|-----------------|---|-------------------|
| <b>Hha I</b>    | purifiée à partir d'E.coli portant le gène Hha I<br><i>d'Haemophilus haemolyticus</i>     | 5' GCG*C 3'       |
| <b>Taq I</b>    | purifié à partir d'E.coli portant le plasmide pFBLT88 et produisant cette enzyme en excès | 5' T*CGA 3'       |
| <b>Sau3A I</b>  | isolée de <i>Staphylococcus aureus</i> 3A   | 5' *GATC 3'       |
| <b>Rsa I</b>    | purifiée à partir de <i>Rhodopseudomonas sphaeroide</i>                                   | 5' GT*AC 3'       |
| <b>Mse I</b>    | purifiée à partir du <i>Micrococcus species</i>   | 5' T*TAA 3'       |
| <b>Sac I</b>    | purifié à partir d'E.coli portant le gène Sac I de <i>Streptomyces achromogenes</i>       | 5' GAGCT*C 3'     |
| <b>Hae III</b>  | purifiée à partir d'E.coli portant le gène Hae III<br><i>d'Haemophilus aegypticus</i>     | 5' GG*CC 3'       |
| <b>Hind III</b> | purifiée à partir d'E.coli portant le gène Hind III<br><i>d'Haemophilus influenzae</i> Rd | 5' A*AGCTT 3'     |

## **4 . Visualisation des produits de PCR**

Les produits obtenus après les 30 cycles de PCR , (c'est à dire le fragment sélectionné et amplifié), sont visualisés sur un gel d'agarose (1%) en utilisant le Bromure d'Ethidium (BET) comme révélateur. Le BET est un agent intercalant de l'ADN. En s'intercalant, il augmente l'espacement entre les paires de bases successives, provoque une distorsion du squelette sucre / phosphate régulier et diminue le pas de l'hélice (ANNEXE 4). Le BET permet la visualisation sous UV par fluorescence.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique de séparation et d'identification des différents constituants d'un mélange. Les produits à étudier sont additionnés de bleu de dépôt (solution qui d'alourdit l'ADN et le fait pénétrer dans le puits) puis déposés dans les puits du gel. Sous l'action d'un champ électrique, les acides nucléiques (chargés négativement) vont migrer plus ou moins loin dans le gel.

La séparation est effectuée selon la taille des molécules. En effet, les gros fragments vont être retenus dans les mailles du gel d'agarose et vont donc migrer moins vite que les petits qui vont traverser le gel sans être autant freinés.

La résolution est fonction de la concentration en agarose. Ici, le gel est préparé à 1% avec du tampon TAE 1X (TRIS Acétate EDTA) ce qui permet de visualiser de façon convenable des fragments de 100 à 2000 bases. Le BET est incorporé dans le gel d'agarose à raison de 5 µl pour 100 ml. C'est le BET qui permet de révéler les fragments présents dans le gel par visualisation sous UV.

Le marqueur de poids moléculaire, déposé lui aussi dans un puits, est un indicateur qui permet de déterminer de façon relativement précise la taille des fragments amplifiés ou digérés.

## **5 . Technique de séquençage.**

Un fragment d'ADN peut être séquencé en utilisant des méthodes chimiques ou enzymatiques.

La méthode enzymatique, employée ici, est basée sur la capacité d'une ADN polymérase / ADN dépendante à allonger une amorce ayant une extrémité 3'OH libre et



hybridée à la matrice qui doit être séquencée. Pour réaliser cette manipulation, j'ai utilisé le kit de séquençage PROMEGA (en y apportant quelques modifications, notamment en ce qui concerne les températures employées lors de la réaction). (ANNEXE 5)

La détermination de la séquence se fait par l'utilisation de quatre réactions séparées. Chacune d'entre elles contient les quatre désoxyribonucléotides (dNTPs : dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et est additionnée d'une quantité déterminée et limitée d'un des quatre didéoxyribonucléotides (ddNTPs). C'est la méthode de séquençage mise au point par Sanger.

La polymérisation s'arrête lorsqu'un ddNTPs est incorporé car, n'ayant pas d'extrémité 3'OH libre, il agit comme terminateur. L'oligonucléotide en croissance est donc stoppé, terminé sélectivement par un G, T, A, ou C selon l'analogie didéoxy contenu dans la réaction.

Les fragments résultants, chacun ayant une origine commune mais une terminaison différente (selon le ddNTP incorporé) sont séparés suivant leur taille sur un gel de polyacrylamide.

#### **a . L'ADN matrice.**

Un séquençage direct des produits de PCR est possible en utilisant une méthode comprenant des cycles thermiques. Préalablement au séquençage, une étape de purification de l'ADN matrice est conseillée. Ayant obtenu des produits suffisamment purs, j'ai tout d'abord effectué les manipulations sans aucune étape de purification. Par la suite, pour tenter d'améliorer la qualité du gel et faciliter la lecture du film photographique, les réactions ont été testées avec de l'ADN ayant subi une purification à l'aide du kit PROMEGA WIZARD.

#### **b . Méthode de détection radioactive.**

La détermination de la séquence du fragment choisi se fait à l'aide d'éléments radioactifs. Les dATPs sont marqués par du  $\alpha\text{P}^{33}$ .

Les manipulations ont également été réalisées en utilisant un marquage d'amorce (en 5') avec du  $\gamma\text{P}^{33}$  afin de comparer les deux méthodes.

#### **c . Amorces et cycles thermiques.**

La température d'appariement est le paramètre le plus critique du séquençage utilisant des cycles thermiques.

Les hautes températures d'hybridation apportent plusieurs éléments essentiels au bon déroulement du séquençage:

- la spécificité d'appariement entre l'amorce et le DNA cible,
- la réduction, et cela de façon importante, de la formation de la structure secondaire de la matrice,
- l'inhibition du réappariement de la double hélice d'ADN.

Le réappariement des deux brins et la structure secondaire de la matrice limitent l'obtention de séquences faciles à lire.

L'extension à partir du primer est initiée durant l'étape d'hybridation de chaque cycle.

A des températures assez basses, la polymérase peut rencontrer des régions de forte structure secondaire, ce qui ne facilite pas sa progression et cela conduit à la formation de signaux dans chaque ligne des quatre ddNTPs.

Pour cette raison, il est préférable de travailler à des températures les plus élevées possibles. L'enzyme utilisée étant thermostable, il n'y a aucun inconvénient à choisir des températures avoisinant les 94°C pour l'étape de dénaturation et les 72°C pour la polymérisation.

L'amorce utilisée pour le séquençage est une de celles employées pour l'amplification par PCR, c'est à dire LSU 3. (Il est possible d'avoir recours à des primers internes lors du séquençage ce qui permet d'obtenir la séquence du fragment voulu sans celles des régions flanquantes de celui-ci).

Le kit de séquençage contient un témoin de contrôle: il s'agit de réaliser les quatre réactions avec cet ADN et il est alors possible de vérifier si le séquençage a été correctement effectué en comparant la séquence lue sur le film et celle donnée par le protocole.

#### **d . Visualisation et identification de la séquence obtenue.**

Les produits de séquençage obtenus dans les différentes réactions sont séparés sur des gel de polyacrylamide. (ANNEXE 6 )

La vitesse de migration des fragments de DNA est fonction du voltage utilisé, mais surtout du poids moléculaire de ces différents segments. Les molécules vont donc migrer plus vite si elles sont plus petites. Après révélation sur un film photographique, la lecture se fait directement à partir du bas.

