

Ifremer

Station IFREMER
Laboratoire Génétique et Pathologie
Mus du Loup
17390 La Tremblade



Université Bordeaux 1
351 cours de la Libération
33405 Talence

**Caractérisation du génome de l'huître creuse
Crassostrea gigas : mise au point de l'approche
PRINS**

POIRIER Alice

**Rapport de stage de 3^{ème} année de Licence Sciences et Technologies
Année 2007-2008**



Responsables :

**Abdellah Benabdelmouna, Cadre de recherche, Station IFREMER La Tremblade
Frédérique Huneau, Maître de conférence, Université Bordeaux 1**

REMERCIEMENTS :

Je tiens tout d'abord à remercier Tristan Renault, responsable du laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade, de m'avoir permis de réaliser ce stage, ainsi que Jean Prou, chef de station, de m'avoir accueillie à la station de La Tremblade.

Je remercie vivement Abdellah Benabdelmouna, mon maître de stage, du temps qu'il m'a consacré durant ces deux mois.

Un grand merci à Stéphane Robert du temps qu'il m'a accordé cet hiver pour une visite de la station, et de son agréable et constante bonne humeur.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe de l'écloserie de leur accueil et de leur gentillesse.

Merci en particulier à Christophe Ledu de son aide en élevage larvaire et à Julien Normand de ses conseils et d'avoir partagé son bureau pendant ce stage.

Merci enfin aux autres stagiaires et au reste de l'équipe IFREMER de La Tremblade de leur sympathie.

SOMMAIRE :

Caractérisation du génome de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> : mise au point de l'approche PRINS	1
PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL :	4
INTRODUCTION :	5
I. Présentation du sujet d'étude : l'huître creuse du Pacifique <i>Crassostrea gigas</i>	5
1. Systématique et anatomie	5
2. Données cytogénétiques	6
3. Reproduction et développement.....	6
4. Importance économique	6
II. La polyploïdie	7
III. L'aneuploïdie	7
MATERIELS ET METHODES :	9
I. Etape cytologique	9
1. Préparation de plaques métaphasiques	9
1.1. Production d'embryons	9
1.1.1. Détermination du sexe des géniteurs	9
1.1.2. Prélèvement des gamètes, comptage et fécondation.....	9
1.2. Traitement des embryons	9
1.3. Etalement sur lame	10
2. Préparation du sperme	10
II. Etape moléculaire : marquage par synthèse <i>in situ</i> amorcée (PRINS)	11
1. Décondensation de l'ADN spermatique.....	11
2. Pré-traitement des préparations	11
3. Dénaturation de l'ADN.....	11
4. Marquage	12
5. Lavage et révélation	12
6. Contre-coloration et montage des lames.....	13
7. Observation des préparations	13
RESULTATS ET DISCUSSION :	14
I. PRINS sur cellules somatiques	14
II. PRINS sur spermatozoïdes.....	16
CONCLUSION :	18
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	19
ANNEXES :	22

PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL :

L'IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER, créé en 1984, est un institut national de recherche marine qui contribue à la connaissance des océans et de leurs ressources, à la surveillance du milieu marin et littoral et au développement durable des activités maritimes. L'IFREMER est présent dans 26 implantations réparties sur tout le littoral métropolitain et dans les DOM-TOM.

La station IFREMER de La Tremblade dépend du centre IFREMER de Nantes qui représente la zone du Golfe de Gascogne. Elle est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral dans la partie sud du département de la Charente-Maritime (de la rive gauche de la Charente à l'estuaire de la Gironde).

Cette station héberge deux laboratoires :

- Une partie du laboratoire Environnement et Ressources des Pertuis Charentais (LERPC) du **département Environnement littoral et Ressources aquacoles**.
- L'essentiel des effectifs du laboratoire Génétique et Pathologie (LGP) du **département Amélioration génétique, Santé animale et Environnement**.

Le stage a été effectué au sein du laboratoire Génétique et Pathologie impliqué dans l'acquisition de connaissances concernant l'amélioration génétique, le contrôle des performances et la santé des espèces d'intérêt en aquaculture marine, notamment pour les mollusques bivalves marins tels que l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* élevée dans le bassin ostréicole de Marennes-Oléron.

Les deux domaines d'étude de ce laboratoire sont :

- **La génétique** : étude des ressources génétiques, développement de nouvelles espèces, de nouvelles populations et d'hybrides pour limiter les risques liés à la monoculture, obtention de souches résistantes ou tolérantes aux maladies, création de souches ou de lignées présentant de meilleures performances de croissance, de qualité de chair, une meilleure adaptation aux conditions de milieu d'élevage ou éventuellement de faibles besoins métaboliques pour améliorer la productivité des entreprises.
- **La pathologie** : surveillance des ressources conchylicoles, identification d'agents pathogènes et description de leur cycle de développement, mise au point de techniques de reproduction expérimentales 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.

INTRODUCTION :

I. Présentation du sujet d'étude : l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas*

1. Systématique et anatomie

Selon Grassé (1960), la classification de l'huître creuse *Crassostrea gigas* est la suivante :

Règne : Animal

Embranchement : Mollusque

Classe : Bivalve

Ordre : Filibranchia

Sous-ordre : Anisomyaria

Super-famille : Ostreidea

Famille : Ostreidae

Sous-famille : Crassostreinae

Genre : *Crassostrea*

Espèce : *gigas*

L'annexe 1 représente l'anatomie de l'huître creuse *C. gigas* hors période de maturation.

La coquille de l'huître creuse est constituée de deux valves, une creuse contenant la masse viscérale et l'autre plate. Le muscle adducteur permet de maintenir la coquille fermée.

Le manteau est constitué de deux lobes et renferme la cavité palléale. Il assure à la fois la filtration pour la nutrition de l'huître, et la croissance et le développement de la coquille ; il constitue aussi un organe sensoriel.

La cavité palléale contient l'anus, les orifices rénaux et génitaux, et les branchies. Les branchies sont constituées de minuscules filaments irrigués et équipés de cils vibratiles. Elles filtrent l'eau pour en extraire les éléments nutritifs mais également l'oxygène dissous, donc elles ont un rôle à la fois dans la nutrition et la respiration. L'huître est planctonophage, elle se nourrit essentiellement de phytoplancton (diatomées, flagellés, ...).

L'appareil reproducteur est constitué d'une gonade dont la taille varie selon la saison. En hiver, pendant la phase de repos sexuel, la gonade est à peine visible, elle se développe en revanche considérablement au printemps et en été dans le tissu conjonctif enveloppant la masse digestive.

2. Données cytogénétiques

L'huître creuse *C. gigas* a un nombre chromosomique diploïde $2n=2x=20$ (Thiriot-Quiévreux, 2002), comme la plupart des huîtres de la famille des Ostreidae. Son caryotype comporte 10 paires de chromosomes métacentriques numérotées selon leur taille décroissante (Thiriot-Quiévreux, 1984) (Annexe 2).

3. Reproduction et développement

Les huîtres adultes présentent une reproduction sexuée. Les géniteurs produisent donc des gamètes mâles (spermatozoïdes) ou femelles (ovocytes). *C. gigas* présente un hermaphrodisme dit alterné, elle fonctionne comme mâle ou femelle au cours d'une saison et peut changer ou non de sexe l'année suivante. Cependant, quelques individus hermaphrodites peuvent être observés. Le milieu (température et nutrition), mais aussi des facteurs hormonaux internes, semblent contrôler le déterminisme du changement de sexe (Barnabé, 1985).

