

Laboratoire de Pathologie
et de Génétique
des Invertébrés Marins
7390 - LA TREMBLADE

MEV MAGISTÈRE
MICROBIOLOGIE
ENZYMOLOGIE
NANCY

Responsable : Professeur DECARIS

RAPPORT DE STAGE

présenté par

KRISTELL COUSIN

PREPARATION ET CARACTERISATION DE SONDAS FROIDES D'A.D.N.

D'UN PROCARYOTE DE TYPE RICKETTSIEN

ASSOCIE A LA COQUILLE ST JACQUES PECTEN MAXIMUS

Septembre 1989



Laboratoire de Pathologie
et de Génétique
des Invertébrés Marins
17390 - LA TREMBLADE

MEV MAGISTERE
MICROBIOLOGIE
ENZYMLOGIE
NANCY

Responsable : Professeur DECARIS

RAPPORT DE STAGE

présenté par

KRISTELL COUSIN

PREPARATION ET CARACTERISATION DE SONDES FROIDES D'A.D.N.

D'UN PROCARYOTE DE TYPE RICKETTSIEN

ASSOCIE A LA COQUILLE ST JACQUES PECTEN MAXIMUS

Septembre 1989

SIGLES

A.D.N.	: Acide désoxyribonucléique
A.R.N.	: Acide ribonucléique
B.C.I.P.	: 5-Bromo 4-Chloro 3-Indolyl-Phosphate
bp	: Paires de bases
BrEt	: Bromure d'éthidium
C.I.A.P.	: Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
E.C.L.	: Enhanced Chemiluminescence
E.D.T.A.	: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
E.L.I.S.A.	: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
I.P.T.G.	: Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside
L.P.G.I.M.	: Laboratoire de Pathologie et de Génétique des Invertébrés Marins
M.A.B.	: Monoclonal Antibody
N.B.T.	: Nitro Blue Tetrazolium
P.C.R.	: Polymerase Chain Reaction
R.L.O.	: Rickettsia-Like Organism
S.D.S.	: Sodium Dodecyl Sulfate
T.E.	: Tris - E.D.T.A.
X - Gal	: 5-Bromo 4-Chloro 3-Indolyl D-Galactopyranoside

REMERCIEMENTS

A l'issue de la préparation du diplôme de Magistère de Microbiologie et d'Enzymologie de NANCY, le Laboratoire de Pathologie et de Génétique des Invertébrés Marins de LA TREMBLADE m'a accueillie pendant 6 mois. Aussi, je remercie tout particulièrement H. GRIZEL, directeur du laboratoire, ainsi que E. MIALHE et toute l'équipe de recherche, qui m'ont activement conseillée tout au long de mon stage et pour la rédaction de ce mémoire.

Mes remerciements vont également à D. CAPUT et P. MALDONADO, directeurs scientifiques du centre Sanofi-Elf-Bio-Recherches, ainsi qu'à M. MORRE, grâce auxquels j'ai pu accéder aux laboratoires de biologie moléculaire de Labège.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à M. KAGHAD et X. DUMONT auprès de qui je me suis initiée, à Labège, aux techniques de séquençage des acides nucléiques, et enfin à D. SHIRE et son équipe qui m'ont offert leurs précieux conseils quant aux techniques d'hybridation.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
MATERIEL ET METHODES.....	7
I - ORIGINE DES ANIMAUX.....	7
II - TECHNIQUES D'EXTRACTION DE L'ADN.....	7
1. Extraction à partir d'organismes purifiés.....	7
1.1 Purification des R.L.O.....	7
1.2 Extraction de l'A.D.N. à partir de germes purifiés..	8
2. Extraction de l'A.D.N. à partir de broyats de branchies.	8
III - CLONAGE DE L'A.D.N. GENOMIQUE.....	9
1. Souche bactérienne et vecteur de clonage.....	9
1.1 Vecteur Bluescript.....	9
1.2 Souche bactérienne adaptée au vecteur.....	10
1.3 Milieu sélectif.....	10
2. Réalisation du clonage.....	10
2.1 Ligation.....	11
2.2 Mise en compétence.....	13
2.3 Transformation.....	14
3. Purification des inserts.....	15
IV - MARQUAGE DES SONDAS ET HYBRIDATIONS.....	16
1. Kit Chemiprobe de PBS-ORGENICS.....	16
2. Kit E.C.L. de AMERSHAM.....	17
3. Blots	17

V - SEQUENCAGE.....	17
1. Principe.....	17
2. Réalisation.....	18
VI - SYNTHESE D'OLIGONUCLEOTIDES.....	18
RESULTATS.....	21
I - PURIFICATION DE L'AGENT PATHOGENE ET EXTRACTION DE SON A.D.N.....	21
1. Purification de l'agent pathogène.....	21
2. Extraction de l'A.D.N. à partir de R.L.O. purifiés.....	21
3. Extrction d'A.D.N. à partir de broyats de branchies.....	23
II - TRANSFORMATION DES XL1- BLUE.....	24
III - ETUDE DES COLONIES RECOMBINANTES.....	25
IV - MARQUAGE DES SONDAS ET HYBRIDATIONS.....	28
1. Comparaison des deux kits de marquage-détection.....	28
2. Comparaison des sondes de taille différentes.....	29
3. Hybridations dirctes sur R.L.O. purifiés.....	30
V - SEQUENCAGE ET SYNTHESE D'OLIGONUCLEOTIDES.....	30
CONCLUSION.....	34

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

Tous les grands pays producteurs de mollusques bivalves (Etats-Unis, Canada, Japon, Corée, France, Hollande, Espagne) ont connu, à un moment de leur histoire, des épizooties. Les mortalités qu'elles engendrent peuvent rester limitées et localisées, ou bien avoir des conséquences catastrophiques pour l'économie des régions concernées (HAVEN et al., 1978 ; KAN-NO et al., 1965 ; MEURIOT et GRIZEL, 1984). Parmi les maladies les plus importantes et qui ont été relativement bien étudiées, nous citerons :

- Une iridovirose de l'huître portugaise Crassostrea angulata qui a entraîné la quasi-disparition de cette espèce des côtes atlantiques françaises entre 1970 et 1972 (COMPS et al., 1976).
- La marteilliose et la bonamiose, protozooses qui affectent l'huître plate Ostrea edulis, respectivement depuis 1969 et 1979. Ces infections se sont rapidement propagées à la quasi-totalité des centres bretons producteurs d'huîtres plates (PICHOT et al., 1980 ; MARTEIL, 1969).
- Des haplosporidioses, Minchinia costalis et Minchinia nelsoni, ont décimé les populations de Crassostrea virginica aux USA, entre 1960 et 1970 (WOOD et ANDREWS, 1962 ; HASKIN et al., 1966).

Par ailleurs, depuis quelques années, des organismes de type rickettsien ont été décrits chez plusieurs espèces de bivalves marins. Ces organismes seraient directement, ou en

association avec d'autres facteurs, la cause d'une réduction des stocks de mollusques, tel celui de coquilles Saint-Jacques Pecten maximus en baie de Saint-Brieuc. Au cours des hivers 1986-87 et 87-88, les mortalités ont été estimées entre 30 et 40 % (LE GALL et al., 1988).

Face à l'extension des échanges, et tenant compte de l'importance économique de ces productions, la mise en place de plans de prophylaxie adaptés à la conchyliculture devient urgente. A ce jour, les actions mises en place pour prévenir ou stopper l'évolution des maladies restent limitées. La nature extensive des élevages en milieu ouvert oriente la recherche d'actions plutôt vers des systèmes de prévention que des traitements curatifs ; les stratégies envisagées sont :

- la sélection d'animaux résistants à des infections expérimentales contrôlées,
- la modification des espèces (hybridations, polyploïdisation, transfert de gènes par micro-injection ou électroporation),
- la mise au point de systèmes de diagnostic pour détecter les risques d'épizootie et en limiter l'impact. Jusqu'à ces dernières années, les techniques d'histologie étaient les seules méthodes de diagnostic utilisées. Cependant, comparées aux différentes méthodologies employées en médecine humaine et vétérinaire, ces techniques restent lourdes pour la pratique de contrôles zoosanitaires. Consommatrices de temps et de personnel, onéreuses de surcroît, elles ne permettent pas, par exemple, le diagnostic de certains agents pathogènes comme les virus.

Compte tenu de l'absence de lignées cellulaires d'Invertébrés marins permettant la culture et le diagnostic d'agents pathogènes intracellulaires, une première approche a été développée, basée sur la préparation d'anticorps monoclonaux et la mise au point d'immunodosages. A l'instar des résultats acquis en diagnostic médical à l'aide de sondes d'A.D.N., il est apparu opportun d'adapter cette méthodologie en pathologie des mollusques. En effet, les sondes d'A.D.N. présentent plusieurs avantages sur les M.A.B., en particulier pour détecter des cibles qui présentent une variabilité antigénique.

Dans le cas des "Rickettsia-Like Organisms" (R.L.O.) de coquille Saint-Jacques Pecten maximus (dont les caractéristiques sont reportées en Annexe 1), la maîtrise récente de la purification de l'agent pathogène en fait un organisme de choix pour entreprendre un travail sur la préparation de sondes d'A.D.N.. Ce rapport, outre un rappel bibliographique sur les sondes d'A.D.N. et une présentation des méthodes employées, mentionne les résultats des différentes étapes clefs du travail :

- Purification de l'agent pathogène, extraction de son A.D.N.,
- Clonage des fragments génomiques de l'agent pathogène,
- Hybridations avec les fragments clonés, utilisés comme sondes (marquage non radio-actif) et caractérisation de ces sondes.

Les sondes d'A.D.N. sont des fragments d'acides nucléiques en simple brin, marqués généralement par une enzyme ou un radioisotope, pouvant se fixer sur des séquences nucléiques complémentaires, avec un haut degré de spécificité. L'utilisation des sondes a été très développée pour le diagnostic d'un grand nombre d'agents pathogènes comme, par exemple, les bactéries, les virus, les protozoaires et les champignons (TENOVER, 1978). L'intérêt des sondes d'A.D.N. réside dans leur spécificité de reconnaissance de séquences plus ou moins homologues. Ces dernières années, le diagnostic par sondes a atteint un haut degré:

- . de sensibilité de détection, des séquences simple-copie pouvant être reconnues dans un échantillon d'A.D.N. génomique, en particulier grâce aux techniques d'amplification de gènes par P.C.R. (WHITE et al., 1989),
- . de spécificité, des espèces très proches pouvant être différenciées par des séquences d'acides nucléiques (AMBROSIO et al., 1988),
- . d'automatisation, les méthodes de blot ("dot-blot" ou "slot- blot") permettant de tester rapidement un grand nombre d'échantillons et facilitant le diagnostic.

L'utilisation des sondes qui se limitait essentiellement à la recherche fondamentale en raison de l'emploi de marqueurs radioactifs, s'est accrue avec la mise au point de marquages non

isotopiques de l'A.D.N.. En effet, les sondes "froides" évitent les risques liés à la manipulation des radioéléments, ainsi que la courte durée d'utilisation de ces derniers dont les demi-vies sont relativement courtes (LEBACQ et al., 1987). Les deux stratégies de marquage non radioactif actuellement développées (MATTHEWS et KRICKA, 1988) sont :

- Le marquage direct de l'A.D.N (Fig.a, Annexe 2) : la molécule marqueuse est directement liée à l'A.D.N., par liaison covalente. La sensibilité de la méthode dépend non seulement du nombre de molécules marqueuses retenues sur l'A.D.N., mais aussi de l'activité de ces marqueurs. Aussi, des systèmes d'amplification de signaux s'avèrent souvent nécessaires pour améliorer la sensibilité de détection des sondes hybridées. Notons que ce type de marquage permet d'atteindre de très faibles niveaux de bruits de fond. Les marqueurs directs les plus usuels sont la phosphatase alcaline, la peroxidase, la luciférase, la fluorescéine, etc...
- Le marquage indirect (Fig.b, Annexe 2) : un haptène fixé à l'A.D.N. est reconnu par une protéine marquée, spécifique de l'haptène. Le procédé le plus simple consiste à utiliser un anticorps anti-[A.D.N.-haptène], lui-même reconnu par un second anticorps marqué. Grâce au marquage indirect de l'A.D.N., il est souvent possible d'amplifier la détection (ex: le système avidine-biotine qui permet une amplification "par étage"). Toutefois, l'utilisation de ce type de marquage génère fréquemment un bruit de fond élevé.