### **e . Conditions d'un séquençage correct.**

- matrice relativement purifiée. Cependant, dans le cadre de mes manipulations, cela n'est pas un paramètre augmentant la qualité du séquençage.

- enzyme polymérase fonctionnelle à températures élevées. La Taq étant thermostable est, dans ce cas, tout à fait appropriée .

- la température d'annealing suffisamment élevée pour éviter les appariements non spécifiques et favoriser une hybridation complémentaire entre amorce et matrice.

- la température d'élongation doit aussi être suffisamment élevée pour éviter le réappariement de la double hélice et la formation d'une structure secondaire qui ne faciliterait pas la polymérisation

### **f . Avantages de la méthode.**

L'utilisation d'un protocole de séquençage comprenant des cycles thermiques procure à cette méthode plusieurs avantages sur les stratégies de séquençage conventionnel.

Premièrement, ce protocole entraîne une amplification linéaire de la matrice de DNA. En utilisant un marquage au  $\alpha P^{33}$  , plus de 450 paires de bases de la séquence peuvent être obtenues à partir d'une quantité de départ de DNA de 4 fmol.

Deuxièmement, les hautes températures employées durant chaque cycle de dénaturation évitent d'avoir recours à une dénaturation alcaline et une précipitation à l'éthanol de la matrice double brins. De plus, cette étape de dénaturation élimine les problèmes de réappariement rapide des brins linéaires de DNA.

Troisièmement, les hautes températures augmentent la spécificité d'appariement et permettent ainsi un séquençage correct du fragment amplifié.

Quatrièmement, la température de polymérisation, elle aussi suffisamment élevée, évite la formation de la structure secondaire de la matrice de DNA ce qui facilite l'élongation et favorise l'incorporation des nucléotides adéquats.

Enfin, un des avantages les plus intéressants concernant ce protocole, c'est qu'il n'est pas nécessaire de passer par une étape de clonage, ce qui allège considérablement les manipulations.

Pour tous ces avantages, un tel protocole doit constituer un outil de séquençage fiable et relativement facile d'utilisation.

# Résultats / Interprétation.

# Résultats / Interprétation.

## 1 . Amplification par PCR.

La technique de recherche du polymorphisme de fragment de restriction (RFLP) nécessite au préalable une amplification par PCR du fragment choisi. Ici, il s'agit des fragments 28 S et 18 S.

Le fragment 28 S représente le matériel sur lequel porte l'ensemble de mes expérimentations (amplification, digestions enzymatiques, séquençage), tandis que le fragment 18 S (dont les amorces utilisées pour l'amplification doivent être testées) ne peut pas être étudié pour le séquençage, car il n'existe, à ma connaissance, aucun segment 18 S d'huître séquencé qui me permettrait de pouvoir "classer" mes populations parmi les autres espèces.

Une amplification est également réalisée sur l'ADN 16S et ce fragment est utilisé lors du séquençage.

### a . Mises au point des conditions optimales.

Température d'annealing: les températures de dénaturation et d'élongation utilisées ici sont celles rencontrées le plus fréquemment dans les protocoles. En revanche, la température d'annealing varie selon les manipulateurs. Lors de ce stage, plusieurs températures d'hybridation ont été testées (de 45°C à 56°C) pour finalement effectuer les expériences à 50°C, cette température apportant des résultats satisfaisants.

Durée des cycles: le protocole utilisé pour l'amplification préalable aux digestions par enzymes de restriction est celui employé par Littlewood (ANNEXE 2). Ce protocole me permet d'obtenir les résultats escomptés, c'est à dire une seule bande (= un seul fragment amplifié) et de taille attendue.

J'ai ensuite testé un autre protocole (ANNEXE 2) qui a l'avantage d'être plus rapide que le précédent, (en conservant des conditions de températures identiques). Cela m'a permis de constater qu'il n'est pas nécessaire d'effectuer de longs cycles pour obtenir de bons résultats car le fragment désiré est bien amplifié de manière correcte. Ce protocole est utilisé pour obtenir la matrice d'ADN employée lors du séquençage.

### b . Critères de qualité d'une PCR.

Il est possible de déterminer la qualité de la réaction d'amplification lors de la visualisation sur gel d'agarose, et cela, grâce au marqueur de taille (indicateur de poids

moléculaire) et au BET qui permet d'observer une fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN.

Plusieurs critères sont retenus pour estimer la qualité de l'amplification:

- l'obtention d'une bande unique sur le gel: l'amplification par PCR est une technique permettant d'obtenir un nombre important de copies du fragment choisi. La présence de plusieurs bandes révèle un manque de spécificité des amorces lors de l'appariement à la matrice et le produit de PCR est alors composé d'un mélange de plusieurs segments non recherchés.

- la taille du fragment amplifié: il est à noter que si la température d'annealing est trop faible, un phénomène de compétition peut apparaître entre plusieurs fragments. Il est possible que le fragment le plus amplifié (la bande la plus fluorescente sur le gel et même parfois la seule visible) ne soit pas celui attendu, c'est à dire qu'il n'a pas le bon poids moléculaire.

- la quantité de produit amplifié: il est nécessaire d'obtenir une bande de fluorescence importante (ceci est lié à la quantité de produit d'amplification), car le produit, une fois digéré par les enzymes de restriction doit être encore détectable sur un gel d'agarose. Lorsqu'il y a coupure, il y a répartition et donc atténuation de la fluorescence.

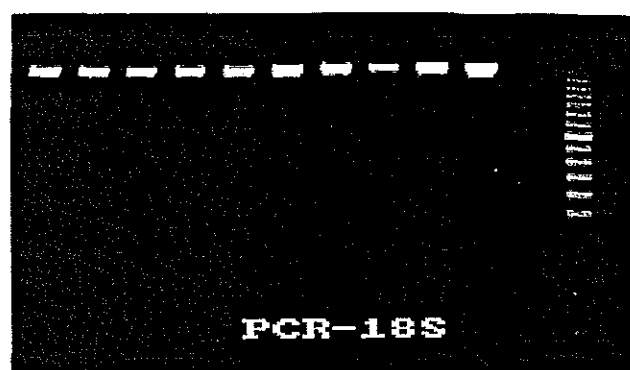
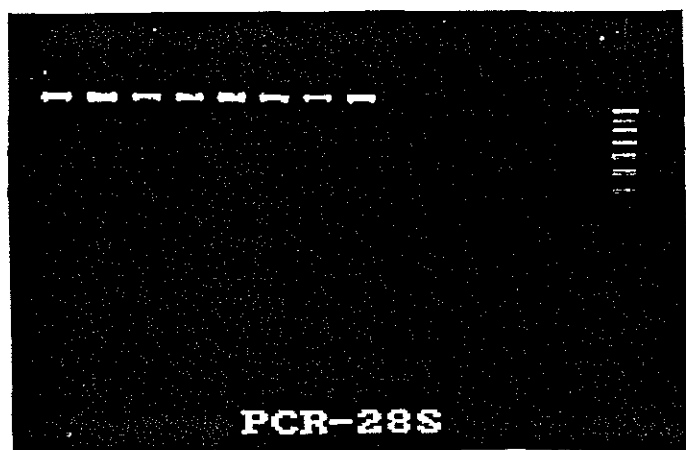
- l'absence de contamination: ceci est vérifié grâce à un tube témoin négatif qui contient tous les réactifs nécessaires à l'amplification, comme les autres tubes, mais ne contient pas d'ADN. Lors de la visualisation sur gel d'agarose, aucun signal ne doit apparaître dans ce puits. La PCR étant une technique très sensible, il arrive parfois qu'un ADN exogène soit amplifié.