La gamétogenèse débute dès que la température de l'eau s'élève au-dessus de 10°C. Les gamètes ne sont émis que 4 ou 5 mois plus tard, lorsque la température dépasse 18°C. La fécondation des ovules par les spermatozoïdes s'effectue dans la mer, au gré des courants et des rencontres.

L'œuf donne naissance à un embryon qui passe ensuite par différents stades larvaires. Lorsque la larve atteint une taille comprise entre 300 et 380 µm, un pied se développe, lui permettant de rechercher un substrat sur lequel elle va se fixer. La métamorphose s'achève par la disparition du pied et du velum (organe de nutrition et de locomotion) et donne place à une jeune huître appelée naissain. La durée de la vie larvaire est sous la dépendance principale de la température, elle varie généralement entre 15 et 28 jours (Barnabé, 1985).

4. Importance économique

L'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* a été introduite en France à partir de 1966 (Grizel et Héral, 1991) et a finalement remplacé l'huître portugaise *Crassostrea angulata* à partir des années 1970 suite à deux maladies d'origine virale (Comps et Duthoit, 1976 ; Comps, 1983) pour soutenir les exploitations ostréicoles. *C. gigas* est très importante d'un point de vue économique. En effet, la France est le quatrième producteur mondial avec un peu plus de 126000 tonnes en 2001 (FAO, 2003). Cette espèce constitue 95% de la production d'huître française (FAO, 2006), le reste correspondant à la production de l'huître plate *Ostrea edulis*, seule espèce endémique des côtes françaises. En 2003, la région Poitou-Charentes a produit 38000 tonnes d'huîtres creuses (CNC, 2004).

II. La polyploïdie

Le laboratoire LGP de la station de La Tremblade est le seul site français à produire des huîtres *C. gigas* tétraploïdes (possédant leur matériel génétique en quadruple) soit $2n=4x=40$ chromosomes. Les géniteurs mâles tétraploïdes sont vendus à des écloséries en France afin d'être croisés avec des femelles diploïdes autochtones. Les individus obtenus sont triploïdes. Cet état confère des avantages pour la commercialisation ; en effet alors que la ponte fait perdre à l'huître 60% de son poids et la rend vulnérable à des maladies, les huîtres triploïdes sont reproductiblement stériles. Elles présentent une gamétogenèse très réduite leur conférant une qualité de chair constante tout au long de l'année et une plus grande rusticité.

III. L'aneuploïdie

L'aneuploïdie est un phénomène cytologique caractérisé par la présence d'un nombre de chromosomes différent de l'état euploïde $2n$ (perte ou gain de chromosomes). Ce phénomène est dû à une non-disjonction des chromosomes lors de la mitose ou de la méiose (Bond et Chandley, 1983 ; Verma, 1990). L'aneuploïdie autosomique est en général létale chez les organismes supérieurs ou donne lieu à un sévère handicap comme dans le cas de la trisomie 21 chez l'homme (Vig et Sandberg, 1987). Ses effets sont mieux tolérés par les organismes inférieurs comme les mollusques bivalves marins (Thiriou-Quiéveux, 1986). *C. gigas* présente assez fréquemment des cas d'aneuploïdie, et il a été montré une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et la croissance (Zouros *et al.*, 1996 ; Leitão *et al.*, 2001) ce qui est préjudiciable pour les ostréiculteurs.

Les huîtres tétraploïdes sont elles aussi soumises à l'aneuploïdie. Il est par conséquent utile de contrôler l'absence d'aneuploïdie chez un géniteur tétraploïde afin de garantir à l'acheteur un stock de gamètes dont l'état euploïde est le plus possible assuré.

Dans cette optique, la méthode utilisée est le marquage chromosomique par hybridation *in situ* fluorescente (FISH). La FISH utilisée avec des amorces d'ADN ribosomal 5S et 16S-5,8S-26S (appelé 45S) permet déjà d'identifier 3 chromosomes différents chez *C. gigas* grâce à 3 marquages indépendants et différenciables (Benabdelmouna *et al.*, 2001). Le but ultime est de trouver un marqueur pour chaque chromosome afin de différencier les paires les unes des autres et détecter l'existence de toute aneuploïdie.

L'inconvénient de cette méthode est qu'elle est longue, difficile et coûteuse. Deux autres méthodes utilisées sur l'homme et les végétaux permettent d'aboutir à des marquages similaires : la technique de marquage non radioactif par synthèse *in situ* amorcée ou PRINS (PRimed *IN Situ*) décrite par Koch *et al.* en 1989 et la PRINS en chaîne (cycling PRINS).

Ces méthodes sont basées sur l'amplification *in situ* de fragments d'ADN, utilisant des amorces spécifiques d'une séquence. Normalement a PRINS est plus rapide et plus sensible que la FISH, par conséquent il paraît intéressant de mettre au point cette méthode sur l'huître. Des essais seront effectués sur des chromosomes métaphasiques obtenus à partir de cellules embryonnaires diploïdes et sur du sperme issu de géniteurs tétraploïdes.

MATERIELS ET METHODES :

I. Etape cytologique

1. Préparation de plaques métaphasiques

1.1. Production d'embryons

1.1.1. Détermination du sexe des géniteurs

Les géniteurs sont conditionnés durant au moins 8 semaines dans une eau de mer à 20°C, nourris à satiété avec un mélange d'algues-fourage *Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* et *Tetraselmis suecica*.

Une biopsie est réalisée afin de déterminer le sexe des géniteurs en stock. Les huîtres sont sacrifiées et des gamètes sont prélevés dans la gonade avec un peu de liquide physiologique. Le prélèvement est déposé sur une lame et observé au microscope (grossissement X20). Les ovocytes ont une forme de poire, de couleur brune. Les spermatozoïdes sont beaucoup plus petits et mobiles.

1.1.2. Prélèvement des gamètes, comptage et fécondation

La méthode de récupération des gamètes est la scarification à l'aide d'un scalpel. Les gamètes sont recueillis par rinçage de la gonade à l'eau de mer filtrée à 25°C puis sont tamisés afin d'éliminer les impuretés.

Les ovocytes de deux femelles sont recueillis dans 300 mL d'eau salée à 25°C et les spermatozoïdes d'un mâle sont dilués au 10^{ème}.

Ensuite les gamètes sont comptés en utilisant une cellule de comptage. Les ovocytes sont directement étalés sur une cellule de Malassez et les spermatozoïdes sont étalés sur une cellule de Thoma après fixation dans le formol. Le comptage est effectué par le logiciel SAMBA.

Le taux de fécondation est optimisé en mélangeant 200 spermatozoïdes pour 1 ovocyte.

Les œufs sont incubés à 25°C dans 4 jarres cylindro-coniques de 30L remplies d'eau de mer aérée et filtrée à 1µm.

1.2. Traitement des embryons

Après 4h30 à 5h de développement (stade 6-8 cellules), les embryons sont traités afin de bloquer leur cycle cellulaire en métaphase de la mitose (chromosomes condensés bien visibles et individualisés).