Grâce aux marqueurs "froids", faciles à détecter et de plus, stables aux températures usuelles d'hybridation, les sondes non radioactives sont devenues un outil d'investigation totalement adapté à la recherche appliquée. Une nouvelle génération de kits de diagnostic utilisant des sondes d'A.D.N. a été rapidement développée et mise sur le marché (AMBROSIO et al., 1988). Les exemples présentés dans le tableau n°1 illustrent les applications des sondes froides, tant en médecine humaine et vétérinaire qu'en agronomie.

Diagnostic de ...	Application	Nature de la sonde	Type du marquage	Références
VIRUS				
Papillomavirus	Diagnostic médical	Oligonucléotides de 16 à 22 bases	Phosphatase alcaline en 5' Sulfonation	DALLAS <u>et al.</u> 1989
Cytomégalovirus	Diagnostic médical	Fragment génomique Xba I	Biotinylée sur bras linker	RIPALTI <u>et al.</u> 1989 LURAIN <u>et al.</u> 1986
HIV	Diagnostic médical	Fragment cADN	Biotinylé par Nick translation Biotinylé sur bras linker 2 acétyl-amino fluorène	DONOVAN <u>et al.</u> 1987
Hépatite A virus	Diagnostic médical	ARN 600 bases	Biotinylé	JIANG <u>et al.</u> 1989
Avian disease virus	Diagnostic vétérinaire	Oligonucléotides	Biotinylé	CAVANAGH 1989
Potato virus	Agronomie	Fragment cADN pVuII	Biotinylé	HOPP <u>et al.</u> 1988
Herpes simplex virus	Diagnostic médical		Biotinylé	QADRI <u>et al.</u> 1988
...				
PROCARYOTES				
Salmonella	Contrôle Alimentaire	Fragment génomique Hpa I	Biotinylé par Nick translation	GOPO <u>et al.</u> 1988
Mycoplasma	Diagnostic médical	ADN génomique total	Biotinylé par Nick translation	GEARY 1987 RAZIN <u>et al.</u> 1987 HYMAN <u>et al.</u> 1987
Chlamydia	Diagnostic médical	DNA génomique total soniqué en fragment de 1 Kb	Sulfonation	DUTILH <u>et al.</u> 1988
...				
PROTOZOAIRES				
Plasmodium	Diagnostic médical	Oligonucléotide 21 bases	Phosphatase alcaline sur bras linker	SETHABUTR <u>et al.</u> 1988
Leishmania	Diagnostic médical et vétérinaire	Fragment génomique	Biotinylé par Nick translation	BARKER <u>et al.</u> 1986 VAN EYS <u>et al.</u> 1987
...				

Tableau n° 1 : Quelques exemples d'utilisation des sondes froides en diagnostic

I - ORIGINE DES ANIMAUX

Les coquilles Saint-Jacques Pecten maximus, parasitées par des R.L.O. sont originaires de la baie de Saint-Brieuc (Côtes-du-Nord). Le pourcentage d'animaux infectés est de 100 % mais, compte tenu des différents degrés d'infection (Le GALL et al., 1988), un examen histologique sur frottis de tissu branchial est pratiqué pour chaque animal, afin de sélectionner les animaux les plus fortement parasités.

Des juvéniles issus de larves produites à l'écloserie d'Argenton et élevés au laboratoire sont exempts de R.L.O..

II - TECHNIQUES D'EXTRACTION DE L'A.D.N.

1. Extraction à partir d'organismes purifiés

1.1. Purification des R.L.O.

Les R.L.O. sont purifiés généralement à partir de dix branchies de coquilles Saint-Jacques. Après une série de centrifugations différentielles en gradient de sucrose qui permet une concentration progressive des R.L.O., leur purification est achevée par une centrifugation isopycnique en gradient de Rénographine (SCHERING) (LE GALL et al., en préparation). Les R.L.O. sont dénombrés à l'aide d'une cellule de Malassez.

1.2. Extraction de l'A.D.N. à partir de germes purifiés

Le protocole d'extraction d'A.D.N. de R.L.O. a été adapté à partir de ceux établis pour une rickettsie de Vertébrés: Coxiella burnetti (VODKIN et al., 1986; SAMUEL et al., 1983).

Les R.L.O. sont ensuite repris dans 1 ml de tampon T.E., pH = 8 (Tris, 10mM; E.D.T.A., 1mM) contenant du lysozyme (Boehringer) à concentration finale de 1 mg/ml. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, l'échantillon est centrifugé 20 minutes à 10 000 g (Microfuge 12, Beckman). Le culot est resuspendu dans 900 µl de T.E. (pH = 8) contenant 0,5 % de S.D.S. (Sodium Dodecyl Sulfate) et 100 µg/ml de protéinase K (Boehringer). Après une incubation de 2 heures à 50°C, le surnageant contenant l'A.D.N. est centrifugé après dilution dans une solution de Chlorure de Césium (CsCl) à 1 g/ml, en présence de bromure d'éthidium (BrEt) à 800 µg/ml (6 heures à 60 000 rpm ; Rotor VTi 65 Beckman). La bande d'A.D.N., visualisée sous ultraviolets, est prélevée à la seringue. Après extraction du bromure d'éthidium par de l'isopropanol, l'A.D.N. est élué à travers une colonne de Sephadex G-25 (NAP 25, Pharmacia) puis précipité par l'éthanol absolu. La concentration de l'A.D.N. purifié est estimée par la mesure de l'absorbance à 260 nm.

1.3. Extraction d'A.D.N. à partir de broyat total de branchies

L'extraction est réalisée en parallèle sur des branchies d'individus sains et parasités selon le protocole dérivé de JEANPIERRE (1987). Deux branchies de coquilles sont dissociées au broyeur (potter) dans 10 ml d'une solution d'isothiocyanate

de guanidine (5M), auxquels sont additionnés 2 ml d'acétate d'ammonium (5M), 4 ml d'une solution de Sarkosyl à 10 % et 50 µl de protéinase K à 10 mg/ml. Le broyat est alors incubé 2h à 60°C, en ajoutant toutes les 30 mn, 50 µl de protéinase K. L'A.D.N. total (coquille St-Jacques + R.L.O.) est ensuite précipité par l'éthanol absolu et rincé par de l'éthanol à 70° puis repris dans du T.E., pH = 8. Une nouvelle incubation de 3h à 42°C est effectuée dans un volume de 15 ml de Sarkosyl 10 %, auquel sont ajoutés 50 µl de protéinase K toutes les heures. Trois extractions au phénol-chloroforme et une au chloroforme seul sont alors pratiquées, les acides nucléiques étant ensuite précipités par l'éthanol absolu. Ceux-ci sont séparés par centrifugation isopycnique en CsCl (1,25 g/ml) en présence de l'agent intercalant de HOECHST n°33258 à 0,5 mg/ml, utilisé pour séparer les A.D.N. de composition différente.

III - CLONAGE DE L'A.D.N. GENOMIQUE

L'ensemble du protocole est schématisé en Annexe 3.

1. Souche bactérienne et vecteur de clonage

1.1. Le vecteur Bluescript II

Le vecteur bluescript II (Stratagène) possède d'une part, un gène de résistance à l'ampicilline et d'autre part, un polylinker de 21 sites de restriction uniques, flanqué des promoteurs de T3 A.R.N. polymérase et T4 A.R.N. polymérase. Ce polylinker et les deux séquences promotrices sont inclus dans la

portion N terminale d'un fragment du gène lac-Z. Les bactéries constitutivement délétées pour lac-Z, mais possédant un Bluescript II sans insert dans le linker, produisent des colonies bleues, par complémententation entre le gène lac-Z délété dans l'A.D.N. génomique bactérien et le plasmide qui porte la partie délétée de lac-Z. Les bactéries transformées par un plasmide recombinant sont blanches : l'insert interrompant le fragment lac-Z du plasmide empêche toute complémententation avec l'A.D.N génomique bactérien. La carte détaillée du vecteur figure en Annexe 4, Fig.a.

1.2. Souche bactérienne adaptée au vecteur

Les deux souches hôtes Escherichia coli utilisées pour le vecteur Bluescript sont :

- la souche XL1-Blue $recA^-$ (rec A1, lac⁻, end A1, gyr A96, thi, hsdR17, supE44, rel A1, [F' pro AB, laq Iq, lac Z ΔM15, Tn10]) commercialisée par Stratagène.
- NM 522 $recA^+$ (sup E, thi, Δ (lac-proAB), hsd 5 [F', pro AB, laq Iq, lac Z Δ M15]).

Afin d'éviter les pertes d'épisome F', et donc celle du gène M15 complémentant le gène Lac-Z du vecteur, la souche XL1-Blue (dont l'épisome porte un gène de résistance à la tétracycline) peut être étalée sur un milieu contenant de la tétracycline (12,5 µg/ml).

1.3. Milieu selectif

La sélection des clones bleus et blancs est réalisée sur le milieu suivant :

- * Bactotryptone 2 % (Difco)
- * Bacto-yeast extract 0,5 % (Pasteur)
- * NaCl 10 mM
- * KCl 10 mM
- * Bacto-agar 2,5 mM (Difco)
- * Ampicilline 50 µg/ml
- * X-Gal 80 µg/ml (Boehringer), substrat de la β -Galactosidase
- * I.P.T.G. 0,20 mM (Boehringer), inducteur de l'opéron.

2. Réalisation du clonage

Le protocole du kit "Stratagène Cloning System" nous a guidé, tant pour le choix de l'enzyme de restriction, que pour les différents essais de ligation.

Des aliquots d'A.D.N. génomique de R.L.O. sont hydrolysés par l'enzyme de restriction Eco R I (Boehringer). Par ailleurs, le vecteur de clonage est linéarisé par Eco R I: l'extrémité 5' est déphosphorylée par la "Calf Intestinal Alkaline Phosphatase" (C.I.A.P., Boehringer), puis il est précipité par l'éthanol absolu.

2.1. Ligation

Le rapport molaire, insert sur vecteur, préconisé pour une bonne ligation est estimé entre 2 et 4.

nombre de paires de bases x 666

Or, 1 microgramme = 1 picomole x $\frac{\quad}{10^6}$

où 666 représente le poids moléculaire moyen des bases G, A, T ou C.

Chaque essai est réalisé avec 100 ng, soit 0,1 picomole de vecteur (3000 bp). Compte tenu de la taille moyenne de l'insert (4000 bp), la ligation doit être effectuée en présence de 265 ng d'insert, soit 0,4 picomole. Les différents essais sont récapitulés dans le tableau n° 2 :

	TEMOIN 1	TEMOIN 2	ESSAI 1	ESSAI 2
Vecteur 0.1 µg/µl 0.1 µg/µl	circulaire 1 µl	linéaire déphosphorylé 1 µl	linéaire non déphosphorylé 1 µl	linéaire déphosphorylé 1 µl
Insert 0.1 µg/µl	0 µl	0 µl	2,65 µl	2,65 µl
Tampon de ligation	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
T4 DNA ligase 2 /µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
TE qps 35 µl	22 µl	22 µl	19,4 µl	19,4 µl

Tableau n° 2 : PROTOCOLE DU PREMIER ESSAI DE TRANSFORMATION

La ligation s'effectue à 12°C pendant une nuit.

2.2. Mise en compétence

Deux protocoles ont été successivement utilisés pour rendre les bactéries compétentes (HANAHAN, 1983): 30 ml de milieu SOB (Bactotryptone 2 %, Bacto-yeast extract 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10mM) sontensemencés à partir d'une préculture de XL 1-Blue. L'incubation à 37°C est maintenue jusqu'à ce que la culture soit en phase exponentielle de croissance. Les bactéries sont alors placées 10 à 15 minutes dans la glace puis centrifugées (10 min, 1 250 g, 4°C).

Protocole n°1 de mise en compétence

Après avoir bien égoutté le culot, celui-ci est resuspendu dans 10 ml de solution CaCl₂ (50 mM) et de nouveau placé 15 minutes dans la glace. Après une centrifugation (1 250 g, 10 min, 4°C), le culot est repris dans 3 ml de CaCl₂ (50 mM), puis incubé 15 minutes dans la glace. Les bactéries sont alors compétentes.