### **c . Conclusion.**

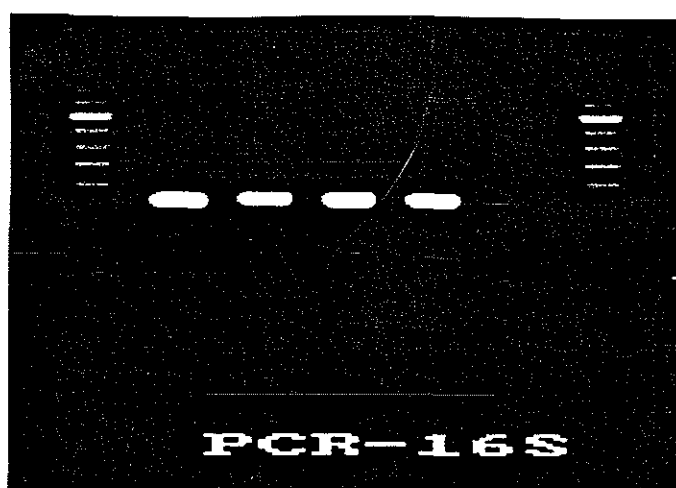
Comme attendu, l'amplification du fragment 28 S m'a permis d'obtenir une grande quantité de copies d'un ADN de 1300 paires de bases et celle du 18 S, de 1900 paires de bases et celle du fragment 16S, un de 570 paires de bases(FIGURE Ia et Ib).

A partir d'une amplification satisfaisante, les digestions enzymatiques et le séquençage peuvent être envisagés.

**Figure Ia:** visualisation sur gel d'agarose de l'amplification par PCR des fragments 28S et 18S.



**Figure Ib :** visualisation sur gel d'agarose de l'amplification du fragment 16S.





## 2 . Digestions enzymatiques et profils de restriction obtenus.

### a . Tableaux récapitulant les résultats.

Les produits obtenus suite à l'amplification par PCR sont soumis à des digestions enzymatiques par des endonucléases de restriction. A l'aide des profils de restriction observés, il est possible de déterminer le polymorphisme des différents échantillons étudiés (8 par population environ).

|        | Hha I | Taq I | Sau3A I | Rsa I | Mse I | Hae III | Sac I  | Hind III |
|--------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|--------|----------|
|        | GCGC  | TCGA  | GATC    | GTAC  | TTAA  | GGCC    | GAGCTC | AAGCTT   |
| NOB 1  | a     | a     | a       | a     | a     |         |        |          |
| NOB 2  | a     | a     | a       | a     | a     |         |        |          |
| NOB 3  | a     | a     | a       |       | a     | a       | a      | a        |
| NOB 4  | a     | a     |         |       | a     | a       | a      | a        |
| NOB 5  | a     | a     | a       |       |       | a       | a      | a        |
| NOB 7  | a     |       | a       |       |       | a       | a      | a        |
| NOB 8  | a     |       | a       |       |       |         |        |          |
| SIN 1  | a     | a     | a       | a     |       |         |        |          |
| SIN 2  | a     | a     | a       | a     |       |         |        |          |
| SIN 3  | a     | a     |         |       | a     | a       | a      | a        |
| SIN 4  | a     |       |         |       | a     |         |        |          |
| SIN 21 | a     | a     | a       |       | a     | a       | a      | a        |
| SIN 23 | a     |       | a       |       |       |         |        |          |
| SIN 24 | a     |       | a       |       |       |         |        |          |
| PIC 1  | a     | a     | a       | a     |       |         |        |          |
| PIC 2  | a     | a     |         | a     |       |         |        |          |
| PIC 3  | a     | a     |         |       | a     | a       | a      | a        |
| PIC 4  | a     | a     | a       |       | a     | a       | a      | a        |
| PIC 5  | a     | a     |         |       |       | a       | a      | a        |
| PIC 6  | a     | a     |         |       |       | a       | a      | a        |
| PIC 7  | a     |       | a       |       | a     |         |        |          |
| PIC 8  | a     |       | a       |       |       |         |        |          |
| PIC 9  | a     |       | a       |       | a     |         |        |          |
| Cs 1   | b     | b     | b       |       |       |         |        |          |
| Cvc 33 | a     | a     | a       |       |       | b       | b      | b        |
| Cgt 2  |       |       |         |       |       | a       | a      | a        |
| Cgt 1  |       |       |         |       |       | a       | a      | a        |

Tableau 1: résultats des digestions par les enzymes de restriction sélectionnées sur l'ADN 28 S des échantillons étudiés (légende page 29)

où Cs= *C.sikamea*  
Cvc= *C.virginica*  
Cgt= *C.gigas*

|        | Hha I | Taq I | Sau3A I | Rsa I | Mse I | Hae III | Sac I  | Hind III |
|--------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|--------|----------|
|        | GCGC  | TCGA  | GATC    | GTAC  | TTAA  | GGCC    | GAGCTC | AAGCTT   |
| NOB 1  | a     | a     | a       | a     | a     | a       | a      | a        |
| NOB 2  | a     | a     | a       | a     | a     |         | a      | a        |
| NOB 3  | a     | a     | a       | a     | a     |         |        | a        |
| NOB 4  | a     | a     | a       | a     | a     |         |        | a        |
| NOB 5  | a     | a     | a       | a     | a     | a       | a      |          |
| NOB 7  | a     |       |         | a     | a     | a       | a      | a        |
| SIN 1  | a     | a     | a       | a     | a     | a       | a      | a        |
| SIN 2  | a     | a     | a       | a     | a     | a       | a      | a        |
| SIN 3  | a     | a     | a       | a     | a     |         |        | a        |
| SIN 4  | a     | a     | a       | a     | a     |         |        | a        |
| SIN 21 |       | a     |         | a     | a     | a       | a      | a        |
| PIC 1  | a     | a     | a       | a     | a     | a       | a      | a        |
| PIC 2  | a     | a     | a       | a     | a     | a       | a      | a        |
| PIC 3  | a     | a     | a       | a     | a     |         |        | a        |
| PIC 4  | a     |       |         | a     | a     |         |        | a        |
| PIC 5  | a     | a     | a       | a     | a     | a       | a      |          |
| PIC 6  | a     | a     | a       |       |       | a       | a      | a        |
| PIC 7  | a     | a     | a       |       | a     |         |        | a        |
| PIC 8  |       | a     |         |       | a     |         |        | a        |
| PIC 9  |       |       |         |       | a     |         |        |          |
| Cs 1   | b     | a     |         | b     | a     | a       | a      | a        |
| Cvc 33 | a     | a     | a       | a     | a     | a       | a      | a        |
| Cgt 1  | b     |       |         |       | a     |         |        | a        |
| Cgt 2  |       | a     |         | c     | a     | a       |        |          |