Pour cela, les embryons sont récupérés dans 4 tubes falcon 50mL à l'aide d'un tamis 20µm et d'une pissette d'eau de mer filtrée à 25°C, avec 40mL par tube. De la colchicine à

0,05% est ajoutée. Après un traitement de 20min à l'obscurité, le surnageant est éliminé à la pipette et 40mL de tampon citrate (9 vol citrate 0,9% + 1 vol eau de mer filtrée) est ajouté, ce qui produit un choc hypotonique qui fait gonfler les cellules. Après un traitement de 10min, 5mL de fixateur (3 vol éthanol absolu + 1 vol acide acétique) est ajouté progressivement. Cette préfixation tue les cellules et les fixe. Après une centrifugation de 5min à 1000rpm, le surnageant est retiré et le culot resuspendu dans 40mL de fixateur. Cette étape est répétée après un traitement de 20min. La solution se conserve 24h au frigo puis au congélateur.

1.3. Etalement sur lame

La solution d'embryons précédente est centrifugée, le surnageant retiré et le culot resuspendu dans de l'acide acétique 45%. La proportion embryons/acide acétique choisie dépend de la concentration en embryons. Après 10min d'incubation, la préparation est déposée sur des lames chauffées à 44°C. A l'aide d'une pipette Pasteur, des gouttes sont lâchées d'une hauteur de 15cm environ, puis les lames sont laissées à sécher sur la plaque chauffante.

Les plaques métaphasiques sont ensuite observées au microscope optique à contraste de phase (objectif X20). Les lames sont triées selon leur qualité : les chromosomes doivent être suffisamment condensés et isolés des restes cellulaires (cytoplasme, membrane nucléaire, etc), et chaque plaque métaphasique doit comprendre 20 chromosomes (sauf cas d'aneuploïdie), (Annexe 3).

2. Préparation du sperme

Le sperme est traité différemment : il est récupéré par rinçage de la gonade en utilisant du PBS 1X, puis est lavé trois fois dans du PBS 1X. Après centrifugation 6min à 1500 rpm à température ambiante (TA), le culot est repris dans du PBS 1X contenant quelques gouttes de fixateur (préfixation) puis dans du fixateur pur après centrifugation. La préparation est conservée au congélateur (-20°C).

Le sperme dilué dans le fixateur est directement utilisé : une goutte est étalée sur une lame froide qui sèche sous la hotte. On observe au microscope optique à contraste de phase (X20) les noyaux des spermatozoïdes de forme circulaire (Annexe 4).

II. Etape moléculaire : marquage par synthèse *in situ* amorcée (PRINS)

1. Décondensation de l'ADN spermatique

Contrairement aux noyaux somatiques, l'ADN contenu dans les noyaux des spermatozoïdes est très compacté. Durant l'étape de décondensation, la chromatine va être décompactée, afin de la rendre accessible aux outils moléculaires de la PRINS : les amorces et la Taq polymérase. Les noyaux conservent cependant leur forme ronde de départ et leur individualité (Annexe 5).

Pour cela, les lames sont incubées à 60°C pendant une heure, puis sont plongées dans une solution de DTT 10mM (1,4-Dithio-D,L-threitol dilué dans du PBS 1X) entre 2min et 2min30, TA. Elles sont ensuite lavées une fois dans du PBS 1X, et deux fois dans du 2X SSC. Enfin elles sont déshydratées dans une série d'éthanol (70%, 95% puis 100%) 3min, TA, et séchées sur un portoir.

2. Pré-traitement des préparations

Cette étape permet grâce à l'emploi d'une RNase et de pepsine d'obtenir des lames plus propres, dépourvues de débris cellulaires et d'ARNs pouvant fausser les résultats en subissant un marquage non spécifique (bruit de fond). Elle est nécessaire pour les cellules somatiques et facultative pour le sperme.

Les lames sont incubées à 60°C pendant 1 heure (cette étape a déjà été effectuée pour le sperme). Ensuite 150µL de RNase (100µg /mL) sont déposés sur les lames et celles-ci sont recouvertes d'une lamelle découpée dans un sac plastique autoclavé et incubées 1 heure dans une chambre d'hybridation à 37°C (boîte contenant du 2X SSC et conservée dans l'étuve). Puis les lames sont lavées 3 fois dans une jarre de 2X SSC (saline sodium citrate) 5min, TA et 1 fois dans du HCl 10mM 2min, TA. De même les lames sont traitées à la pepsine et incubées 5min à 37°C. Elles sont ensuite lavées à l'eau distillée (Merk) 1min, TA et au PBS 1X 5min, TA. Suit une étape de post-fixation 10min, TA dans le paraformaldéhyde 1%. Puis les lames sont lavées dans le PBS 1X 3fois 5min, TA et finalement déshydratées et séchées.

3. Dénaturation de l'ADN

Cette étape permet de séparer la double hélice d'ADN en brins monocaténaire accessibles aux amorces et à la Taq polymérase. Elle est effectuée sur les préparations d'embryons et de sperme.

150µL de formamide 70% 2X SSC sont déposés et les lames sont couvertes d'une lamelle de verre et placées sur une plaque chauffante à 80°C pendant 3min (sperme) ou 4min (embryons). Puis la lamelle est retirée rapidement et les lames sont plongées 3min

dans du 2X SSC à 0°C. Le choc thermique est important pour la dénaturation. Enfin les lames sont déshydratées 3min à -20°C et sont séchées sous hotte.

4. Marquage

25µL de solution de marquage sont déposés sur chaque lame. Cette solution est composée de 2,5µL de mélange de dNTP 10X :dATP, dCTP et dGTP à 1mM, dTTP à 0,65mM, DIG-12-dUTP (digoxigénine) ou TRITC-6-dUTP (tetraméthylrhodamine isothiocyanate) ou FITC-11-dUTP (fluorescéine isothiocyanate) à 0,35mM, 5µL du couple d'amorces 10X choisi (5S, 45S ribosomales ou SSR Short Sequence Repeat), 2,5µL de BSA 10X (Bovin Serum Albumine), 2,5µL de Tampon MgCl₂ et 3µL de MgCl₂, 0,4µL de Taq polymérase à 5U et 4,1µL d'eau pour compléter jusqu'à 25µL. La solution se conserve dans la glace et la manipulation s'effectue dans la pénombre quand il y a utilisation de la rhodamine et du FITC qui sont des fluorochromes photosensibles.

Les lames sont recouvertes d'une lamelle de plastique 24X40mm et cerclées de colle caoutchouc qui empêche la dessiccation, puis sont mises à incuber sur plaque chauffante. La première étape, l'hybridation ou annealing, est de 15min à une température dépendant des amorces utilisées : 59°C pour les amorces 5S et 45S, 46°C pour les amorces SSR. La seconde étape, l'élongation, est de 30min à 72°C.

Pour une PRINS à deux couleurs, appelée PRINS polychrome, ce protocole est répété après trois lavages au 4X SSC 0,5% Tween 20, TA, afin de stopper complètement la première réaction.

5. Lavage et révélation

Les lames sont lavées au PBS 1X 3min, TA, puis 3 fois au 4X SSC 0,5% Tween 20 3min, TA.

Les lames marquées à la Rhodamine ou au FITC présentent une fluorescence directe respectivement de couleur rouge et verte, elles seront observables directement. Elles sont lavées au PBS 1X 3min, puis trois fois au 4X SSC 0,5% Tween 20 3min, puis deux fois au 2X SSC 2min, TA. Enfin elles sont déshydratées et séchées à l'air sur un portoir, toujours à l'obscurité.