Protocole n°2 de mise en compétence

Après avoir bien égoutté le culot, celui-ci est resuspendu dans 10 ml de solution RF1 :

- * RbCl 100 mM
- * MnCl₂ 50 mM
- * Acétate de potassium 30 mM
- * CaCl₂ 10 mM
- * Glycérol 5 %

puis laissé dans la glace pendant 15 minutes. Après centrifugation (1 250 g, 10 min, 4°C), le culot est repris dans 3 ml de solution RF2 :

* MOPS (Morpholino sulfonic acid) 10 mM

* RbCl 10 mM

* CaCl₂ 75 mM

* Glycérol 15 %

Après 15 minutes dans la glace, les bactéries sont compétentes.

2.3. Transformation

Pour chaque essai de transformation, le mélange de ligation vecteur-insert est ajouté à 500 µl de bactéries compétentes puis maintenu pendant 30 minutes dans la glace. Une incubation de 90 secondes à 42°C est alors pratiquée avant de replacer le tube dans la glace. Les suspensions bactériennes sont étalées à raison de 50 à 100 µl par boîte sur le milieu sélectif précédemment décrit. Les colonies blanches et bleues sont visibles après environ 18 heures de culture à 37°C.

Pour chaque essai, un taux de transformation est évalué par référence à HANANAN (1983) en calculant le rapport :

$$\frac{\text{nombre de bactéries transformées}}{\text{nanogrammes de vecteur utilisé pour l'essai}} \times 1\,000$$

3. Purification des inserts

Une minipréparation d'A.D.N. plasmidique est effectuée à partir d'une préculture des colonies recombinantes isolées, selon le protocole de lyse alcaline décrit par MANIATIS (1986). Après hydrolyse par Eco R I, l'insert est séparé du vecteur par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7% (Biorad).

Après coloration au BrEt, les bandes d'A.D.N. correspondant aux inserts sont visualisées sous ultra-violets et découpées finement au scalpel. L'A.D.N. est extrait de l'agarose en utilisant le kit Geneclean (Ozyme) : chaque morceau d'agarose est dissous dans deux fois son volume de NaI par chauffage à 50°C (7 minutes environ). Un μ l de billes Geneclean pour 100 μ l de NaI est ajouté dans chaque tube. Au cours des 10 minutes d'incubation dans la glace, l'A.D.N. se fixe sur les billes. Une brève centrifugation (5 à 10 secondes, centrifugeuse Eppendorf 5412) permet la mise au culot des billes et l'élimination du surnageant. Le culot est lavé à trois reprises par resuspension des billes dans 0,5 ml de solution de lavage et centrifugation (5 à 10 secondes). Les billes et l'A.D.N. adsorbé sont alors repris dans 20 μ l de tampon T.E. (pH = 8) et incubés 5 minutes à 50°C, afin de décrocher l'A.D.N.. Après centrifugation (1 minute à 11 000g), les billes sont mises au culot, et le surnageant est prélevé. La présence et la pureté des inserts sont contrôlées par électrophorèse sur minigel d'agarose.

IV - MARQUAGE DES SONDÉS ET HYBRIDATIONS

Le laboratoire n'étant pas équipé pour l'utilisation de réactifs radioactifs, seuls des systèmes de marquage froids ont été utilisés. Les hybridations sont réalisées sur membrane de nitrocellulose ou de nylon. Le principe des kits utilisés est schématisé en Annexe 5 (fig.a et b).

1. Kit Chemiprobe de PBS ORGENICS

Le kit Chemiprobe permet un marquage des sondes par sulfonation. Ce type de marquage ne nécessite pas de réaction enzymatique, mais consiste en une simple modification chimique des résidus cytosine de l'A.D.N., selon la méthode de SVERDLOW et al. (1974) : un mélange de bisulfite de sodium (0,02 M) et de méthylhydroxylamine (0,07 M), dans des conditions de température modérée (25°C), fixe de façon covalente un radical SO_3^- sur le carbone 6 des cytosines. Par cette méthode, 15 % de ces bases sont modifiés. Le procédé de détection indirect fait appel à un anticorps monoclonal de souris, spécifique des résidus sulfonés, sur lequel se fixe un anticorps de chèvre (anti-anticorps de souris), couplé à la phosphatase alcaline. Celle-ci est mise en évidence à l'aide du substrat B.C.I.P., associé à du N.B.T.. La sensibilité du kit a par ailleurs été récemment améliorée par l'utilisation d'une solution de blocage contenant de l'héparine.

2. Kit E.C.L. (Enhanced Chemiluminescence) de AMERSHAM

Le kit E.C.L. a pour principe un marquage des sondes par fixation covalente d'un complexe horseradish-peroxydase sur l'A.D.N. simple brin en présence de glutaraldéhyde. Après hybridation avec la sonde marquée, le blot est mis en contact avec le réactif de détection qui initie l'oxydation du luminol, catalysée par la peroxydase. La lumière émise à l'endroit où est fixée la sonde est détectée sur un film autoradiographique Hyperfilm E.C.L. (Amersham) en moins d'une heure.

3. Blots

L'A.D.N. de R.L.O. est déposé grâce à un appareil de slot-blot (BRL) sur membrane de nylon Hybond N⁺ (Amersham) puis fixé à 80°C sous vide.

V - SEQUENCAGE

Le séquençage des inserts, selon la méthode de Sanger, a été fait à SANOFI-Labège, en raison de l'utilisation de nucléotides marqués de façon radioactive.

1. Principe

L'ensemble du protocole est récapitulé sous forme d'un schéma en Annexe 6.

2. Réalisation

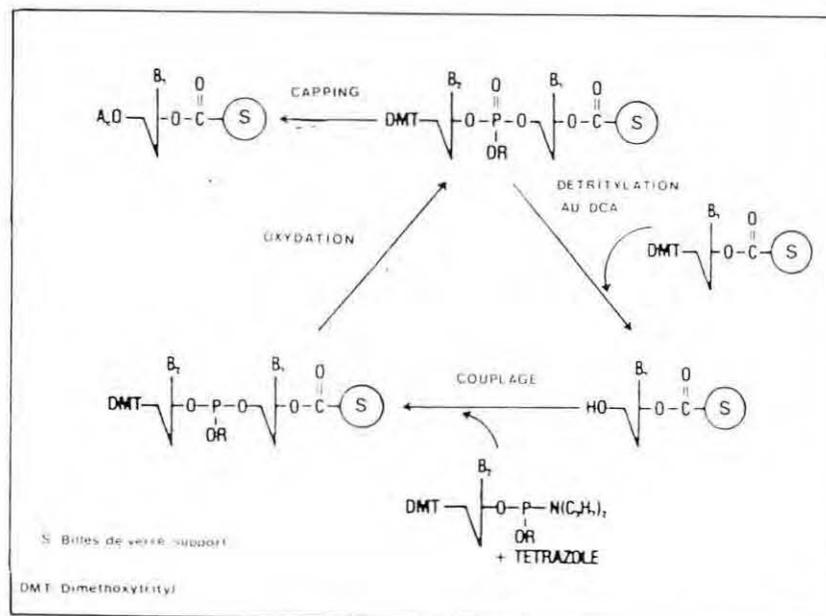
Les fragments à séquencer sont insérés dans les phages M 13 mp18 et M 13 mp19, de chez BRL (Annexe 4, Fig.b), caractérisés par un linker inversé et qui permettent de cliver des inserts Hind III-Eco R I dans les deux sens. Après ligation, les A.D.N. sont utilisés pour transférer une culture d'Escherichia coli NM 522 rendue compétente par traitement au CaCl₂ (Matériel et Méthodes III, 2.2.). Après étalement sur boîtes de pétri et incubation à 37°C, une plage d'inhibition de croissance, apparaissant blanche sur le tapis bactérien, est isolée et repiquée dans 2,5 ml de culture d'E.coli. Après une incubation d'environ six à huit heures à 37°C, 1,5 ml de culture sont centrifugés (1 min, 10 000 g). Le surnageant contient le phage, sur lequel sera réalisée la réaction de séquençage :

- soit grâce au kit Sequenase de USB (nucléotide marqué : [α -³⁵S]thio-dATP)
- soit par le séquenceur automatique Applied Biosystem (type 307 A Sequencing System).

VI - SYNTHÈSE D'OLIGONUCLEOTIDES

Les oligonucléotides, susceptibles de servir d'amorces dans des systèmes d'amplification par "Polymerase Chain Reaction" (P.C.R.) ont été synthétisés à l'aide d'un système Cyclone D.N.A. Synthetizer (Milligène). Le principe de la

synthèse d'A.D.N. repose sur l'utilisation des β -cyanoéthyl phosphoramidites. Le cycle de polymérisation est résumé dans la figure n° 1 :



PRINCIPE DE SYNTHÈSE DES OLIGONUCLEOTIDES

Un premier nucléotide est fixé sur un support de billes de verre par son extrémité 3'. L'extrémité 5' est protégée par un groupement diméthoxytrityl. La première étape du cycle consiste à éliminer cette protection grâce au D.C.A. (Acide dichloroacétique) pour permettre dans un deuxième temps, le couplage avec un β -cyanoéthyl phosphoramidite nucléotide en

présence de tétrazole qui agit comme activateur de la réaction chimique. Le phosphore est rendu pentavalent par oxydation à l'iode, et un nouveau cycle peut alors être reconduit.

Lorsque le polynucléotide est achevé, l'extrémité 5' OH libre est protégée par l'anhydride acétique (étape de "capping").

I - PURIFICATION DE L'AGENT PATHOGENE ET EXTRACTION DE SON A.D.N.

1. Purification de l'agent pathogène

La pureté des suspensions obtenues selon le protocole décrit en Matériel et Méthodes, II - 1.1. a été vérifiée en microscopie électronique. Le cliché figurant en Annexe 7, Fig.a, montre la rareté des débris cellulaires et de contaminants dans les préparations.

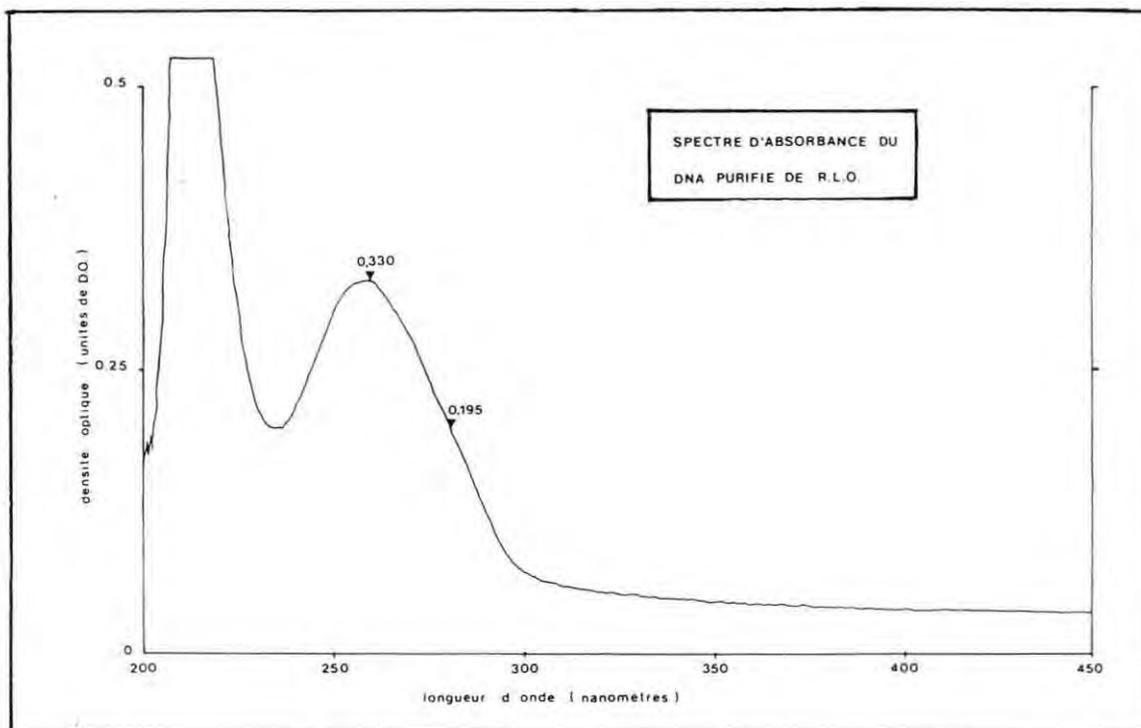
Le nombre de R.L.O. obtenus à chaque purification, estimé par comptage à la cellule de Malassez, est de l'ordre de 10^{10} microorganismes.