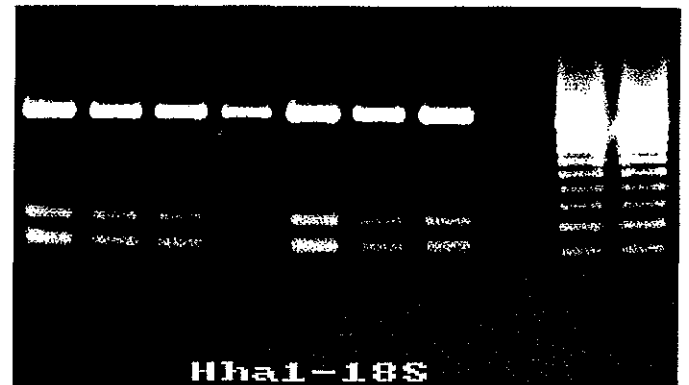
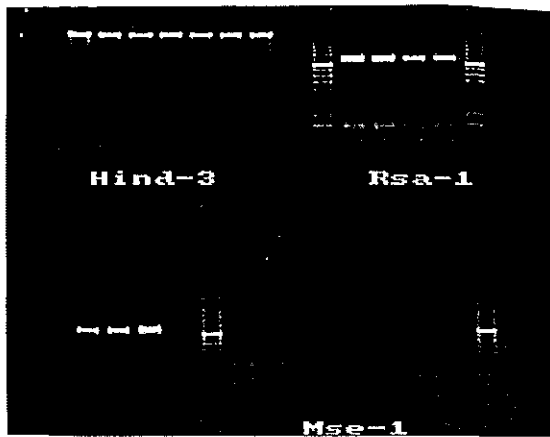
Tableau 2: résultats de digestions par les enzymes de restriction sélectionnées sur le fragment 18 S des échantillons étudiés. (légende page 29)

## **b . Conclusion.**

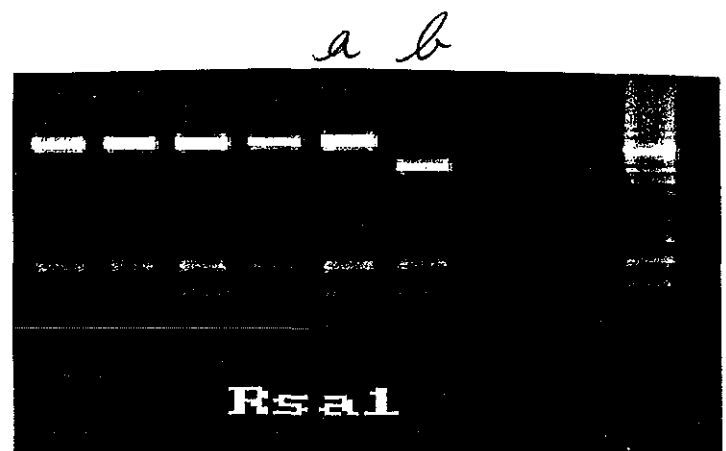
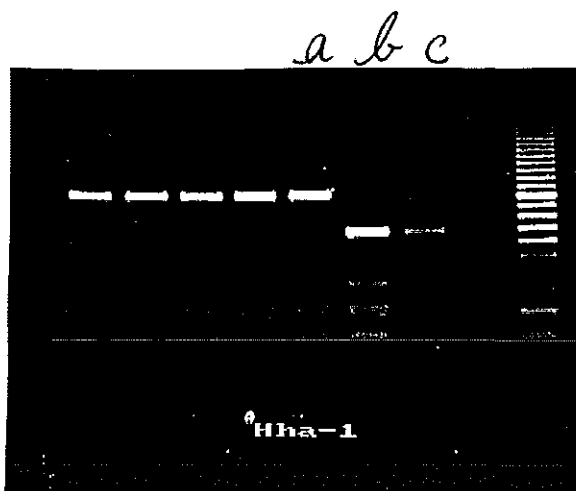
Les résultats étant très reproductibles, (sauf dans le cas de Sau3A I car les réactions effectuées avec cette enzyme montrent parfois des digestions partielles, et cela même lorsque les conditions d'incubation restent constantes d'une manipulation à l'autre), il est possible de donner quelques précisions concernant la classification de ces trois espèces.

Il apparaît très nettement que les fragments 28 S et 18 S sont très conservés au cours de l'évolution. Les populations étudiées ( NOB, SIN, et PIC ) ne semblent pas appartenir à des espèces différentes (figure IIa).

**Figure IIa:** résultats de digestion enzymatique des fragments 28S et 18S des trois populations étudiées.



**Figure IIb :** résultats des digestions enzymatiques des fragmeznts 28S et 18S des trois populations étudiées et d'autres espèces (*C.gigas* et *C.virginica*)



Il ressort également de ces manipulations que les échantillons étudiés présentent des différences par rapport aux espèces *C. gigas*, *C. sikamea* et *C. virginica* (figure IIb).

Il est à noter que je n'ai pas testé toutes les enzymes disponibles au laboratoire, car je n'ai sélectionné que celles présentant le plus vif intérêt. Par exemple, une enzyme montrant des différences entre certaines espèces au niveau des sites de coupures mais qui sectionne le fragment de façon trop fréquente n'est pas un outil efficace, car cette méthode, facile d'utilisation, est cependant peu résolutive (les petits fragments ne sont pas décelés sur le gel).

### **3 . Séquençage.**

Au vu des résultats obtenus lors des digestions enzymatiques, les échantillons étudiés semblent être proches les uns des autres du point de vue génétique. Cependant, pour conclure sur l'appartenance à une seule et même espèce, certaines manipulations supplémentaires sont nécessaires. C'est pourquoi, à partir des produits de PCR obtenus pour les mêmes échantillons, le séquençage du fragment 28 S doit être réalisé. Ceci constitue la deuxième partie de l'étude menée durant ce stage.

Tout d'abord, il est nécessaire de tester le kit afin de vérifier son bon fonctionnement. Pour cela , une réaction est effectuée avec l'échantillon contrôle présent dans le kit. Il s'agit de séquencer une partie de l'ADN du plasmide pGEM (+3Z). Cette manipulation est réalisée dans les mêmes conditions que l'ensemble des réactions de séquençage: ANNEXE 5 (excepté la quantité d'ADN qui est réduite à 5 µl en complétant par de l'eau milliQ). Le résultat est satisfaisant, il est possible de retrouver la séquence de ce plasmide. (L'homologie entre la séquence du plasmide et celle lue sur le film est montrée en ANNEXE 7).

A partir de ces observations, il semble donc que le séquençage du fragment 28 S soit envisageable.

#### **a . Premiers essais.**

Il sont effectués en utilisant le protocole de l'ANNEXE 5, sur quelques échantillons. Les échantillons choisis sont ceux pour lesquels l'amplification ne pose aucun problème ( elle est réalisée selon le deuxième protocole testé). Après réaction de séquençage, migration pendant deux heures et exposition durant une nuit, les films se révèlent peu, voire pas du tout, analysables du fait d'un bruit de fond assez important: il apparaît des signaux plus ou moins intenses dans chaque puits, ce qui rend la lecture difficile et aléatoire (car elle est alors subjective!).

## **b . Modifications apportées.**

### **En ce qui concerne les difficultés d'ordre technique**

Afin d'améliorer les résultats, quelques modifications sont apportées au protocole. Il est en effet nécessaire de changer certains paramètres de réaction pour approcher les conditions optimales. Pour cela, les manipulations sont effectuées en faisant varier un paramètre par réaction. Ces modifications portent sur:

- la matrice d'ADN utilisée: plusieurs modifications sont testées concernant la matrice d'ADN.