Les lames marquées à la DIG présentent une fluorescence indirecte, elles doivent donc subir une étape de révélation où les haptènes (antigènes de petite taille) constitués par la DIG sont marqués par des anticorps couplés à un fluorochrome, la fluorescéine, émettant une couleur verte. 150µL de Tampon de blocage 4B (BSA) est déposé sur chaque lame, les lames sont recouvertes d'une lamelle découpée dans un sac en plastique autoclavé et incubées 30min à 37°C dans une chambre d'hybridation. La BSA (bovin serum albumine) est

un mélange de protéines permettant de saturer les sites non spécifiques où pourraient se fixer les anticorps. Après cela la lamelle est retirée et les préparations sont mises à incuber de même 30min avec un anticorps primaire monoclonal de souris anti-DIG. Ensuite les lames sont lavées 2 fois dans du TNT (Tris 100mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,05%) 5min à 37°C et sont mises à incuber 30min avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à la fluorescéine. Puis les lames sont lavées 2 fois dans le TNT 5min à 37°C et une fois dans le 2X SSC 2min, TA, et sont finalement déshydratées et séchées à l'air sur un portoir.

6. Contre-coloration et montage des lames

Les lames sèches sont posées sur papier buvard. Deux petites gouttes de liquide de montage, une solution de Vectashield contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), sont déposées sur chaque lame. Le DAPI colore l'ADN en bleu. La concentration de DAPI employée est de 1µg/mL pour les préparations d'embryons et de 0,1µg/mL pour celles de sperme, car les cellules somatiques présentent davantage d'ADN que les gamètes. Ensuite les lames sont recouvertes d'une lamelle en verre 24X40 mm et le surplus de liquide de montage est éliminé à l'aide du buvard. Cette étape est effectuée à l'obscurité. Les lames sont conservées dans un étui au frigo. Elles sont observables au minimum 24h plus tard.

7. Observation des préparations

Les lames sont observées au microscope à fluorescence Axioplan 2 *Imaging* connecté à une caméra qui renvoie l'image sur un ordinateur. La mise au point se fait à l'objectif X20 puis l'observation à l'objectif X63. 4 canaux sont utilisés : un bleu pour visualiser l'ADN sous forme de chromosomes (cellules somatiques) ou de noyaux (spermatozoïdes) ; un vert et un rouge pour visualiser les parties du génomes amplifiées et marquées (45S, 5S ou séquences SSR) ; et un canal blanc montrant la superposition des trois précédents.

Pour les trois premiers canaux, la mise au point est effectuée et l'image est acquise sur l'ordinateur grâce au logiciel AxioVision. Une photo de la même zone de la lame est prise sous deux ou trois canaux (bleu et rouge, bleu et vert ou bleu rouge et vert), puis ces calques sont superposés et l'image obtenue est traitée à l'aide du logiciel afin de faire ressortir le marquage.

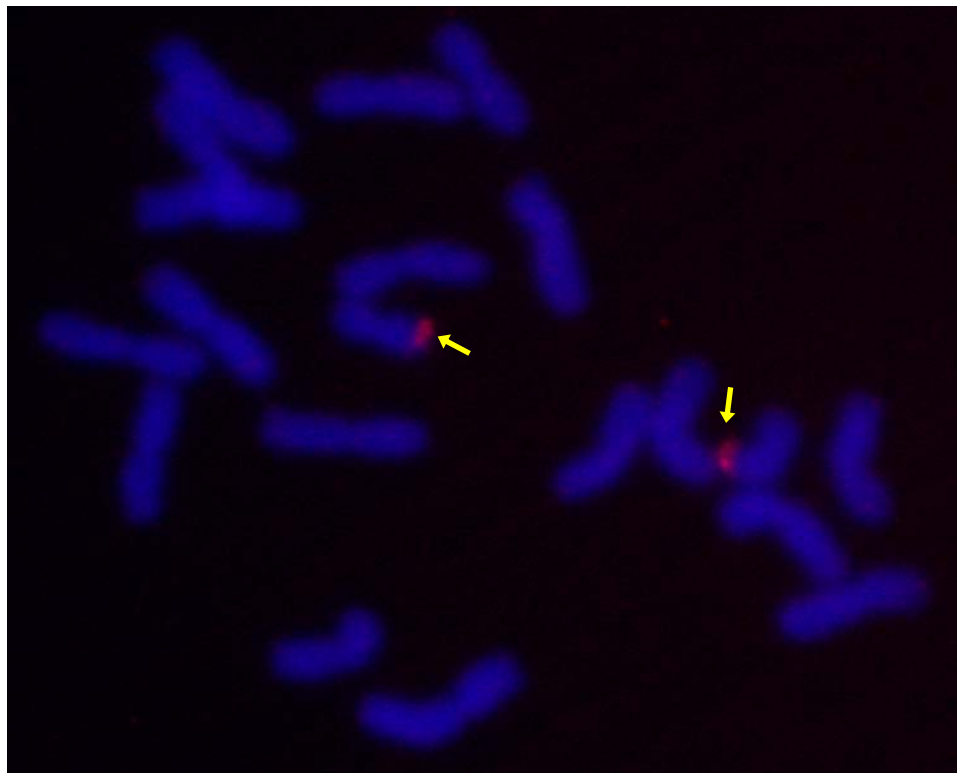
RESULTATS ET DISCUSSION :

I. PRINS sur cellules somatiques

L'étape de pré-traitement a été efficace, en effet on peut voir que la plaque métaphasique est bien nette, le plus souvent nue : le matériel cellulaire résiduel a été éliminé par action de la RNase et de la pepsine.

Les chromosomes sont bien individualisés, aux contours nets. La qualité du traitement à la colchicine est déterminante pour le résultat final. La couleur bleu profond des chromosomes est obtenue avec une concentration adéquate de DAPI dans la solution de montage, qui est de 1µg/mL.