Les suspensions de microorganismes sont immédiatement utilisées pour l'extraction d'A.D.N. ou congelées à -80°C , afin d'éviter tout risque de prolifération bactérienne.

2. Extraction de l'A.D.N. à partir de R.L.O. purifiés

Le protocole, adapté des méthodes publiées pour des procaryotes parasites de cellules de Vertébrés, s'est avéré efficace pour la digestion des structures pariétales de R.L.O.

La quantité de matériel génétique purifié sur gradient de CsCl (cf. photo Annexe 7, Fig.b) et le degré de pureté de l'A.D.N. sont estimés au spectrophotomètre .



Sur la base d'une absorbance à 260 nm égale à une unité de D.O. pour une concentration d'acides nucléiques de 50 µg/ml, la quantité d'A.D.N. purifié de R.L.O. (repris dans 500 µl de T.E.) est estimée à :

$$0,33 \times 50 \times \frac{500}{1000} = 8,25 \mu\text{g}$$

Si l'on se réfère aux rickettsies étudiées (MYERS et WISSEMAN 1981), la taille du génome de R.L.O. est d'environ $1,8 \times 10^6$ bp ; chaque organisme contient donc approximativement 2×10^{-15} g d'A.D.N. Le rendement de l'extraction à partir d'un culot de R.L.O. est donc de :

$$\frac{8,25 \times 10^{-6}}{2 \times 10^{-15} \times 5 \times 10^{-10}} \times 100 = 8,25 \%$$

Mais le calcul n'a qu'une significatrion minime dans la mesure ou le comptage sur cellule de Malassez est relativement imprécis.

Le degré de pureté de l'A.D.N. apprécié par le rapport

$$\frac{\text{D.O.260}}{\text{D.O.280}} = 1,7$$

a été considéré suffisant pour la suite de la manipulation.

3. Extraction d'A.D.N. à partir de broyats de branchies

La deuxième méthode d'extraction de l'A.D.N. à partir de broyat de branchies de Pecten maximus parasités n'a pas permis de distinguer deux bandes. Le principe de la méthode n'est cependant pas remis en cause, vu qu'il a donné de très bons résultats dans le cas d'extraction d'A.D.N. de Bonamia ostreae parasite intrahémocytaire de l'huître plate Ostrea edulis (HERVIO, com. pers.).

II - TRANSFORMATIONS DES XL1-BLUE

Les résultats obtenus pour une première expérience de transformation sont présentés dans le tableau n° 3 :

	TEMOIN 1	TEMOIN 2	ESSAI 1	ESSAI 2
Vecteur	circulaire sans insert	linéaire déphosphorylé sans insert	non déphosphorylé avec insert	déphosphorylé avec insert
Quantité de vecteur utilisé pour l'essai	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
Volume étalé par boîte	50 µl	100 µl	80 µl	80 µl
Volume total de l'essai	630 µl	630 µl	630 µl	630 µl
Nombre moyen de colonies bleues par boîte	1200	76	10	33
Nombre moyen de colonies blanches par boîte	0	0	0,4	0,7
Taux de transformation	$1,5 \times 10^5$	$4,6 \times 10^3$	9×10^2	$2,7 \times 10^3$

Tableau n° 3 : TRANSFORMATION DES XL1-Blue

Les boîtes 1 et 2, sur lesquelles aucune colonie blanche n'a poussé, confirment l'efficacité du mode de sélection des colonies recombinantes. Il apparaît, par ailleurs, que la déphosphorylation du vecteur avant ligation s'accompagne d'une augmentation du nombre de colonies blanches par boîte.

En bilan, cette transformation n'a permis d'isoler qu'une dizaine de clones recombinants. Suspectant le protocole de mise

en compétence par traitement au CaCl_2 d'être la cause de ces faibles résultats, un deuxième essai de transformation, réalisé selon le deuxième protocole cité dans la partie Matériel et Méthodes, III - 2.2., a permis d'obtenir des taux de transformation beaucoup plus élevés (supérieurs à 10^7 par microgramme de vecteur) et une banque plus complète du génome de R.L.O. : 400 colonies recombinantes environ ont été isolées.

III- ETUDE DES COLONIES RECOMBINANTES

Une étape préliminaire a consisté à déterminer la taille des inserts issus des plasmides recombinants (nommés pKSRE) correspondant aux neuf colonies isolées lors de la première transformation (minipréparation, hydrolyse par enzyme de restriction puis électrophorèse). Le tableau n° 4 récapitule les résultats :

pKSRE	31	32	33	34	35	36	41	42	43	
Taille (bp)	4160	2390	4360	4500	3500	4300	3800	3700	3800	$\bar{x} = 3850$

Tableau n° 4 : Récapitulatif des tailles des inserts

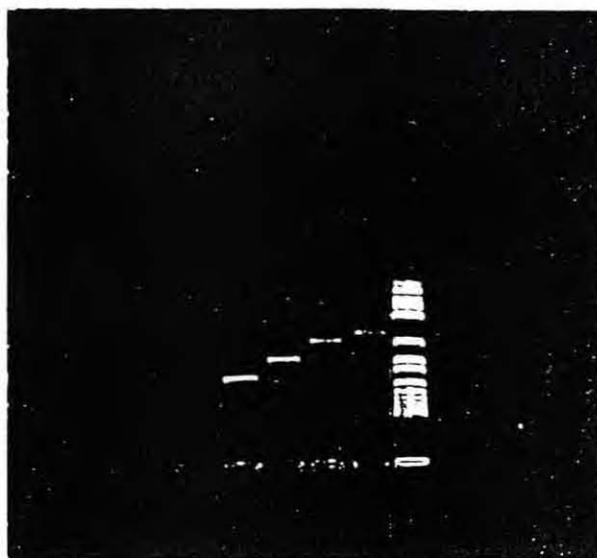
Comme prévu, les tailles des inserts sont voisines de 4000 bp (3850), taille statistique des fragments issus de l'hydrolyse par une enzyme de restriction reconnaissant un site à 6 bp. Pour tous les plasmides pKSRE étudiés, des hydrolyses par différentes enzymes de restriction ont permis d'établir une

carte physique succincte. Comme cela apparaît sur le tableau n° 5, l'insert du plasmide pKSRE 34 contient le plus grand nombre de sites Hind III, correspondant à plusieurs fragments de taille variable (A, B, C, D et E), estimées par référence au marqueur de taille (phage lambda coupé par Hind III (Boehringer) (Annexe 8, Fig.a).

Enzyme utilisée pour l'hydrolyse	Distance de migration	log(taille en bp)	Taille approximative en bp
Eco R 1	4,30 cm	3,48	3020
	3,50 cm	3,68	4780
			Σ=7800
Hind 3	7,45 cm	2,79	620
	6,15 cm	3,68	1200
	4,85 cm	3,37	2300
	4,05 cm	3,55	3550
			Σ=7670
Eco R 1 + Hind 3	8,15 cm	2,64	E : 440
	7,45 cm	2,79	D : 620
	6,15 cm	3,08	C : 1200
	4,90 cm	3,36	B : 2290
	4,35 cm	3,48	A : 3020
			Σ=7550
Hae 3
	10,80 cm	2,06	115
	10,40 cm	2,14	140
	9,80 cm	2,27	190
	9,00 cm	2,44	280
	8,55 cm	2,54	350
	8,45 cm	2,56	365
	7,35 cm	2,80	630
6,25 cm	3,06	1150	

Tableau n° 5 : Caractérisation de l'insert du plasmide pKSRE 34

La possibilité d'obtenir à partir d'une seule préparation de plasmide pKSRE 34 des fragments de génome de R.L.O. de taille variant entre 440 et 4500 bp (B, C, D, E et l'insert total) nous a conduit, dans un premier temps, à privilégier l'étude de ce plasmide, dans l'optique d'essais de sondes. Après hydrolyse par Eco R I pour l'insert 34 total, ou Eco R I puis Hind III pour les inserts B, C, D et E, la purification des fragments a été réalisée selon le protocole décrit dans le paragraphe III-3., et contrôlé sur minigel d'agarose (1 % Biorad).



B C D E

(les caractéristiques du marqueur de taille sont reportées en Annexe 8, Fig.b)

Ces différents fragments d'A.D.N. ont été testés comme sondes.

IV - MARQUAGE DES SONDAS ET HYBRIDATIONS

Les deux kits de marquage choisis permettent de comparer un marquage direct (Amersham) et un marquage indirect (Organics) dont les principes sont schématisés en Annexe 5.

1. Comparaison des deux kits de marquage détection

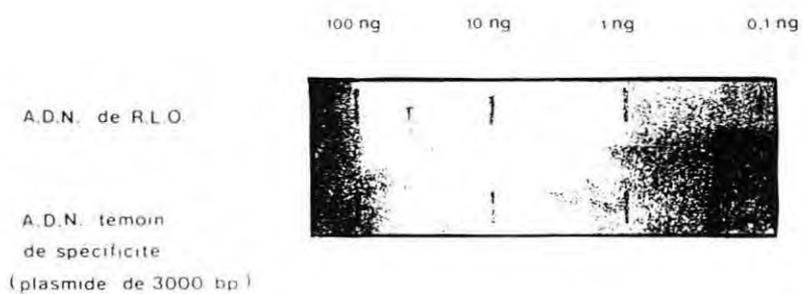
Une première série d'expériences a permis une étude comparative des deux systèmes de marquage testés lors d'hybridations entre la sonde 34 et l'A.D.N. génomique total de R.L.O., préalablement fixé sur membranes de nylon Hybond N+. Les résultats (cf. page suivante) font apparaître une spécificité de reconnaissance vis à vis d'A.D.N. témoin meilleure pour le kit E.C.L. (10^{-14} moles), comparativement au kit Chemiprobe (10^{-15} moles) : tableau n° 6.

		KIT	
		CHEMIPROBE	E.C.L.
S P E C I F I C I T É	seuil de spécificité en ng	spécifique pour des valeurs inférieures à 1 ng d'A.D.N. témoin de plasmide (3000 bp)	spécifique pour des valeurs inférieures à 10 ng d'A.D.N. témoin de plasmide (3000 bp)
	seuil de spécificité en moles	10^{-15}	10^{-14}

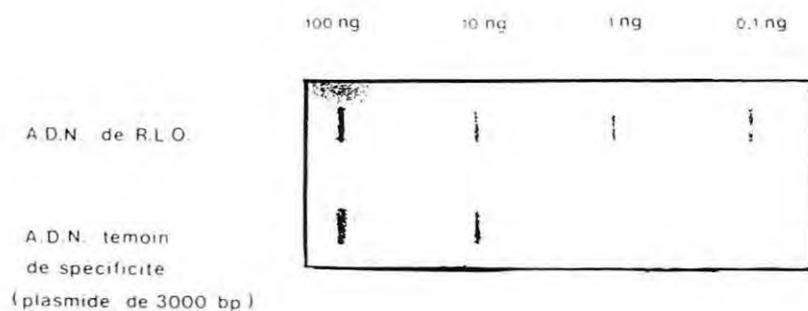
Tableau n° 6 : Spécificité des deux types de marquage testés

HYBRIDATIONS AVEC LA SONDÉ 34 (45 Kb)

RESULTATS OBTENUS AVEC LE KIT ORGENICS



RESULTATS OBTENUS AVEC LE KIT AMERSHAM



D'un point de vue sensibilité, le spot correspondant à 100 pg d'A.D.N. génomique, dépôt minimum testé, est tout juste visible avec le kit Chemiprobe, un peu plus net avec le kit E.C.L.. Sachant que la taille du génome de R.L.O. est de l'ordre de $1,8 \cdot 10^6$ bp, on en déduit que le seuil de sensibilité est approximativement de 10^{-19} moles. Le bruit de fond est, par ailleurs, moins intense sur le cliché E.C.L. que sur la membrane révélée par le kit Chemiprobe, alors que le même type de support a été utilisé pour les deux hybridations (Nylon Hybond N+).