- Les premiers tests sont effectués en suivant le protocole du kit pour les quantités d'ADN utilisées, c'est à dire que le mix de la réaction comprend en quantité égale produits de PCR et eau milliQ. Il apparaît des signaux très faibles ce qui montre que la matrice est présente en quantité trop faible pour la réaction de séquençage.

- J'ai ensuite réalisé les manipulations à partir des produits de PCR n'ayant subi aucun traitement, mais en multipliant la quantité de matrice par deux (l'eau est en totalité remplacée par les produits de PCR). Les films présentent des signaux non lisibles de façon aisée, mais cependant déchiffrables (des lectures répétées donnent, aux erreurs près, la même séquence).

- Pour vérifier si cela est du à la présence de fragments parasites dans les produits de PCR, ces derniers sont purifiés à l'aide du kit de purification PROMEGA WIZZARD (ANNEXE 8). Le contrôle sur gel d'agarose révèle la présence d'une seule bande. La réaction de séquençage effectuée avec ces produits purifiés ne montrent quasiment aucun signal. La lecture est difficile, voire impossible à réaliser. Ces observations me permettent de conclure que le fait de purifier les produits de PCR entraîne une perte de matériel trop importante (malgré l'intensité élevée de la bande sur le gel d'agarose) et que la réaction de séquençage se fait alors difficilement.

- la température d'hybridation: fixée au départ à 50°C, elle est élevée à 54°C pour augmenter la spécificité d'appariement entre l'amorce et la matrice (cette modification est effectuée également au niveau de l'amplification par PCR préalable au séquençage). L'objectif est de réduire le nombre de bandes parasites sur le film, car les premiers développés montrent des signaux dans chacun des quatre puits de la réaction ce qui pourrait résulter de la présence de plusieurs fragments dans les produits de PCR, ceux-ci ne subissant aucune étape de purification. Il n'apparaît aucune amélioration, ce qui semblerait montrer que l'amplification par PCR est très satisfaisante à 50°C, que les bandes parasites ne sont pas dues à une hybridation non spécifique.

- la quantité d'amorce employée: elle est diminuée de moitié, ce qui permet de réduire le nombre d'appariement, et de cette manière, d'augmenter la spécificité de la réaction. Cette

modification n'a pas apporté de résultats plus satisfaisants en ce qui concerne la facilité de lecture du film photographique

- la radioactivité utilisée: les expériences sont réalisées en comparant le marquage au  $\alpha P^{33}$  (incorporation directe) et au  $\gamma P^{33}$  (marquage de l'amorce en 5'). Le marquage de l'amorce est décrit dans le protocole comme étant le plus précis car le signal émis doit rester d'égale intensité dans chaque puits. Mais il semble que dans le cas d'utilisation de produits de PCR sans purification puis concentration, ce marquage ne soit pas approprié car le film, malgré une exposition prolongée ne montre qu'un faible signal.

Certains paramètres n'interviennent pas dans la qualité de la réaction, mais dans l'interprétation des résultats:

- la quantité de radioactivité: la modification de ce paramètre est directement en relation avec le temps d'exposition. Il est nécessaire d'avoir une idée précise du temps d'exposition à respecter en fonction de la quantité de radioactivité présente sur le gel. En effet, pour une même quantité de radioactivité, un temps d'exposition trop court amène à la formation de films souvent clairs où les bandes sont peu visibles, et à l'inverse, un temps trop long donne un film très sombre où toutes les bandes paraissent avoir une intensité telle qu'elles doivent être prises en compte. Ces deux extrêmes entraînent des erreurs de lecture. La quantité utilisée ici est de 0.25  $\mu$ l / 16  $\mu$ l. Il est à noter que le temps d'exposition doit être plus long au fur et à mesure que la radioactivité perd de son activité.

- le gel de polyacrylamide: la qualité du gel intervient de façon non négligeable dans l'analyse des résultats. Plusieurs problèmes peuvent survenir et empêcher une lecture facile du film. Tout d'abord la présence de bulles dans le gel, en plus de contraindre à sacrifier des puits, peut entraîner une migration non uniforme dans les quatre puits du set et donc une lecture difficile. Ensuite, le front de migration, où est effectué le dépôt, doit être bien droit pour éviter d'une part, les fuites d'un puits à l'autre (il en résulte des contaminations et des bandes dans les deux puits) et d'autre part, la migration dans un puits plus rapide que dans les autres, ce qui fausserait la lecture de la séquence.

La migration est effectuée à 50 V et dure de 2 à 5 heures selon les échantillons (le fragment 16S migre moins longtemps car la séquence est plus courte).

### **En ce qui concerne les problèmes d'alignement de la séquence lue**

Une modification a été apportée: le choix de l'amorce: les expériences ont été effectuées en utilisant l'amorce 16Sar pour le fragment 16S et, pour la plupart, avec LSU 3 dans le cas du fragment 28S. J'ai, en effet, réalisé une réaction de séquençage avec l'amorce LSU 5 du fragment 28S (pour essayer de séquencer à partir de l'autre extrémité).

### c . Conclusion.

Toutes ces modifications n'ont, en réalité, pas vraiment amélioré la qualité du séquençage ou tout au moins apporté les résultats escomptés. Je parviens pourtant à lire une séquence d'environ 200 bases qui est commune à tous les échantillons testés et retrouvée sur tous les films photographiques.

Malgré cela, je n'ai pas réussi à aligner la séquence lue sur le film avec celle donnée par Littlewood (1994), ce qui est relativement inquiétant, sachant qu'il s'agit d'une région bien conservée.

Deux hypothèses me viennent alors à l'esprit: (il est à noter que mes lectures ont été confirmées par plusieurs personnes, ce qui réduit quasiment à néant les risques d'erreur sur ce point là)

- la région des 200 bases lue sur mes films fait partie du fragment manquant dans la séquence de Littlewood (il a séquencé 900 bases sur 1300). Cette hypothèse m'apparaît tout de même assez peu plausible d'autant que les réactions ont été testées en utilisant les deux amorces de façon à retrouver par l'une des extrémités un alignement correct.

- la réaction de séquençage est effectuée de manière convenable et la séquence lue correctement, seulement, le fragment amplifié et séquencé n'est pas celui recherché, c'est à dire qu'il ne s'agit pas du fragment 28 S (et ce, malgré le fait que le poids moléculaire observé soit celui attendu).

Il semblerait tout de même que malgré les difficultés d'alignement sur les séquences déjà connues, le fragment amplifié et séquencé reste identique quel que soit l'échantillon étudié, qu'il appartienne à la population NOB, SIN ou PIC. Il n'apparaît pas de différence lors de la lecture de la séquence (aux erreurs de lecture près, c'est à dire qu'il y a parfois hésitation dans le choix de la base, l'intensité étant sensiblement la même dans deux puits adjacents). Je ne peux cependant prétendre à une conclusion digne de ce nom en ce qui concerne l'appartenance à une seule et même espèce, la lecture de la séquence portant sur 200 bases seulement.

Conclusion.