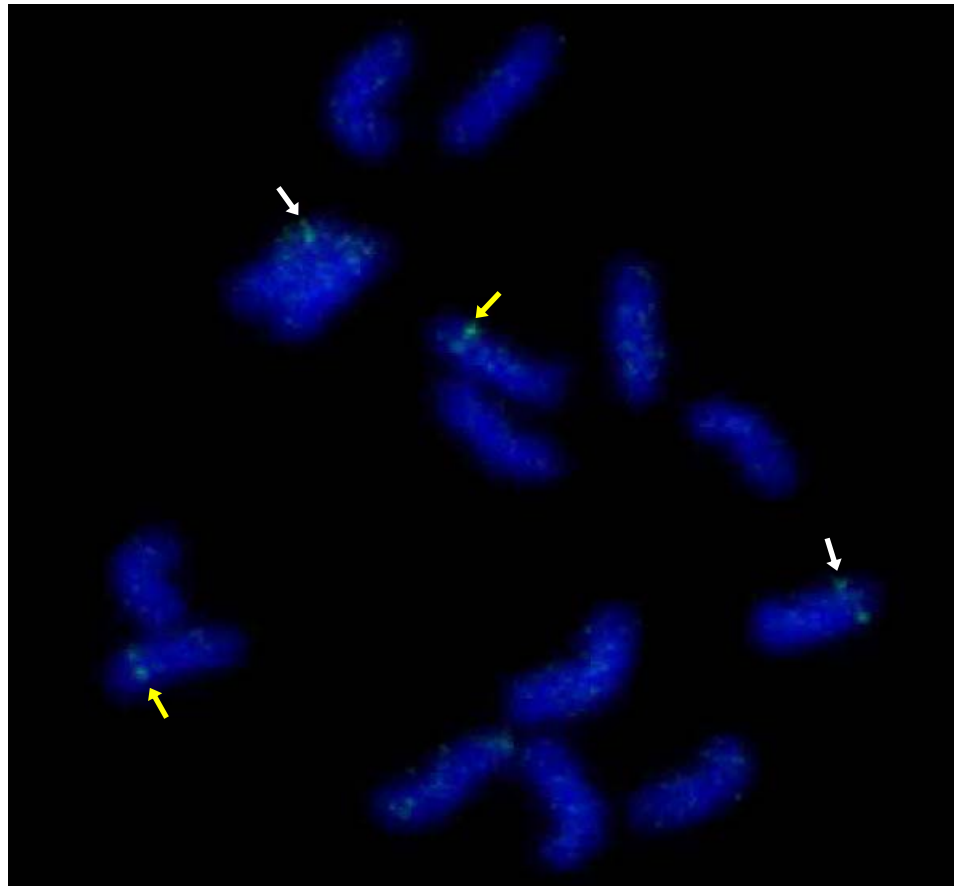
Figure 1 : Plaque métaphasique contre-colorée au DAPI et marquée à la rhodamine observée au microscope à épifluorescence (X63). Les sites marqués sont pointés par les flèches jaunes.



La localisation du gène 45S, révélée par le marquage rouge de la rhodamine (Figure 1), se trouve sur l'extrémité télomérique de la plus petite paire de chromosomes du caryotype, la paire 10. Celui-ci étant en double, on peut observer deux signaux d'intensité égale dans la plaque métaphasique. Les gènes 45S étant moyennement répétés en tandem, le signal est intense. Du bruit de fond reste parfois visible (signaux rouges de taille et d'intensité variables), correspondant à une fixation non spécifique des dUTP marqués ou des anticorps marqués sur d'autres morceaux du génome ou sur des débris cellulaires résiduels. Cependant ce bruit de fond est restreint grâce à l'étape de pré-traitement, ainsi qu'à un choix des constituants de la solution de marquage adéquat : la concentration d'amorces doit conférer une amplification optimale sans être trop importante, sinon le surplus se fixe sur des

sites non spécifiques ; de même les concentrations de Tampon et de $MgCl_2$ doivent permettre une activité optimale de la Taq polymérase, dépendant de la quantité de Taq employée. Enfin, la température d'hybridation influe de façon déterminante sur la qualité du marquage. En effet, plus celle-ci est élevée (dans la gamme de température correspondant aux amorces utilisées) plus l'hybridation est spécifique (conditions stringentes, c'est-à-dire moins permissives).

Figure 2 : Détail d'une plaque métaphasique contre-colorée au DAPI et marquée au FITC observée au microscope à épifluorescence (X63). Les sites majeurs sont pointés par les flèches jaunes et les sites mineurs par les flèches blanches.



La position du gène ribosomal 5S, révélée par le marquage vert du FITC (Figure 2), se trouve sur la partie interstitielle d'un bras de deux paires chromosomiques. Comme précédemment décrits avec la technique FISH (Benabdelmouna *et al.*, 2008), la PRINS a pu mettre en évidence l'existence de deux sites marqués, l'un majeur et l'autre mineur. Au total quatre signaux doivent donc être visualisables (sur deux paires distinctes de chromosomes). Les gènes 5S sont eux aussi répétés en tandems, mais ils sont plus petits que les gènes 45S et sont disposés sur deux sites distincts, par conséquent les signaux sont moins apparents. L'optimisation de l'intensité du marquage est permise par un choix adapté des concentrations d'amorces, de dUTP marqués et d'anticorps marqués. De plus le rapport des proportions de dTTP et de dUTP marqués dans le mélange de dNTP doit permettre à la Taq polymérase d'utiliser un maximum de dUTP marqués tout en interposant régulièrement un

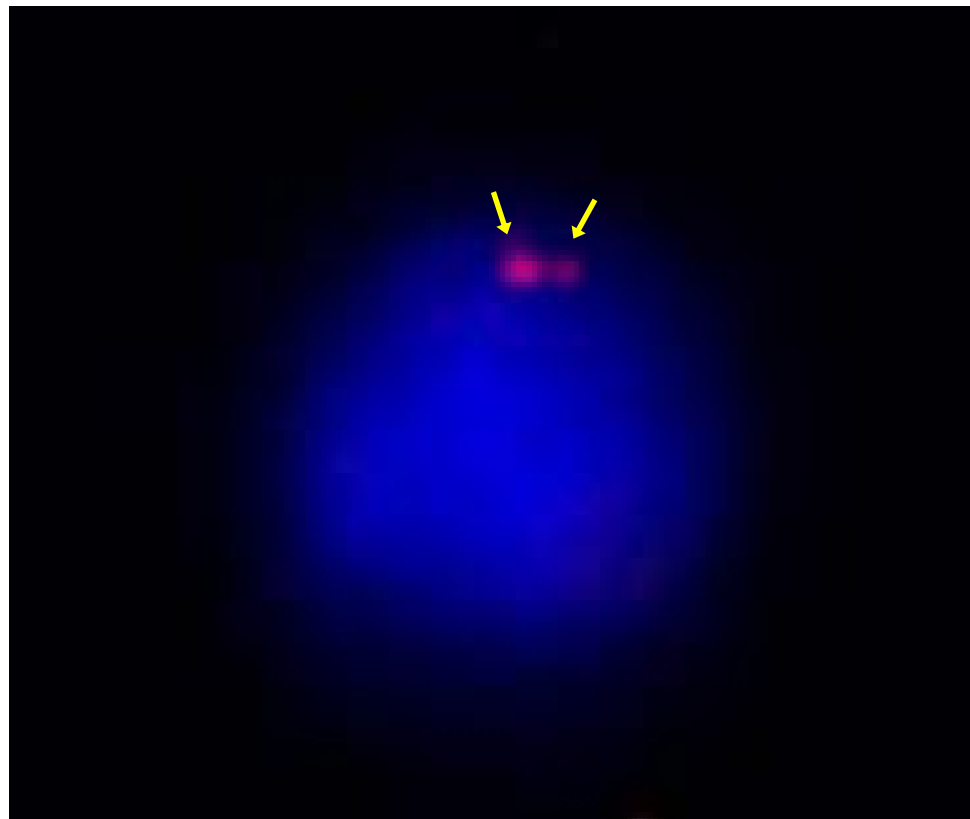
dTTP pour éviter la gêne stérique occasionnée par les dUTP marqués qui sont plus volumineux.

Si les signaux mineurs sont observés presque systématiquement avec la méthode FISH, ce n'est pas toujours le cas avec la PRINS. Il semblerait donc que cette dernière technique soit moins sensible que la FISH, du moins sous nos conditions.