En raison de sa meilleure spécificité, de la plus faible intensité de bruit de fond et surtout de la rapidité et de la facilité d'utilisation (révélation en moins d'une heure), nous avons préférentiellement travaillé, par la suite, sur le kit E.C.L.

2. Comparaison des sondes de tailles différentes

La taille de la sonde intervenant sur la sensibilité et la spécificité de détection, des sondes de tailles variant entre 4500 et 440 bases ont été testées comparativement. Les résultats obtenus avec le kit E.C.L. figurent en page suivante. La sensibilité de détection est meilleure avec la sonde B, la plus longue, comme le montre le tableau n° 7.

	SONDE B	SONDE C	SONDE E
TAILLE	2290 bp	1200 bp	440 bp
LIMITE DE DETECTION	100 pg	1 ng	10 ng
D'A.D.N. DE R.L.O.	soit $8,3 \cdot 10^{-20}$	$8,3 \cdot 10^{-19}$	$8,3 \cdot 10^{-18}$

Tableau n° 7 : Comparaison des sondes de tailles différentes

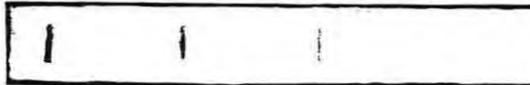
HYBRIDATIONS AVEC DES SONDAS DE TAILLES VARIEES

A.D.N. de R.L.O. 100 ng 10 ng 1 ng 0,1 ng

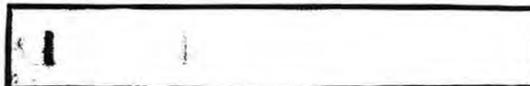
SONDE B: 2300 bp



SONDE C: 1200 bp



SONDE E: 420 bp



3. Hybridations directes sur R.L.O.purifiées

Des R.L.O. purifiés sont déposés directement sur membrane de nitrocellulose. Après traitement à la protéinase K et dénaturation de l'A.D.N., une hybridation est réalisée avec la sonde 34 "totale". Après révélation aucun signal n'apparaît, alors que, sur le premier spot, 25 millions de R.L.O. ont été fixés (limite de saturation de la membrane), soit $4,15 \cdot 10^{-17}$ moles.

V - SEQUENCAGE ET SYNTHÈSE D'OLIGONUCLEOTIDES

Le séquençage des différentes sondes a été entrepris selon les deux méthodes citées en Matériel et Méthodes, V - 2. La complémentarité des deux procédés de séquençage permet de lever la plupart des imprécisions de lecture sur près de 400 bp.

La séquence du fragment E a été retrouvée dans sa totalité sur la courbe obtenue par séquençage automatique : on retrouve en position 501 le site ECO R I présent à l'extrémité du fragment E de taille totale 507 bp (Annexe 9). Par comparaison avec le cliché du gel obtenu par séquençage manuel, les 400 premières bases ont été confirmées (Annexe 10) :

Séquence du fragment E :

```
5'  GCTTGGGTCA TCATCACGGG CCATTAACGT TTCCACGAGC ATTGGAATGT
    TAACGCCTGC AATGACTTCA TAATGCTCTT TGTCGACGAC AATGCGGCTG
    GCAGCATTGA ACGGGCTGCC TCCCCATGTA TCAACGAGAA ACAGCACGCC
    TTTAGTGGTG TCGAGTTTTC CCAACTGAGC GTTGTACTTT TCAATCAGCG
```

TTTCGGCATT TTCANCTGGA ACGAAATCGA TCCAGCCGAC GTTTTCCTGC
 TCGCCTAACA GCATTTCTGC CGTTTTAAGC AACTGCTCTG CAGCCCAACC
 ATGTGTGCTT ATAACAATAG CAaTGGtCAC TTGCTACCTC CTTTATTATC
 GTTAACACCT CAACGTGCCA GATGTaTTTT TGAaTCGTCG TCcACaATCN
 GAATCGATTN NANANGGGCT ACAACcAAAA ACCCTNgCGT TTcGcGACTT
 TaTTTTaGat AtCGNAAgAA 3'

Le fragment D d'extrémités Hind III - Hind III a été religué, par malchance, dans le même sens à l'intérieur des trois phages sélectionnés et séquencés. Aussi, il n'a été possible de connaître la séquence du fragment D que pour une seule de ses extrémités, sur 314 bp :

3' TAGCAGTACT CATATTCATG GTTTCACCGC TGTGATaCAC AACATGAGCA
 CACCAGAACC ACCGCACCCT ATGACTtACC CGATGAAaCC AGTAATAAAA
 AAATTCCATA AGCACAAATA ACAAGGGTAT AGTCAAGATA TTCATTTCAA
 TATCAAAGAG CCGGAATTGA TcCAACCAGC TAAACGCCAT TCCCACGAAA
 GAGCATAGTA AATGATTTCT GCTACCTGAT AACTCATACC CAACCCGGCT
 TGGCCATAAT TTCCCGCCAC ACAAACTGCT GGGATCGGCT TTCGCTTCAT
 TACTGGCAAA ACGT.... 3'

Les deux extrémités des fragments B et C ont pu être, elles, établies :

Première extrémité du fragment B

3' ..TTCTTTAG CCAGGGGTAG AATATCTGGT GCAGAAAATA TAGTAAAAAA
 TGATGCAACT CATTCTGTG TTACTcAGGG CAAAAAATG CAAATAGTTG

AGCTGAAGAC AGAAGGTGTA GGATTACATG GTGTCGCTCG TCTGACATTC
 AAATGTGGAG AGTGAGAATA TTTTTTGGTA AGCGTCAAAT ATGCGCGTTC
 TGGCTGTGCG TAGCGGAACC TGTGGGAGCa CgATGCCGAT AaGTGAAaGG
 CATCGTGCTA TGAAGGAGGA TTCTATCGAT GTGGTCAATG GAAGACGGTT
 ACcAGAGATA GGGCTTATGC ATAAAAAaT AAGCCCGTGT AGCAGAGTTC
 TCCATCAGCC TGGCTACCgG TCGgGCAGAT ATTTACaCGG aAACACCGgT
 CAAAGTGTCT GGCcTTtAaG CGCGTCATAG ACc... 3'

L'autre extrémité du fragment B

5' TCAAAGGaGG AGAAAAATAA GGCTTACTTC AAGTCACCCC CACTATCAAT
 GGAAGTTTCT TATTTATACC TGTTCTTAAT GTTAAATGTG ATGTGTAAAT
 TCCTAAATTT AAATCTATTG CCCATTTTGG GTTAAATTTT TTTGCTCAAG
 GGTAATTGTC ATGGCGGTCA CCAAACAATA ACGTAGCTGG CGAAGTTCCA
 TTGCGATTCT CCGGAGAAGG CTGGGATATT TACATTAAAT CAACATGCTG
 TCAGAAGAAA GCACTGAGTA GAGAATGGCG CGCATAACAA AACAACCGAC
 AGGTTGAcTT TTCAGAATAG GGCAGTTTG GTGATCGTCA CCAGTATATG
 GGGTTTGAGG GCCAATGGAA CGAAAACGTA CGTTAAGGAG ATAaTTCGtT
 GTTTATATTT AAATTTAGAG CTCTCAGTtC CCcTTTTAAA ATATCCTCTG
 GCAaCGTGAA ... 3'

Première extrémité du fragment C

3' CTTCTGCAGT CGGAATTAAC CGTATTGTTG GAAAAAGCCC TAAATAAGCA
 ACAAAGCCT GATTCTGAAA AAGAAGCGGC GATATTTAAT CATACTTCTG
 ATACAGGAAA ATGGTCGTGG CTGCTCTGGT TATTATTTCC CATTGGCTTG
 GGAATAGGCC TTGTTCTTTC CAAACAAAAA AGCAGAGTAT TAAAAACGC
 TGAGAGTACC TACGTTGAAG TACTTTCCGA TGATCCTGCC GAACCTTCTT
 TATTTAAAAC CGTGAGACAA TCTATCTCAG GTATAGGTCA GTGGCTGGTT
 AAGCTGTGGC GTAAAAGAAC GACAGGAGAA CTGAAACAGC CTGTAGTTGT

TGAGGCGGTC GATGTGGAAA ATGTGGGAGA GGTGAGTGCG TCGGCcAACc
 GTCAGATACc aGAAGATGAC CCATTAcGAG AAGTGGAAT CTGTATAGCC
 CATGGTCGTT TTtAATCcAG GCcTG... 3'

L'autre extrémité du fragment C

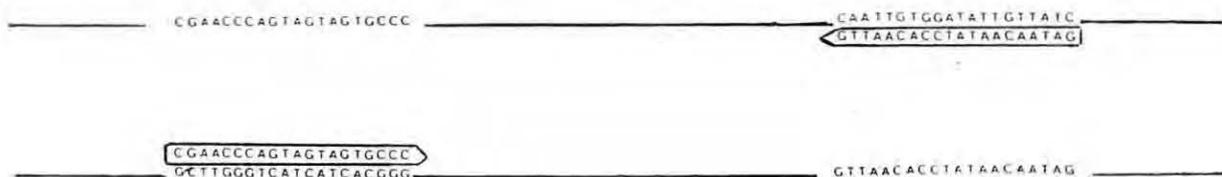
3' GAAAGAATGG TTGAGGCTAT TTTTTGTCAG AGCTGCCAAT GCGTAAGTAC
 TACATTAATA ACTTGAATAT GCTATAAAAA ACAGTGATTA CCGTATAAAC
 ACTCCATCAG TATCGATaAT CACTGTTTTT ATTCTATCAA TCCATATTAT
 CCAGAATATC TTGCGCCTCC TGCTTCTGAG CTTCCGTTCC CTGCTCAGCG
 ACtTCTCCCA GAATATCACG GCGCCTTCC GTATCTCCCA TATCCAGATA
 AGCCTGCGCC AGGTCAATTT TCGTAGCCAC TTCATCTTCA TCAGAGAGAA
 AATCCATATC TTCGCTATCC AGTGCCTCTT CGAGACCGGA CATACTTTCG
 CGAACCATTT CTTCTCCCAG CTCACTGTCT TCTCCGGGAA CATCACGCGt
 TATCTTATCA TAC.... 5'

Deux amorces de 20 bp sont actuellement en cours de
 synthèse :

5'CGAACCCAGTAGTAGTGCCC 3'

5'GATAACAATATCCACAATTG 3'

et seront ultérieurement testées en P.C.R.



L'introduction des biotechnologies en pathologie des mollusques est relativement récente, mais correspond à une volonté d'appliquer rapidement aux productions marines les méthodologies qui ont été progressivement développées en pathologie humaine, vétérinaire ou végétale. Dans ce contexte, les recherches ont été focalisées au cours de ces trois dernières années sur la préparation d'anticorps monoclonaux spécifiques de différents types d'agents pathogènes, pour lesquels des protocoles d'isolement et de purification à partir d'animaux infectés avaient pu être établis. Consécutivement, divers types d'immunodosages ont été mis au point, en particulier enzymatique, ouvrant ainsi la voie à l'utilisation de kit ELISA commercialisé (COCHENNEC et al., en préparation) et permettant d'établir, à l'échelle internationale, la notion de méthode de référence pour le diagnostic de maladies infectieuses. Il faut rappeler à cet égard que la majorité des maladies des animaux marins présentent un caractère pandémique résultant des très nombreux transferts qui sont effectués sans que soient appliquées des mesures efficaces de contrôles zoosanitaires.

Cependant, il faut noter que la méthodologie d'hybridation lymphocytaire relativement laborieuse ne conduit pas nécessairement à la sélection et au clonage d'un hybridome qui soit sécréteur d'anticorps de spécificité recherchée.

Cette situation est parfaitement bien illustrée par l'exemple du R.L.O. de Pecten maximus, pour laquelle un seul MAB spécifique d'un épitope pariétal a été obtenu, ce très faible rendement de fusion pouvant être expliqué par la présence d'une

molécule constitutive majeure (LE GALL, comm. pers.). Cet anticorps extrêmement spécifique qui ne réagit pas avec des rickettsies associées aux autres mollusques d'espèces voisines, s'avère en outre mal adapté pour une utilisation dans un dosage immunologique car, étant de type IgM, les couplages avec des enzymes marqueurs et l'adsorption sur les supports sont relativement délicats.