# CONCLUSION.

Après ces onze semaines de stage au laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie de Ronce-les-Bains, les résultats qui ressortent du travail effectué ne sont pas aussi approfondis et précis qu'ils promettaient d'être.

Malgré tout, la première partie de mes manipulations m'a permis d'effectuer la mise au point de protocoles d'amplification par PCR des fragments étudiés. Ainsi deux protocoles d'amplification sont fonctionnels et utilisables pour les fragments 28S et 18S, les résultats obtenus sont ceux escomptés: un seul segment est amplifié et il apparaît, en comparant avec le marqueur de poids moléculaire, comme étant le fragment recherché. L'amplification par PCR est une méthode usuelle et sensible qui présente d'un intérêt grandissant pour les études de biologie moléculaire.

En ce qui concerne les digestions enzymatiques par les endonucléases de restriction, il faut noter que cela constitue un outil rapide et facile d'utilisation, mais, bien que pratique, il reste assez imprécis et peu résolutif. Il est cependant possible d'obtenir des résultats utilisables, même si incomplets, et il est intéressant d'avoir une telle approche dans une étude comme la mienne, car cela permet d'avoir une idée plus nette du problème soulevé, d'entrevoir déjà l'orientation des résultats postérieurs et de mieux diriger les manipulations par la suite. Après quelques semaines passées à effectuer ces digestions sur l'ensemble des échantillons mis à ma disposition, je suis en mesure de confirmer les résultats obtenus antérieurement. En effet, mes conclusions sont en accord avec celles des travaux déjà réalisés au sein du laboratoire. Les trois populations étudiées ne présentent pas de différences au niveau des profils de restriction. Les sites de clivages reconnus par les enzymes se retrouvent chez tous les individus étudiés de chaque population. Il est donc possible de conclure que ces trois populations sont très proches les unes des autres du point de vue phylogénétique et pourtant très éloignées géographiquement.

De plus, il apparaît des différences très nettes par rapport à d'autres espèces comme *C. gigas* ou *C. virginica*.

Dans la seconde partie des manipulations, les résultats obtenus lors du séquençage ne sont pas ceux attendus.

J'ai en effet rencontré quelques difficultés lors de ces expériences. Malgré toutes les modifications apportées, le séquençage du fragment 28S n'a pas été effectué et il est possible que ce soit dû à la qualité de l'ADN utilisé (:les produits de PCR qui contiennent certainement des restes de réactifs, d'oligonucléotides), étant donné que les résultats concernant le témoin du kit sont tout à fait satisfaisants.

Il est à noter que d'autres modifications sont envisageables:  
Je pense en particulier qu'une purification des produits de PCR suivie d'une étape de reconcentration peut apporter des améliorations.

Il est également possible de prélever la bande fluorescente sur le gel d'agarose (en éliminant par la suite l'agarose soit par élution, soit en utilisant un kit adéquate du type Gene Clean) et d'effectuer la réaction de séquençage à partir de l'ADN récupéré qui doit être pur.

J'ai aussi envisagé d'effectuer une deuxième PCR à partir des produits obtenus lors d'une première amplification, ce qui aurait certainement apporté une purification supplémentaire (les fragments non visibles sur le gel mais éventuellement présents en faible quantité auraient été éliminés, ou au moins, en concentration plus faible).

Une dernière solution à considérer est le clonage. Bien qu'un des avantages du kit utilisé soit justement d'alléger le séquençage sur ce point là, il semblerait que ce soit néanmoins une étape relativement importante et nécessaire.

Ces modifications pourraient éventuellement apporter des améliorations satisfaisantes. Elles n'ont pas été effectuées par manque de temps.

Il apparaît tout de même, d'après les quelques 200 bases lues sur différents échantillons, que les individus étudiés présentent des similitudes étant donné que cette séquence est retrouvée sur chacun, seulement, il ne s'agit que d'un fragment de 200 bases ce qui reste très insuffisant pour conclure sur l'appartenance à une seule et même espèce.

De plus, la séquence de 200 bases lue sur mes films photographiques n'est pas alignable avec celles de Littlewood. Il est possible que le fragment amplifié, puis séquencé ne soit pas le 28S. L'amplification (toujours spécifique) porterait alors sur un autre fragment de 1300 paires de bases également. Cela reste cependant étrange, sachant que les amorces employées sont les mêmes que celles utilisées par Littlewood.

Le but de ce stage était de déterminer si les populations étudiées appartiennent à la même espèce ou non, et ceci par le biais du séquençage. Je ne suis malheureusement pas en mesure, au terme de mes manipulations, de répondre clairement à cette question, les réactions de séquençage n'ayant donné aucun résultat probant.

Bilan personnel.

## Bilan personnel.

Ce stage, malgré l'absence de résultats probants, m'a beaucoup apporté. Il m'a entre autre permis d'améliorer mes compétences en ce qui concerne les manipulations, de maîtriser certaines techniques incontournables de biologie moléculaire et déjà employées antérieurement (PCR, digestions enzymatiques, utilisations de gels d'agarose, de polyacrylamide), mais aussi d'apprendre à en utiliser de nouvelles, à l'aide d'une formation correcte et solide (notamment en ce qui concerne l'utilisation de radio-isotopes et les notions de sécurité que cela implique). De plus, ces onze semaines passées au sein de ce laboratoire m'ont montré ce qu'est véritablement le travail du chercheur au quotidien et en particulier les différentes phases de la recherche, allant de la mise au point des protocoles de travail jusqu'à l'obtention des résultats, en passant par les étapes de modifications afin d'améliorer la qualité des expériences. Cela m'a permis de comprendre qu'il est nécessaire, pour effectuer ce type de recherche, d'avoir assez de recul pour critiquer honnêtement le déroulement d'une manipulation et savoir ajuster les paramètres de réaction chaque fois qu'il est utile de le faire. C'est, je pense, sur ce point qui m'était jusqu'alors inconnu, que j'ai le plus appris au cours de ce stage.

# Bibliographie.

# BIBLIOGRAPHIE.

- Banks M.A., Hedgecock D., 1993. Discrimination between closely related Pacific oyster species [*Crassostrea*] via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 2(3) : 136.
- Grizel H. and Héral M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. int. Explor. Mer*, 47: 399-403.
- Harasewych M.G., Adamkewicz S.L., Blake J.A., Saudek D., Spriggs T. and Bult C.J., 1997. Phylogeny and relationships of pleurotomariid gastropods [Mollusca: Gastropoda]: an assessment based on partial 18S rDNA and cytochrome c oxydase I sequences. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* (1997) 6(1), 1-20.
- Hillis D.M., Dixon M.I., 1989. Vertebrate phylogeny: evidence from 28S ribosomal DNA sequences. In: *The Hierarchy of life*. B. Fernholm, K. Bremer and H. Jornvall (ed) Elsevier, Amsterdam. 355-367.
- Innis M.A. and Gelfand D.H., 1990. Optimization of PCRs. In *PCR protocols: A guide to Methods and applications*. Academic Press, Inc. : 3-19.
- Littlewood D.T.J., 1994. Molecular Phylogenetics of Cupped Oysters Based on Partial 28S rRNA Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 3 (3): 221-229.
- Medlin L., Elwood H.J., Stickel S. and Sogin M.L., 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*. 71. Elsevier: 491-499.
- O'Foighil D., Gaffney P.M., Hilbish T.J., 1995. Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American [*Crassostrea virginica* (Gmelin)] and Asian [*C.gigas* (Thunberg) *C. ariakensis* (Wakiya)] oyster species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 192 : 211-220.
- Palumbi S.R., What Can Molecular Genetics Contribute To Marine Biogeography? An Urchin's Tale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 203 (1996) 75-92.
- Steiner G., Müller M., 1995. What Can 18S rDNA Do For Bivalve Phylogeny?. *Journal of Molecular Evolution*. (1996) 43:58-70.