II. PRINS sur spermatozoïdes

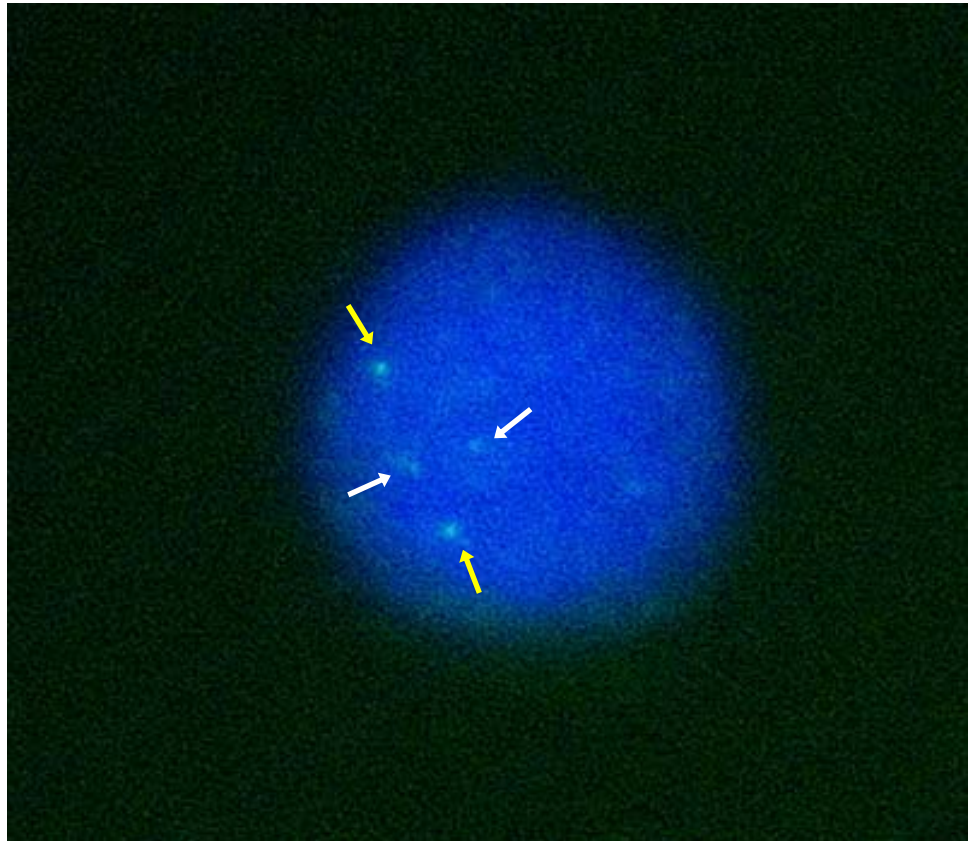
Les noyaux des spermatozoïdes apparaissent colorés en bleu, de forme circulaire. L'étape de décondensation est déterminante pour observer un marquage net sur des noyaux. Le marquage est sous forme de spots lumineux rouges et verts, disposés de façon aléatoire sur le noyau puisque les brins de chromatine sont entremêlés au sein du noyau.

Figure 3 : Noyau spermatique contre-coloré au DAPI et marqué à la rhodamine observé au microscope à épifluorescence (X63). Les sites marqués sont pointés par des flèches jaunes.



Le marquage du gène 45S par la rhodamine est un signal intense rouge présent en deux exemplaires puisque les gamètes, obtenus à partir de géniteurs tétraploïdes, sont diploïdes (Figure 3).

Figure 4 : Noyau spermatique contre-coloré au DAPI et marqué au FITC observé au microscope à épifluorescence (X63). Les sites majeurs sont pointés par des flèches jaunes et les sites mineurs par des flèches blanches.



Le marquage du gène 5S est composé de deux paires de signaux verts différents, l'un majeur et l'autre mineur, soit en tout 4 spots visibles. Comme pour les chromosomes, il est plus difficile de visualiser le signal mineur (Figure 4).

Des résultats similaires avaient déjà été obtenus par FISH, avec une netteté et une intensité du signal supérieures. Sous les conditions employées la technique PRINS semble donc être moins précise et sensible que la FISH.

CONCLUSION :

Notre travail a permis de progresser grandement dans la mise au point de la technique PRINS. Même si des améliorations restent à développer, cette technique constitue une excellente alternative à la FISH pour aider à caractériser le génome de l'huître creuse.

Outre son application dans le cadre des travaux de l'IFREMER, cette technique a été développée pour différentes utilisations chez l'homme en particulier.

Plusieurs applications fondamentales utilisant des amorces spécifiques des centromères ou des télomères permettent une analyse de la structure chromosomique, l'identification de remaniements chromosomiques ou encore l'étude de la mécanique chromosomique. Utilisée sur des fibres de chromatine décondensée, la PRINS permet une mesure relativement précise de la distance physique entre deux séquences d'ADN connues. Kadandale *et al.* (cités dans *Medecine/Sciences* 2004 ; 20 : 465-72) ont optimisé cette technique afin de localiser des séquences uniques d'ADN.

D'autre part, une modification de la PRINS utilisant une transcriptase inverse rend possible la détection de séquences uniques d'ARN.

La technique PRINS comporte aussi plusieurs applications médicales : elle permet un diagnostic prénatal invasif ou non invasif par recherche d'aneuploïdie sur des prélèvements de liquide amniotique ou encore la quantification du nombre total de cellules fœtales nucléées circulant dans le sang maternel durant la grossesse. La PRINS permet l'estimation directe des taux d'aneuploïdie et de diploïdie dans les spermatozoïdes humains et le premier globule polaire des ovocytes dans le cadre de l'amélioration du protocole de fécondation *in vitro* humaine.

La PRINS a été appliquée récemment dans le diagnostic oncologique en permettant l'estimation du pourcentage d'aneuploïdie dans des cellules en division ou en interphase, rendant facultative la culture cellulaire.

Très récemment, la PRINS a pu être utilisée pour détecter le génome viral du HPV (*human papillomavirus*) et quantifier l'efficacité de la transduction virale. Cette évaluation représente une étape cruciale dans le cadre de la thérapie génique utilisant des vecteurs viraux.

Enfin cette technique a permis la détection de séquences uniques impliquées dans des syndromes avec microdélétion à l'échelle d'un gène.

Ces applications diverses doivent encore être développées chez l'homme comme chez les autres espèces animales ou végétales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