Ainsi, il est apparu opportun de développer la méthodologie de préparation de sondes nucléiques en pathologie des mollusques sur le modèle R.L.O de P.maximus, l'objectif premier étant d'estimer la faisabilité et dans un deuxième temps, de tester les applications de ces sondes.

Initialement, c'est à partir de microorganismes purifiés que l'A.D.N. a été extrait selon un protocole basé sur une double digestion lysozyme-protéinase K et inspiré de travaux réalisés sur des procaryotes de type Coxiella (VODKIN, 1986 ; SAMUEL, 1983), dont les structures pariétales sont similaires, d'un point de vue ultrastructural, à celles de R.L.O. de P. maximus.

Le rendement de l'extraction de l'A.D.N., estimé environ à 10 % s'est avéré tout à fait compatible avec les quantités d'A.D.N. nécessaires pour les différentes expérimentations projetées. En outre, ces rendements peuvent être régulièrement obtenus à partir d'une seule opération de purification de R.L.O..

Parallèlement, des essais ont été entrepris pour isoler l'A.D.N. des R.L.O. à partir de l'A.D.N. total extrait de tissus infectés, afin de vérifier si l'étape de purification du microorganisme pouvait être évitée. En effet, cette méthode

pourrait permettre d'isoler l'A.D.N. d'agents pathogènes difficiles à purifier tels que les Iridovirus de mollusques (ELSTON et WILKINSON, 1985). Malheureusement malgré les différents paramètres testés de centrifugation isopycnique en gradient de CsCl, il n'a pas été possible d'identifier une bande correspondant à l'A.D.N. de R.L.O.. D'autres expérimentations seront effectuées, par modification du protocole d'extraction, en traitant de plus grandes quantités d'A.D.N. total et en utilisant des gradients de CsCl de meilleure résolution, autour de la densité de l'A.D.N. de P.maximus.

Pour le clonage de fragments de restriction du génome de R.L.O., le système Bluescript (Stratagène) a été retenu pour l'extrême facilité de sélection des colonies recombinantes qu'il procure. En accord avec les résultats de HANAHAN (1983), le deuxième protocole de mise en compétence des bactéries testé, s'est traduit par un meilleur rendement de transformation. Ainsi, plus de 400 clones recombinants ont été isolés, parmi lesquels ceux qui ont été sommairement caractérisés correspondent à des inserts différents. Ce résultat mérite d'être comparé à celui de l'hybridation lymphocytaire dont les différentes étapes, notamment de criblage des hybridomes, ont été particulièrement lourdes à réaliser mais n'ont abouti qu'à l'obtention d'un seul hybridome cloné spécifique du R.L.O..

A ce stade du travail, il a été concevable de rechercher des séquences répétitives dans le génome du R.L.O. de P.maximus et ensuite de les cloner afin de disposer de sondes reconnaissant plusieurs copies par génome et donc à priori, plus performantes d'un point de vue sensibilité. Une telle stratégie a

été récemment appliquée avec succès pour un R.L.O. de glossines (mouche Tsé-Tsé) montrant par ailleurs que ces séquences étaient hautement conservées chez différentes souches de l'agent pathogène (WELBURN et GIBSON, 1988). Des essais préliminaires d'électrophorèse d'A.D.N. après digestion par différentes enzymes n'ont pas permis de détecter de telles séquences dans les gels colorés au bromure d'éthidium. Ce résultat est probablement imputable à un manque de sensibilité de détection, qu'il n'a pas été possible de résoudre par un marquage préalable de l'ADN avec du ^{32}P , le laboratoire n'étant pas encore habilité à utiliser des radioéléments.

Il a donc été choisi de poursuivre cette étude avec un plasmide, le pKSRE 34, retenu de façon relativement arbitraire, bien que ce choix ait été aussi motivé par la possibilité de disposer de sondes d'une gamme de tailles différentes, préparées par simple digestion par Hind III.

La majorité des laboratoires de biologie marine ne sont pas habilités à manipuler des produits marqués, en particulier ceux impliqués dans les contrôles zoosanitaires, et de ce fait susceptibles de pratiquer le diagnostic de R.L.O. à l'aide d'une sonde A.D.N.. C'est pourquoi, seules des sondes froides ont été préparées, en retenant les principes de marquage direct et indirect. Dans le premier cas, il s'agit d'un couplage A.D.N. peroxydase, ce système étant réputé pour sa sensibilité et pour la facilité d'inhibition d'activité endogène dans les échantillons par traitement préalable au méthanol-peroxyde. Sur la base des indications fournies par le fabricant, la densité de molécules d'enzymes fixées sur l'A.D.N. est de l'ordre de 1/30

nucléotides, le couplage étant pratiqué à l'aide de glutaraldehyde. Il faut noter que ce procédé est susceptible de générer des polymères d'enzymes de nature indéterminée.

Le choix d'une méthode indirecte s'est porté sur le système de sulfonation de l'A.D.N., préférentiellement à un procédé de biotinylation qui avait été testés pour des anticorps monoclonaux et avait conduit à des bruits de fonds non spécifiques très élevés (Mialhe, comm. pers.). Le rendement de la sulfonation des bases cytosines étant d'environ 15 %, on peut considérer qu'une base sur 30 environ est modifiée.

La sensibilité de ces sondes froides vis-à-vis d'A.D.N. purifié de R.L.O. s'est avéré similaire, estimée à 100 ng (sonde de 4500 bp) soit environ 10^{-19} moles ou 50 000 molécules d'A.D.N. génomique, si l'on considère que celui-ci est du même ordre de grandeur ($1,2 \cdot 10^9$ Da) que celui des différents types de rickettsies (MYERS et WISSEMAN, 1981).

Ces résultats, acquis avec une sonde froide de 4500 pb correspondant à 0.25 % du génome, sont comparables à ceux publiés pour d'autres procaryotes, les sensibilités étant généralement comprises entre 10^3 et 10^6 microorganismes, et dépendant essentiellement de la taille et de la nature de la sonde, les plus performantes correspondant à des séquences répétitives (RAZIN et al., 1987).

L'application de ces sondes froides au diagnostic du R.L.O. a été alors envisagée, dans un premier temps à l'aide de suspensions de procaryotes purifiés. Après dépôt des microorganismes sur membrane de nitrocellulose et digestion par protéinase K, il s'est avéré que des quantités 500 fois

supérieures à la limite de détection de l'A.D.N. purifié n'ont pu être mises en évidence à l'aide des deux types de sondes froides de 4500 pb. Cette perte de sensibilité, signalée dans de nombreuses publications, révèle l'importance du traitement de l'échantillon et des conditions d'hybridation (RAZIN et al., 1987). Des essais sont en cours pour tester ces paramètres, notamment en vérifiant l'adsorption des R.L.O. sur la membrane à l'aide de M.A.B. et en incluant une digestion par le lysosyme.

Dans l'optique d'accroître la sensibilité de détection dans des échantillons biologiques en appliquant la technique de "Polymerase Chain Reaction" (P.C.R.), les différents fragments de restriction de l'insert de pKSRE 34 ont été partiellement séquencés (environ 400 bases) et une paire d'amorces a été synthétisée. A court terme, cette méthodologie, difficile à mettre en oeuvre à des fins de diagnostic clinique, pourrait être particulièrement utile pour étudier in vitro le développement du R.L.O. dans des primocultures de cellules branchiales et les interactions avec les cellules immunitaires de l'hôte.

En conclusion, il apparait que ce travail sur la préparation de sondes d'A.D.N., original à l'échelle de la pathologie des mollusques, dépasse le domaine d'application du diagnostic, et concerne celui de l'épidémiologie et de la taxonomie.

Associées à une maîtrise de techniques complémentaires telles que l'hybridation in situ (MEDDENS et al., 1988), ces sondes devraient permettre de préciser les cycles de

développement et la position taxonomique des R.L.O. et de les comparer avec les rickettsies d'autres Invertébrés, notamment d'arthropodes (HOLT, 1984) qui interviennent fréquemment comme vecteurs pour des hôtes Vertébrés. Cette approche taxonomique est particulièrement intéressante pour appréhender l'origine et l'évolution des rickettsies, compte tenu du caractère archaïque des mollusques et de la variété de leurs associations avec des procaryotes (LE PENNEC et al., 1988).

Depuis plusieurs années, des mortalités de coquilles Saint-Jacques, Pecten maximus, ont été notées dans la baie de Saint-Brieuc. Une étude anatomo-pathologique (LE GALL et al., 1988) a mis en évidence une infection procaryotique des cellules endothéliales de branchies. Des colonies intracytoplasmiques d'organismes unicellulaires ont été observées en microscopie optique et électronique (planche 1, Fig.a et b). Leur taille est approximativement de 2,5 sur 0,5 μm . La présence de ces organismes dans les cellules hôtes conduit à une destruction complète du cytoplasme où ne restent que des vacuoles et des fragments subcellulaires (planche 2, Fig.a). Ces procaryotes présentent par ailleurs des figures de division par fission binaire (planche 2, Fig.b). Ils possèdent les deux types d'acides nucléiques (A.D.N. et A.R.N.) ainsi qu'une paroi de type bactérien (planche 2, Fig.b) et l'absence de cycle de développement complexe suggère qu'ils appartiennent à l'ordre des rickettsiales (HOLT, 1984). Leur développement intravacuolaire obligatoire les apparenterait aux genres Wolbachia d'Insectes ou Coxiella de Vertébrés.

L'étude épidémiologique sur deux années permet de formuler un certain nombre de remarques :

- Les populations de coquilles présentent différents degrés d'infection et de prévalence suivant la localisation du gisement ; les gisements les plus infectés sont ceux de Saint-Brieuc, Grandcamp et Dieppe.
- Le mode de transmission de l'agent infectieux est probablement horizontal : Les larves issues de géniteurs infectés, élevées en zones non contaminées, restent saines. Les mêmes larves, soit élevées dans la baie de Saint-Brieuc,

soit infectées expérimentalement par balnéation sont fortement contaminées.

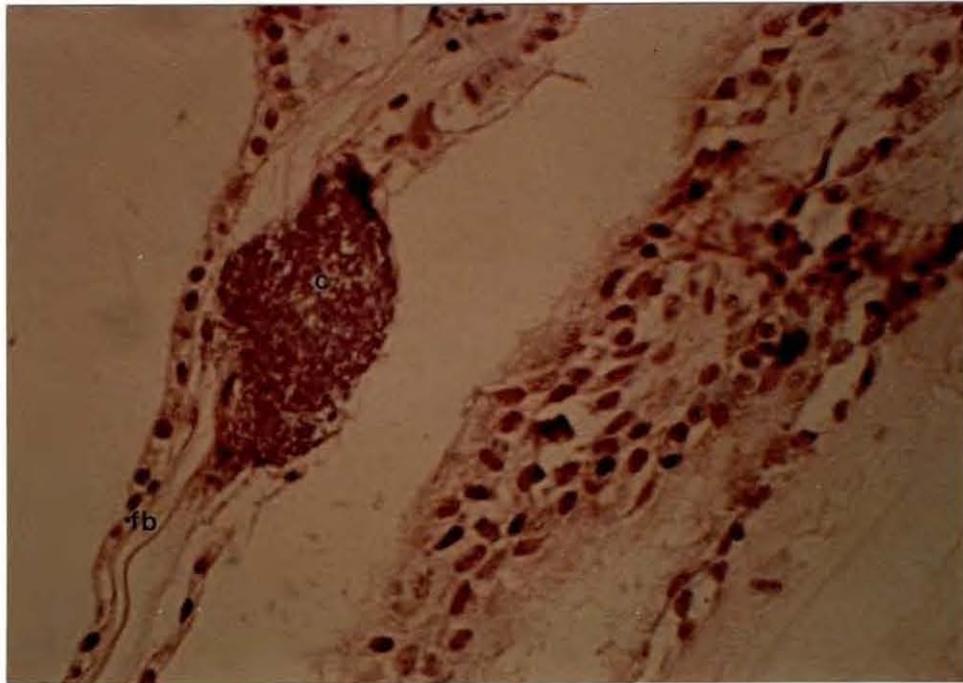
- Les pourcentages d'infection et de prévalence ont augmenté entre l'hiver 1987-88 et 1988-89 pour les populations suivies.