# Annexes.

# **\* ANNEXE 1 \***

## **Protocole d'extraction**

### 1<sup>ère</sup> étape

Dans un eppendorf:  
400µl de tampon d'extraction  
5µl de protéinase K  
le fragment de tissus duquel l'ADN sera extrait

Laisser une nuit à 55°C

### 2<sup>ème</sup> étape

Ajouter 500µl de phénol  
Agiter  
Centrifuger à 10000 tr / mn  
Récupérer la phase supérieure  
Ajouter 1 ml d'un mélange chloroforme / alcool isoamylique (24:1)  
Agiter  
Centrifuger 10000 tr / mn  
Prélever le surnageant

### 3<sup>ème</sup> étape

Ajouter 400 ml d'éthanol 100% à -20°C  
Laisser précipiter 1 heure à -20°C  
Centrifuger 10000 tr / mn pendant 10 mn  
Laver à l'éthanol à 70% à -20°C  
Sécher et redissoudre dans 150µl de TE



## **\* ANNEXE 2 \***

### **Protocole de l'amplification par PCR**

#### **Volumes des différents réactifs**

| <b>28S et 18S</b>             |           | <b>16S</b> |
|-------------------------------|-----------|------------|
| Tampon (10 X)                 | 5 µl      | 5 µl       |
| MgCl <sub>2</sub>             | 4 µl      | 3 µl       |
| Solution de dNTP (2mM chaque) | 3 µl      | 5 µl       |
| Amorce 1                      | 1 µl      | 1 µl       |
| Amorce 2                      | 1 µl      | 1 µl       |
| Taq polymérase                | 0.3 µl    | 0.35 µl    |
| DNA                           | 2 µl      | 2 µl       |
| H <sub>2</sub> O              | qsp 50 µl | qsp 50 µl  |

#### **Cycles de l'amplification**

##### **Premier protocole utilisé**

- 2 minutes à 94°C
- 1 minute à 94°C
- 2 minutes à 50°C
- 2 minutes à 72°C
- 7 minutes à 72°C

##### **Deuxième protocole testé**

- 2 minutes à 94°C dénaturation initiale
  - 1 minute à 94°C
  - 1 minute à 50°C
  - 1 minute à 72°C
- } répété 30 fois
- 7 minutes à 72°C élongation finale

Ces deux protocoles apportent des résultats similaires et satisfaisants, le second présentant l'avantage d'être plus rapide.

## **\* ANNEXE 3 \***

### **Protocole de digestions enzymatiques par endonucléases de restriction**

Il diffère selon que le tampon utilisé comporte ou non de la BSA (Sérum Albumine Bovine).

#### + si le tampon ne contient pas de BSA:

|                       |             |
|-----------------------|-------------|
| Solution tampon 10 X  | 2 $\mu$ l   |
| Enzyme de restriction | 0.2 $\mu$ l |
| BSA                   | 0.2 $\mu$ l |
| H2O milliQ            | 5.6 $\mu$ l |
| Produit de PCR        | 12 $\mu$ l  |

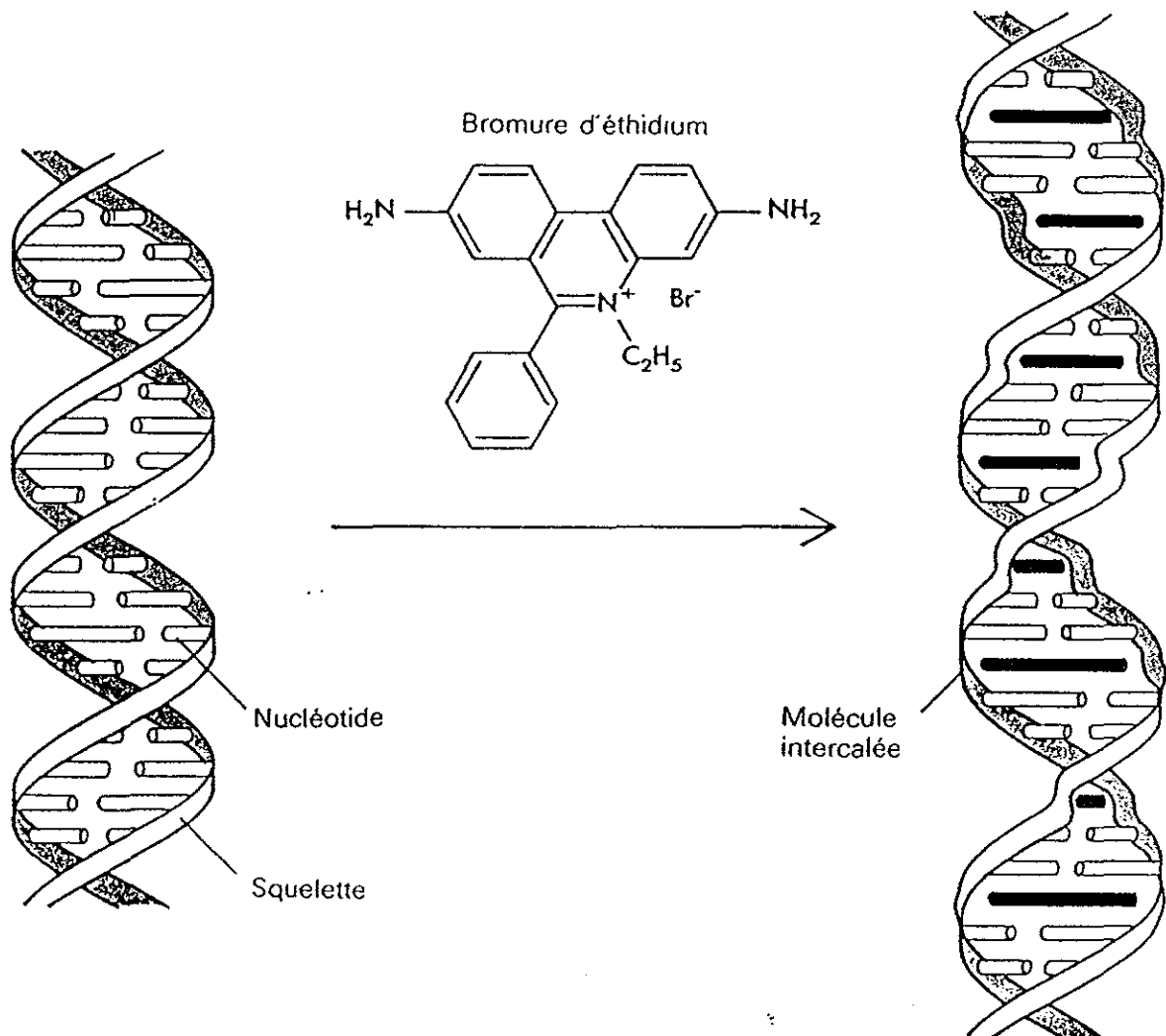
#### + si le tampon contient de la BSA:

|                       |             |
|-----------------------|-------------|
| Solution tampon 10 X  | 2 $\mu$ l   |
| Enzyme de restriction | 0.2 $\mu$ l |
| H2O milliQ            | 5.8 $\mu$ l |
| Produit de PCR        | 12 $\mu$ l  |

L'incubation est effectuée à 37°C (excepté dans le cas de l'enzyme Taq I: 60°C) pendant 2 heures.