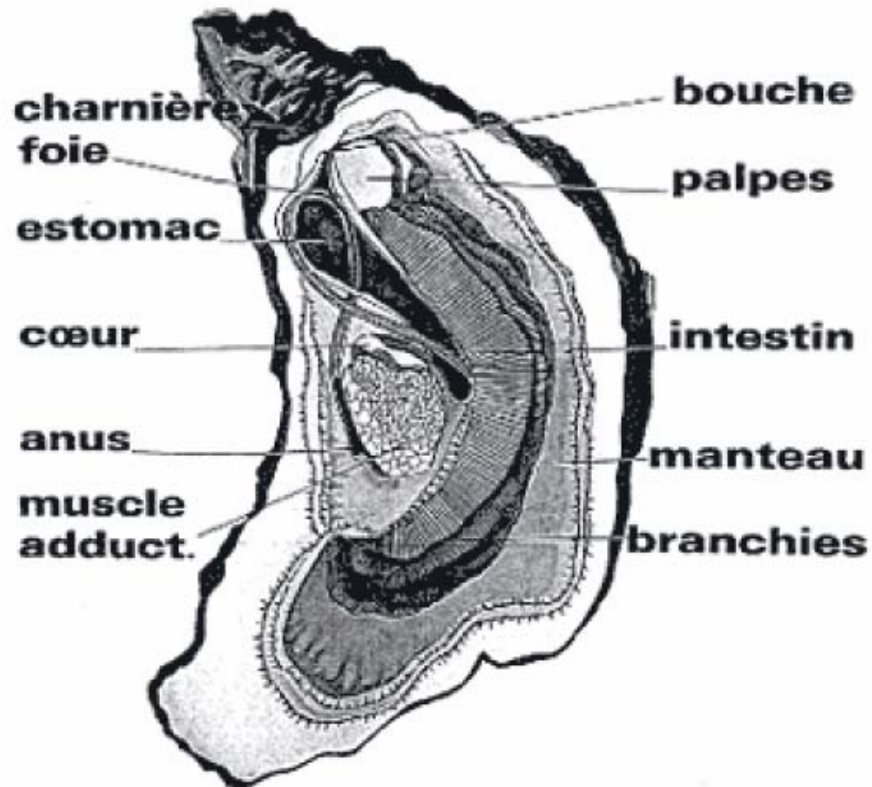
- **Barnabé G** (1985) ; Aquaculture Volume 1. Partie 2 – La culture des mollusques. Chap 1 – Reproduction contrôlée des mollusques bivalves ; Lavoisier Tec & Doc (Eds)
- **Benabdelmouna A, Nadolna K, Ledu C** (2008) ; Fluorescence in situ hybridization (FISH) of rDNA genes (5S and 18-5.8-28S) as a tool for chromosomal tagging and to assess the occurrence of somatic and sperm aneuploidy in Pacific oyster *Crassostrea gigas* ; PAG XVI, San Diego, CA, USA
- **Bond D.J, Chandley A.C** (1983) ; Aneuploidy ; Oxford Univ. Press, Oxford
- **Bonnard M** (2004) ; Impact de pesticides sur le génome d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* ; Rapport de stage Université Bordeaux 1
- **Bouilly K** (2004) ; Impact de facteurs environnementaux sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dans le bassin de Marennes-Oléron ; Thèse de doctorat Université de La Rochelle
- **Comps M** (1983) ; Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins ; Thèse de doctorat Université de Montpellier
- **Comps M, Duthoit J.L** (1976) ; Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* ; Lmk. C. R. Acad. Sc. Paris 283 : 1595-1597
- **Downie S.E, Flaherty S.P, Matthews C.D** (1997) ; Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization ; Molecular Human Report Vol 3(7) : 585-598
- **Grassé P** (1960) ; Traité de zoologie. Mollusques Lamellibranches ; Tome V. Masson et Cie Eds, Paris, 2219 p

- **Grizel H, Héral M** (1991) ; Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*); J. Cons. Int. Explor. Mer 47: 399-403
- **Hirai H** (2001) ; Relationship of telomere sequence and constitutive heterochromatin in the human and apes as detected by PRINS ; Methods in Cell Science 23 : 29-35
- **Kaczmarek A, Naganowska B, Wolko B** (2007) ; PRINS and C-PRINS : promising tools for the physical mapping of the lupin genome ; Cellular and Molecular Biology Letters, Vol 12 : 16-24
- **Krabchi K, Lavoie J, Coullin P, Bronsard M, Pellestor F, Yan J, Drouin R** (2004) ; De la conception de la PRINS à son couronnement ; Medecine / Sciences, 20 : 465-72
- **Kubaláková M, Macas J, Doležal J** (1997) ; Mapping of repeated DNA sequences in plant chromosomes by PRINS and C-PRINS ; Theor Appl Genet 94:758-763
- **Leitão A, Boudry P, Thiriot-Quévieux C** (2001) ; Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* ; Genome 44 : 735-737
- **Leitão A, Boudry P, Thiriot-Quévieux C** (2001) ; Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: ten years of evidence ; Aquaculture 193 : 39-48
- **Morel F, Roux C, Bresson J.L** (2001) ; FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype ; Molecular Human Reproduction Vol 7(5) : 483-488
- **Pellestor F, Anahory T, Andréo B, Régnier-Vigouroux G, Soulié JP, Baudoin M, Demaille J** (2004) ; Fast multicolour primed in situ protocol for chromosome identification in isolated cells may be used for human oocytes and polar bodies ; Fertility and Sterility, Vol 81(2) : 408-415
- **Pellestor F, Imbert I, Andréo B** ; Rapid Chromosome Detection by PRINS in Human Sperm ; American Journal of Medical Genetics 107 : 109-114

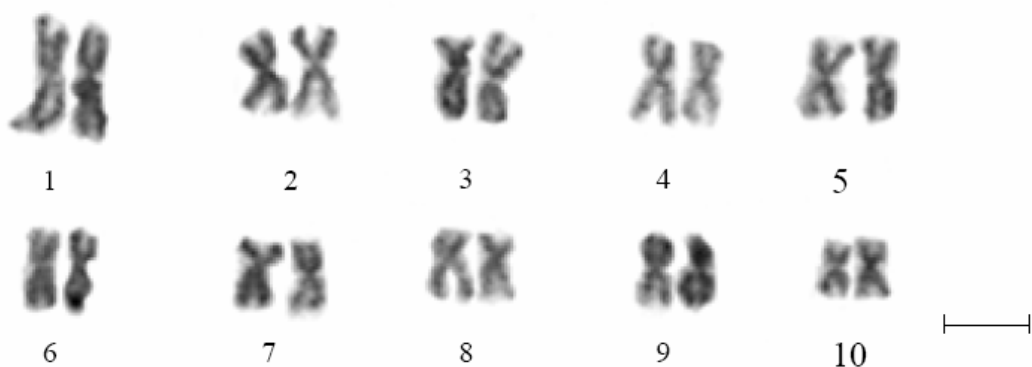
- **Thiriot-Quévieux C** (1984) ; Analyse comparée des caryotypes d'Ostreidae (Bivalvia) ; Cah. Biol. Mar. 25: 407-418
- **Thiriot-Quévieux C** (1986) ; Etude de l'aneuploïdie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia) ; Genetica 70: 225-231
- **Thiriot-Quévieux C** (2002) ; Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years ; Cah. Biol. Mar. 43: 17-26.
- **Verma R.S** (1990) ; The Genome ; VCH, New York
- **Vig B.K Sandberg A.A** (1987) ; Aneuploidy : Part A. Incidence and Etiology ; Alan R. Liss, New York
- **Wang J.Y, Samura O, Zhen D.K** (2000) ; Fluorescence in-situ hybridization analysis of chromosomal constitution in spermatozoa from a mosaic 47,XYY/46,XY male ; Molecular Human Reproduction vol 6(7) : 665-668
- **Yan J, Bronsard M, Drouin R** (2001) ; Creating a new color by omission of 3' end blocking step for simultaneous detection of different chromosomes in multi-PRINS technique ; Chromosoma 109 : 565-570
- **Zouros et al.** (1996) ; The negative correlation between somatic aneuploidy and growth in the oyster *Crassostrea gigas* and implications for the effects of induced polyploidization ; Genet. Res. 68: 109-116

ANNEXES :