De nombreux autres cas d'infections rickettsiennes des mollusques bivalves marins sont décrits dans la littérature (tableau n°7). Mais certaines références associent des phénomènes de mortalités avec la présence d'organismes de type rickettsien, sans réellement démontrer un lien causal entre le microorganisme et ces mortalités.

ESPECES	ORGANE	SOURCE
<u>Mytilus edulis</u>		- YEVICH et BARSZCS 1980
<u>Mytilus californianus</u>		- YEVICH et BARSZCZ 1980
<u>Crassostrea virginica</u>	Glande digestive	- HARSHBARGER <u>et al.</u> 1977 - OTTO <u>et al.</u> 1977 - MEYERS 1981
<u>Crassostrea gigas</u>	Glande digestive	- COMPS <u>et al.</u> 1977 - COMPS 1980, 1983
<u>Crassostrea angulata</u>	Glande digestive	- COMPS et DELTREIL 1979
<u>Ostrea edulis</u>	Glande digestive	- COMPS <u>et al.</u> 1979a - COMPS 1980, 1983
<u>Ostrea puelchana</u>	Glande digestive	- LE GALL Com. pers.
<u>Pecten maximus</u>	Branchies	- LE GALL <u>et al.</u> 1988
<u>Placopecten magellanicus</u>	Branchies	- MARTI 1982 - GULKA <u>et al.</u> 1983
<u>Argopecten irradians</u>	Rein	- MORRISON et SHUM 1983
<u>Patinopecten yessoensis</u>	Branchies	- ELSTON 1986a
<u>Chlamys varia</u>	Branchies	- LE GALL Com. pers.
<u>Chlamys opercularis</u>	Branchies	- LE GALL <u>et al.</u> 1988
<u>Chlamys islandica</u>	Branchies	- LE GALL Com. pers.
<u>Macoma baltica</u>		- HARSHBARGER <u>et al.</u> 1977
<u>Tagellus sp.</u>		- HARSHBARGER <u>et al.</u> 1977
<u>Tellina tenuis</u>	Glande digestive	- BUCHANAN 1973, 1978, 1979
<u>Donax trunculus</u>	Glande digestive	- COMPS et RAIMBAULT 1978
<u>Ruditapes decussatus</u>	Glande digestive	- MIALHE <u>et al.</u> 1986
<u>Siliqua patula</u>	Branchies	- ELSTON et PEACOCK 1984 - ELSTON 1986b - ELSTON <u>et al.</u> 1986
<u>Tapes japonica</u>	Branchies	- ELSTON 1986a
<u>Mercenaria mercenaria</u>	Glande digestive	- OTTO <u>et al.</u> 1975
<u>Callista chione</u>	Branchies	- LE GALL Com. pers. - HARSHBARGER <u>et al.</u> 1977
<u>Mya arenaria</u>	Glande digestive	- OTTO <u>et al.</u> 1979

Tableau n° 7 : RECAPITULATIF DES CAS DE RICKETTSIOSES

fig:a



c: colonie intracytoplasmique
fb: filament branchial

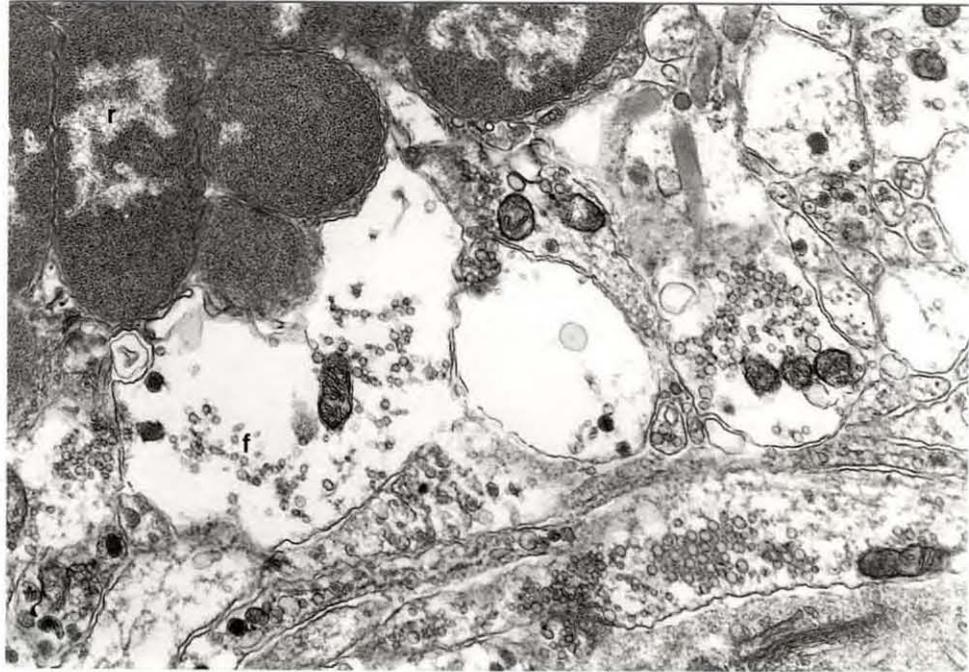
fig:b



r: rickettsies
N: noyau de la cellule hôte

Colonies intracytoplasmique de R.L.O observées en microscopie
optique (fig:a; x580) et électronique (fig:b; x 8400)

fig a

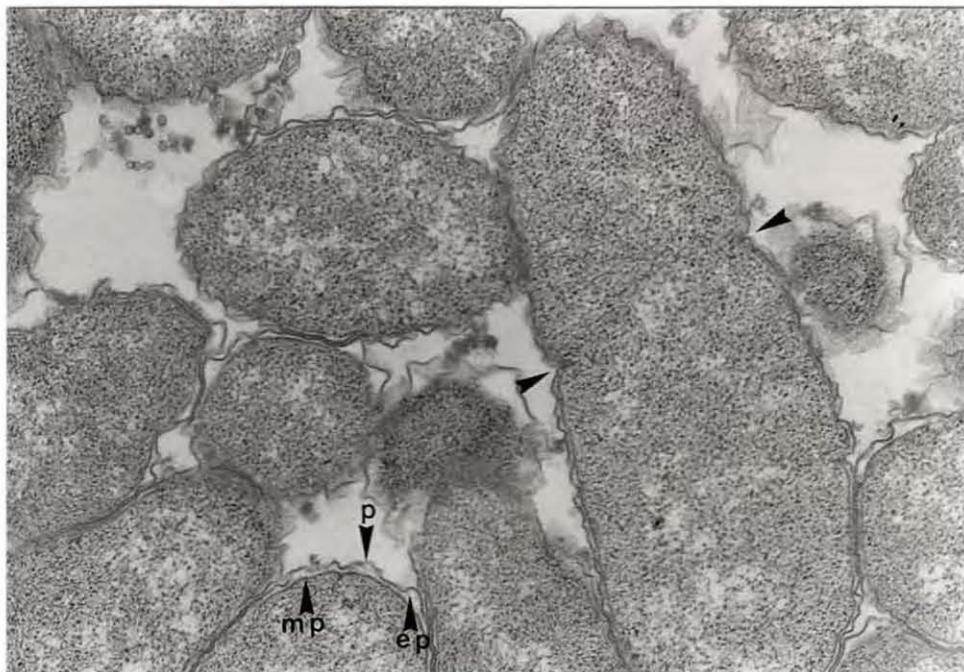


r : rickettsies

f : fragments subcellulaires

Destruction du cytoplasme des cellules hôtes (x 10000)