## \* ANNEXE 4 \*

### Mode d'action du BET.



Intercalation de bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN. Notez que le bromure d'éthidium augmente l'espacement entre les paires de bases successives, provoque une distorsion du squelette sucre-phosphate régulier et diminue le pas de l'hélice.

## **\* ANNEXE 5 \***

### **Protocole de séquençage.**

(réalisé à partir du protocole décrit dans le kit utilisé: PROMEGA)

Avant de commencer les réactions de séquençage, il est nécessaire d'avoir des produits de PCR "frais". Il faut donc **prévoir**, au préalable, une amplification par PCR du fragment à séquencer.

### **Protocole de séquençage avec incorporation directe: ( $\alpha P^{33}$ )**

- Décongeler la radioactivité (si le  $\alpha P^{33}$  n'est pas en solution stabilisée et conservé au congélateur).
- Sortir les d/dNTPs et le tampon de l'enzyme de séquençage du congélateur. Les conserver dans la glace et les remettre au congélateur immédiatement après utilisation.
- Distribuer 2  $\mu$ l du mix d/dNTP approprié sur une microplaque. Mettre de côté, dans la glace.
- Pour chaque set de séquençage (un set = quatre réactions, une pour chaque mix de d/dNTP), mélanger dans un éppendorf:

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| Matrice d'ADN (produit de PCR) | 10 $\mu$ l |
| Amorce (UNE SEULE)             | 1 $\mu$ l  |
| Tampon de séquençage           | 5 $\mu$ l  |

Comme les produits de PCR ne subissent aucune étape de purification (quand il y a purification, il y a également perte de matériel), il est préférable d'en mettre une grande quantité.

-Additionner 1  $\mu$ l d'enzyme de séquençage dans le mix Matrice / amorce / tampon, et mettre sur la glace immédiatement. (A partir de ce moment, l'éppendorf ne quitte plus la glace, à cause de l'enzyme).

-En salle chaude, ajouter au mix matrice / amorce / tampon / enzyme, de 0.5  $\mu$ l de radioactivité.

-Distribuer 4  $\mu$ l du mix dans chacun des quatre puits de la microplaque, puis ajouter une goutte d'huile pour éviter les évaporations au cours de la réaction.

-Recouvrir la microplaque de film étirable, faire démarrer le programme de séquençage et attendre que la température ait atteint 94°C pour transférer la microplaque de la glace à la machine PCR.

**programme de séquençage utilisé:**

|                  |                       |
|------------------|-----------------------|
| 2 minutes à 94°C | dénaturation initiale |
| 1 minute à 94°C  | cycle répété 30 fois  |
| 1 minute à 50°C  |                       |
| 1 minute à 72°C  |                       |
| 7 minutes à 72°C | élongation finale     |

-Quand le programme est terminé, sortir la microplaque de la machine et la mettre dans la glace (ou programmer la machine pour qu'elle conserve la microplaque à 4°C).

-Ajouter dans chaque puits (EN DESSOUS de l'huile) 3 µl de la solution stop du kit.

-Dénaturer à 94°C pendant 5 minutes juste avant de déposer sur le gel d'acrylamide. (Mettre au congélateur si le dépôt n'est pas fait aussitôt).

## **\* ANNEXE 6 \***

### **Tampons et solutions utilisées:**

#### Solutions tampon:

TE: 10 mM Tris-base (pH 8)  
1 mM EDTA (pH 8)

TAE: 0.04 M Tris-acétate (pH 8)  
0.001 M EDTA (pH 8)

TBE: 162 g Tris  
27.5 g d'acide borique  
50 ml EDTA (0.5 M)  
H<sub>2</sub>O qsp 1 litre

#### Tampons d'extraction:

10 mM Tris-Cl (pH 8)  
0.1 mM EDTA (pH 8)  
0.5% SDS  
5 µl de protéinase K

#### Gel de polyacrilamide:

##### Acrylamide:

210 g urée  
75 ml acrylogel  
50 ml TBE 10X  
H<sub>2</sub>O (milliQ) qsp 500 ml

##### APS (ammonium persulfate):

1 g d'APS  
10 ml eau milliQ

Le gel est préparé à raison de 70 ml d'acrylamide, 350 µl d'APS et 70 µl de TEMED. Après que le gel soit coulé, il faut laisser polymériser environ 1 heure.

## \* ANNEXE 7 \*

Degré d'homologie entre la séquence théorique et celle déchiffrée expérimentalement du témoin (pGEM -3Zf).

[emb|X65306|CYPGEM3ZP Cloning vector pGEM-3Zf(+)  
Length = 3199

Plus Strand HSPs:

Score = 421 (116.3 bits), Expect = 3.1e-27, P = 3.1e-27

Identities = 85/86 (98%), Positives = 85/86 (98%), Strand = Plus / Plus

```
Query:      1 GCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGTTTGAGTATTCTAT 6
              |||
Sbjct:     13 GCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGAGTATTCTAT 7
              |||

Query:     61 AGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAA 86
              |||
Sbjct:     73 AGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAA 98
```

## **\* ANNEXE 8 \***

### **Protocole de purification des produits de PCR.**

Il est réalisé à partir du kit de purification WIZARD PCR preps, DNA purification system qui utilise des colonnes d'exclusion. Il est admis que l'amplification par PCR est opérationnelle et a permis de produire une grande quantité de copies du fragment sélectionné. Il est préférable de conserver les produits de PCR dans la glace (essayer de ne les sortir que lors des centrifugations et les agitations).

- A partir du tube de PCR, transférer la phase aqueuse dans un éppendorf propre en évitant d'entraîner de l'huile qui contrarie l'élution finale. J'ai considéré que la totalité de la solution était récupérée, soit 50 µl.

- A ces 50 µl de produit de ajouter 100µl de Tampon de purification directe. Vortexer brièvement.

- Ajouter 1 ml de résine, vortexer brièvement deux fois à une minute d'intervalle.

- Pipeter le mélange et le verser dans la seringue à laquelle est fixée une minicolonne puis un éppendorf propre. Entrer le piston dans la seringue.

- Actionner le piston de la seringue puis le ressortir et déposer dans la colonne 2 ml d'isopropanol à 80%. Réactionner le piston. A ce stade là, l'ADN est fixé dans la colonne. L'isopropanol sert à rincer la seringue et la minicolonne des impuretés présentes parmi les produits de PCR.

- Détacher la minicolonne de la seringue et centrifuger deux minutes à 10 000g afin d'assécher la résine.

- Remplacer l'éppendorf attaché à la minicolonne par un propre.

- Déposer 50 µl de tampon TE (1X, mais ça marche aussi bien avec de l'eau) en haut de la colonne, laisser agir une à deux minutes, et centrifuger une vingtaine de secondes à 10 000g pour aider l'élution.(ou laisser reposer 30 minutes)

- S'il n'est pas utilisé immédiatement, le produit de purification est conservé à 4°C