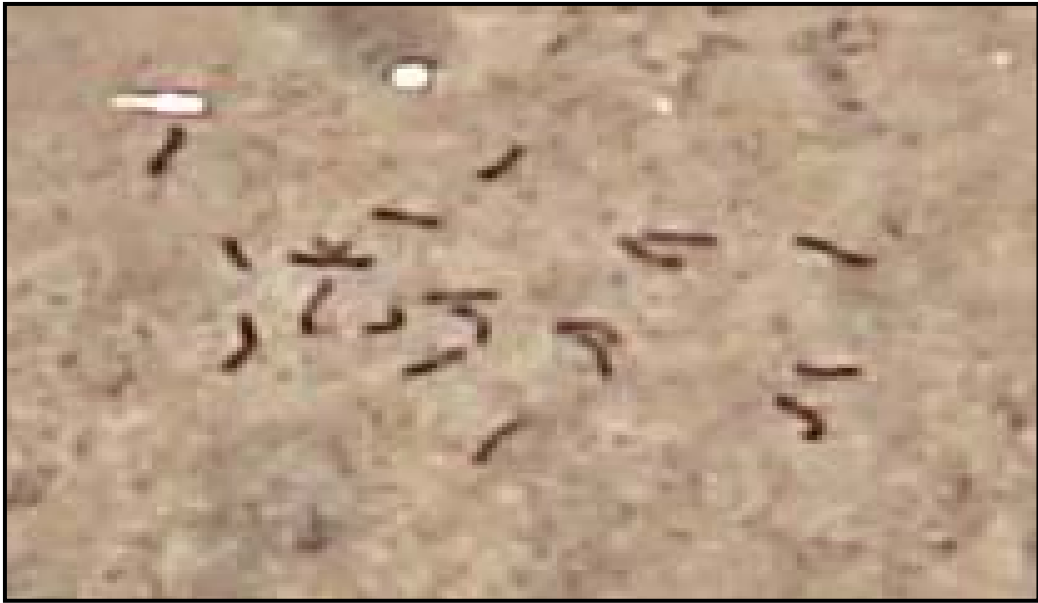
HUITRE CREUSE CRASSOSTREA GIGAS



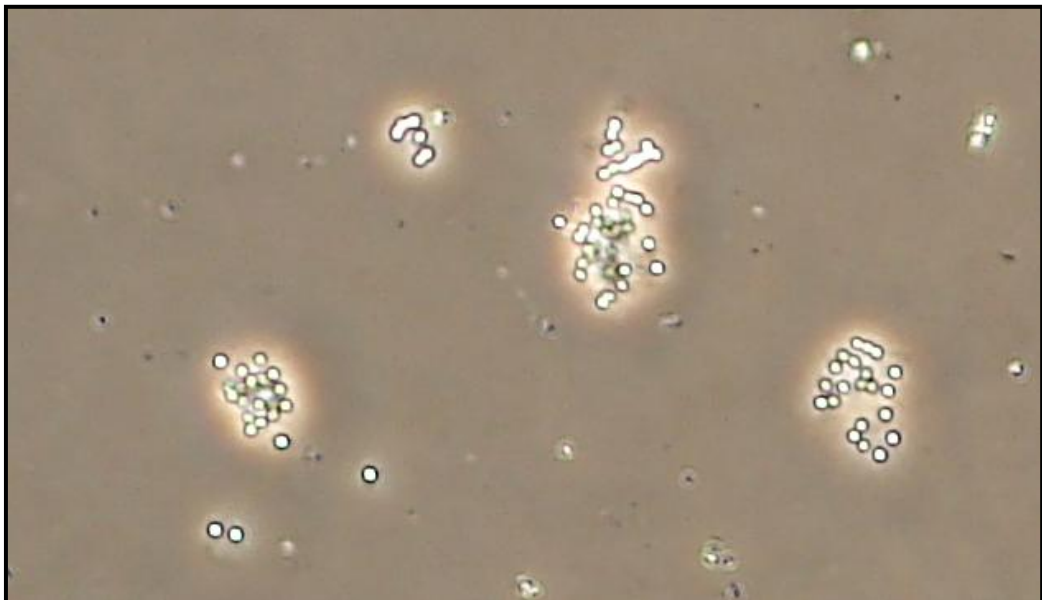
Annexe 1 : Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* hors période de maturation (Barnabé, G, 1985).



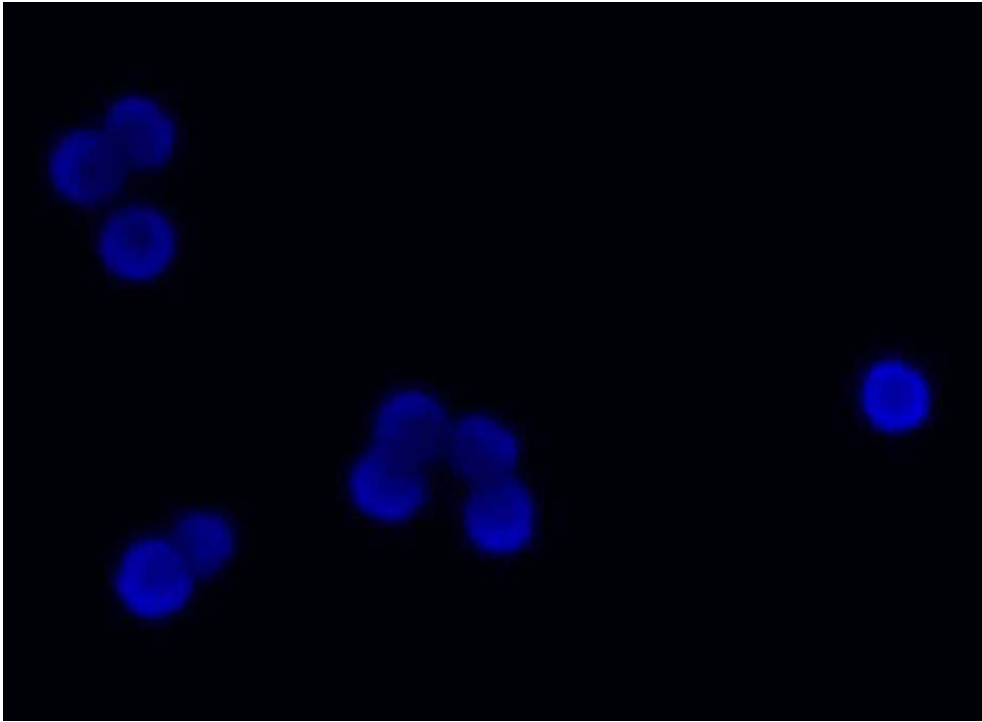
Annexe 2 : Caryotype de *Crassostrea gigas* ($2n=2x=20$) composé de 10 paires de chromosomes métacentriques. Echelle = 5 μ m.



Annexe 3 : Préparation d'embryons (cellules somatiques) observée au microscope optique à contraste de phase (X20) : une plaque métaphasique complète de $2n=2x=20$ chromosomes est visible, entourée de débris cellulaires.



Annexe 4 : Préparation de spermatozoïdes observée au microscope optique à contraste de phase (X20) : les têtes des spermatozoïdes (contenant le matériel génétique) sont visibles.



Annexe 5 : Préparation de spermatozoïdes décondensée 2min dans le DTT et colorée au DAPI (0,1 μ g/mL), observée au microscope à épifluorescence (X63).