fig b



mp : membrane plasmique

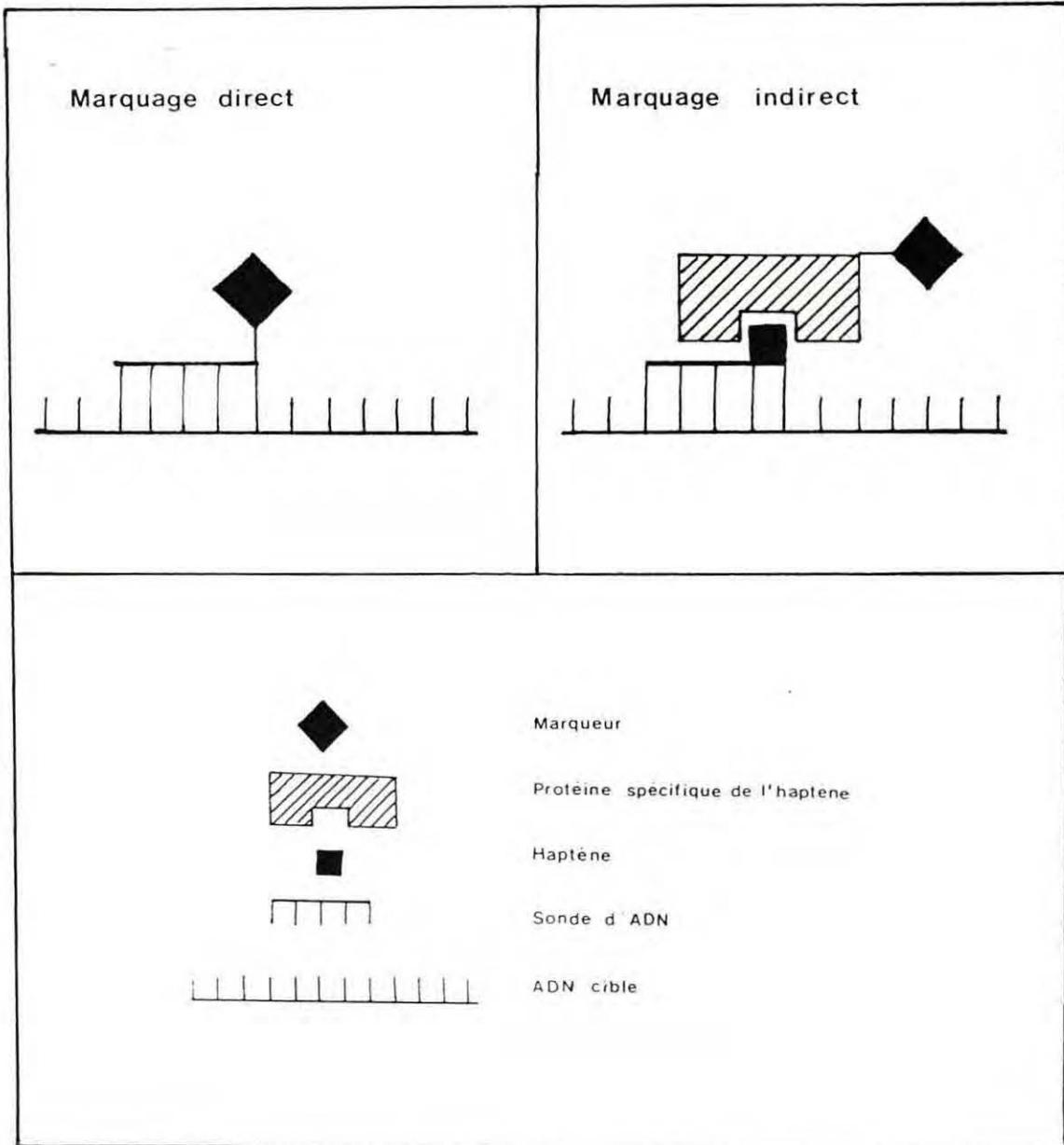
ep : espace periplasmique

p : paroi

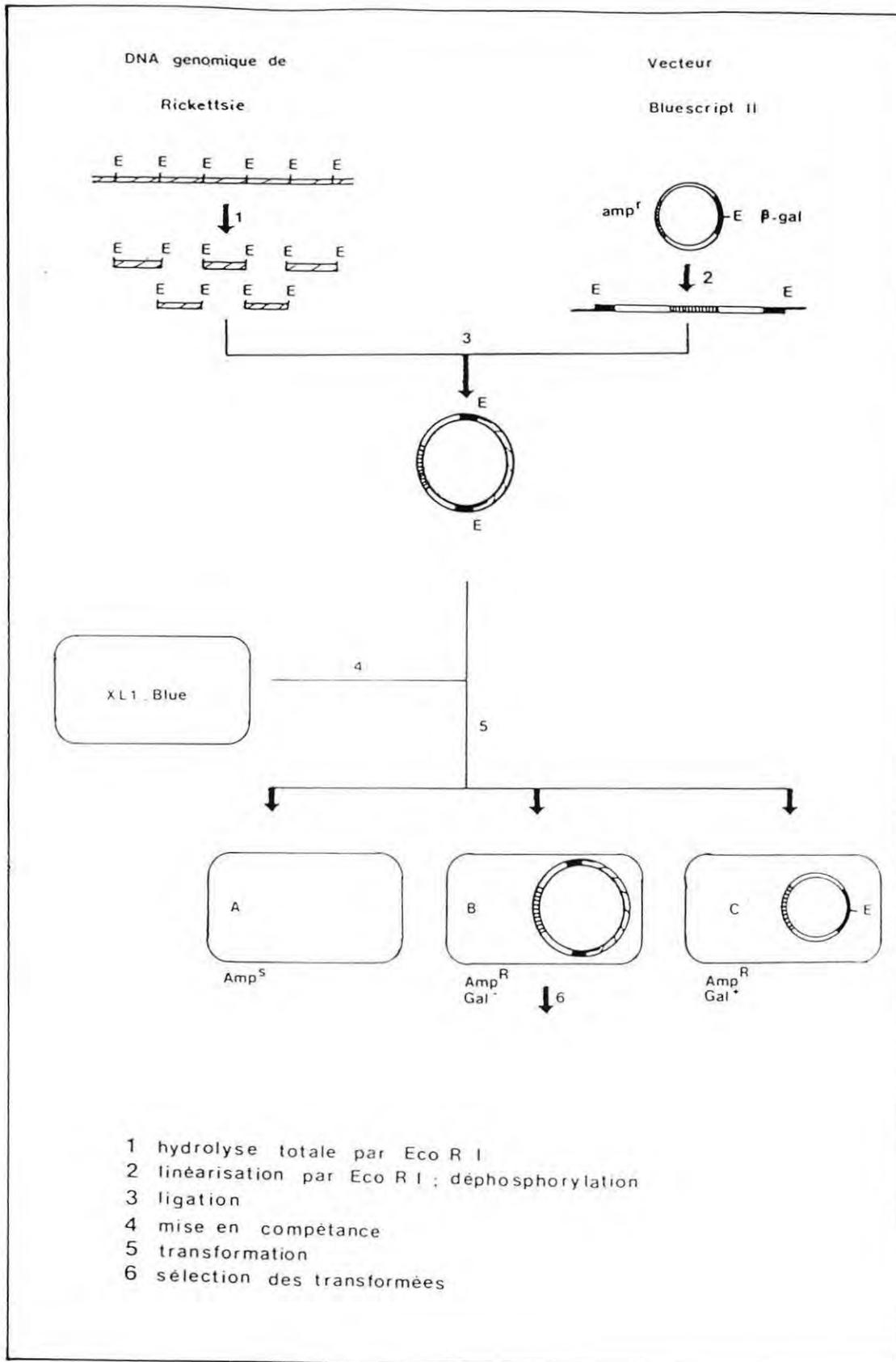
Cellule en phase de division par scissiparité (x 40000)

Fig. a

Fig. b

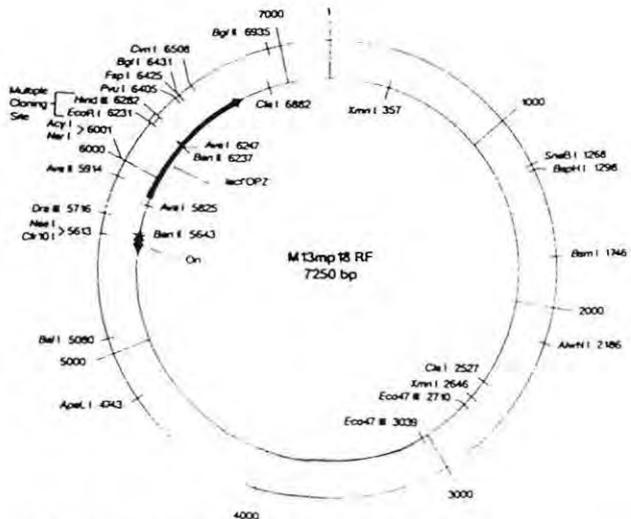
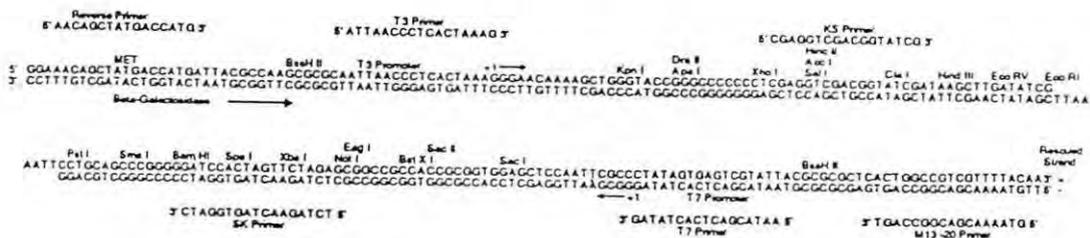
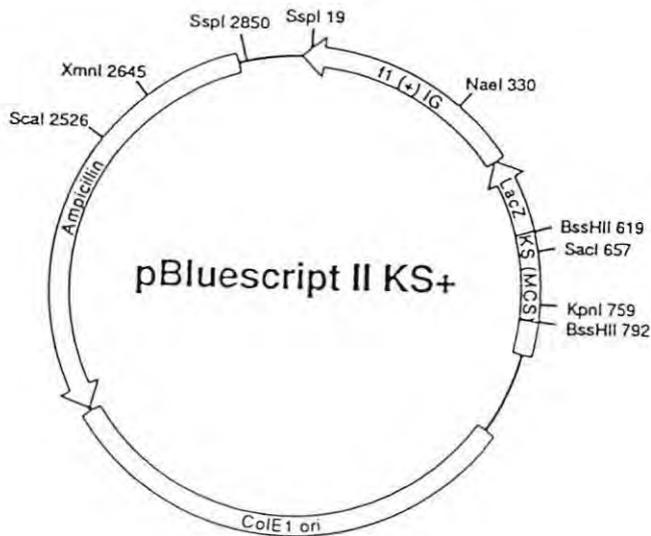


DEUX STRATEGIES DE MARQUAGE DES SONDAS D'ADN

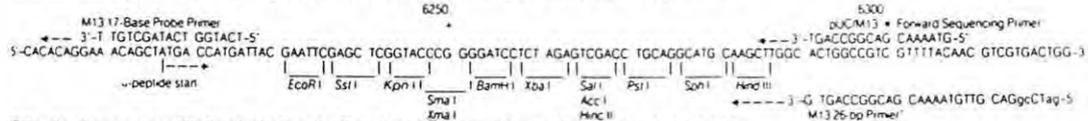


- 1 hydrolyse totale par Eco R I
- 2 linéarisation par Eco R I ; déphosphorylation
- 3 ligation
- 4 mise en compétence
- 5 transformation
- 6 sélection des transformées

CLONAGE DE L'ADN GENOMIQUE DE RICKETTSIES
DE PECTEN MAXIMUS



Site de clonage multiple et région de fixation du primer pour M13mp18: 6201-6320



Site de clonage multiple et région de fixation du primer pour M13mp19: 6201-6320

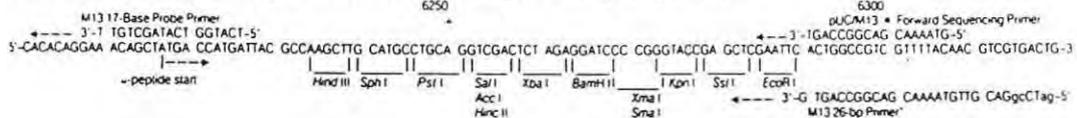


Fig. a

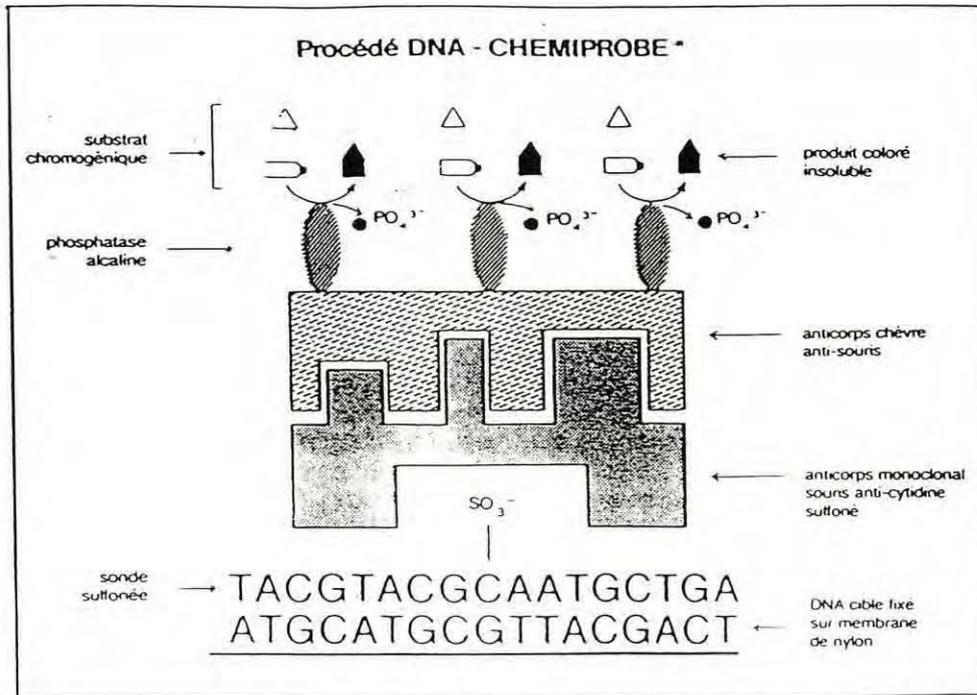
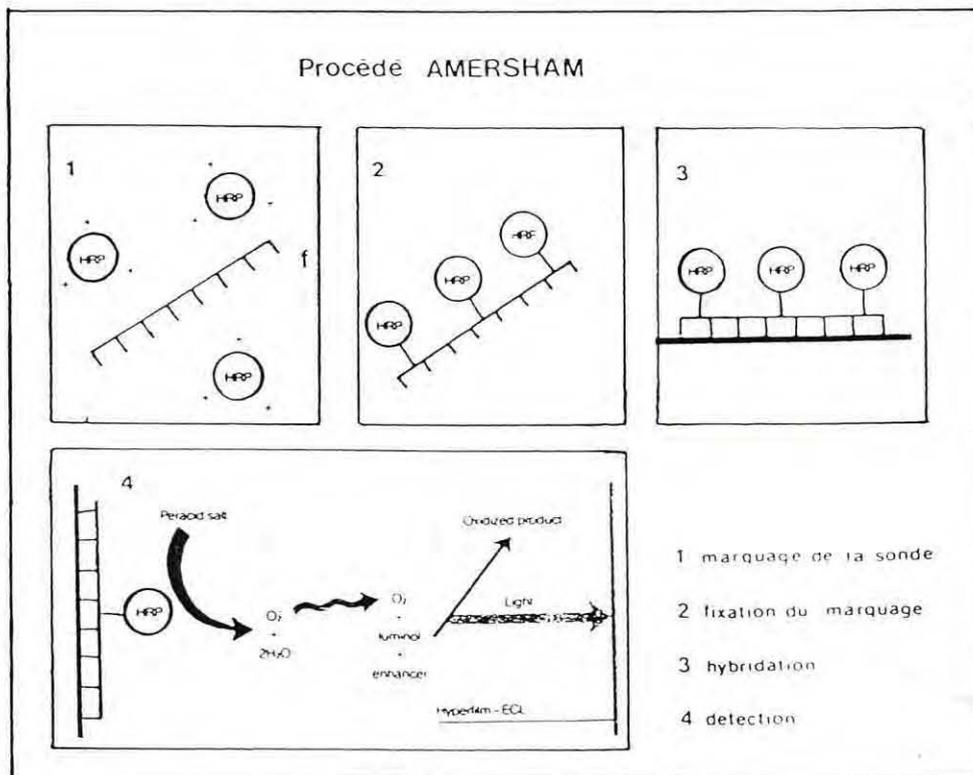
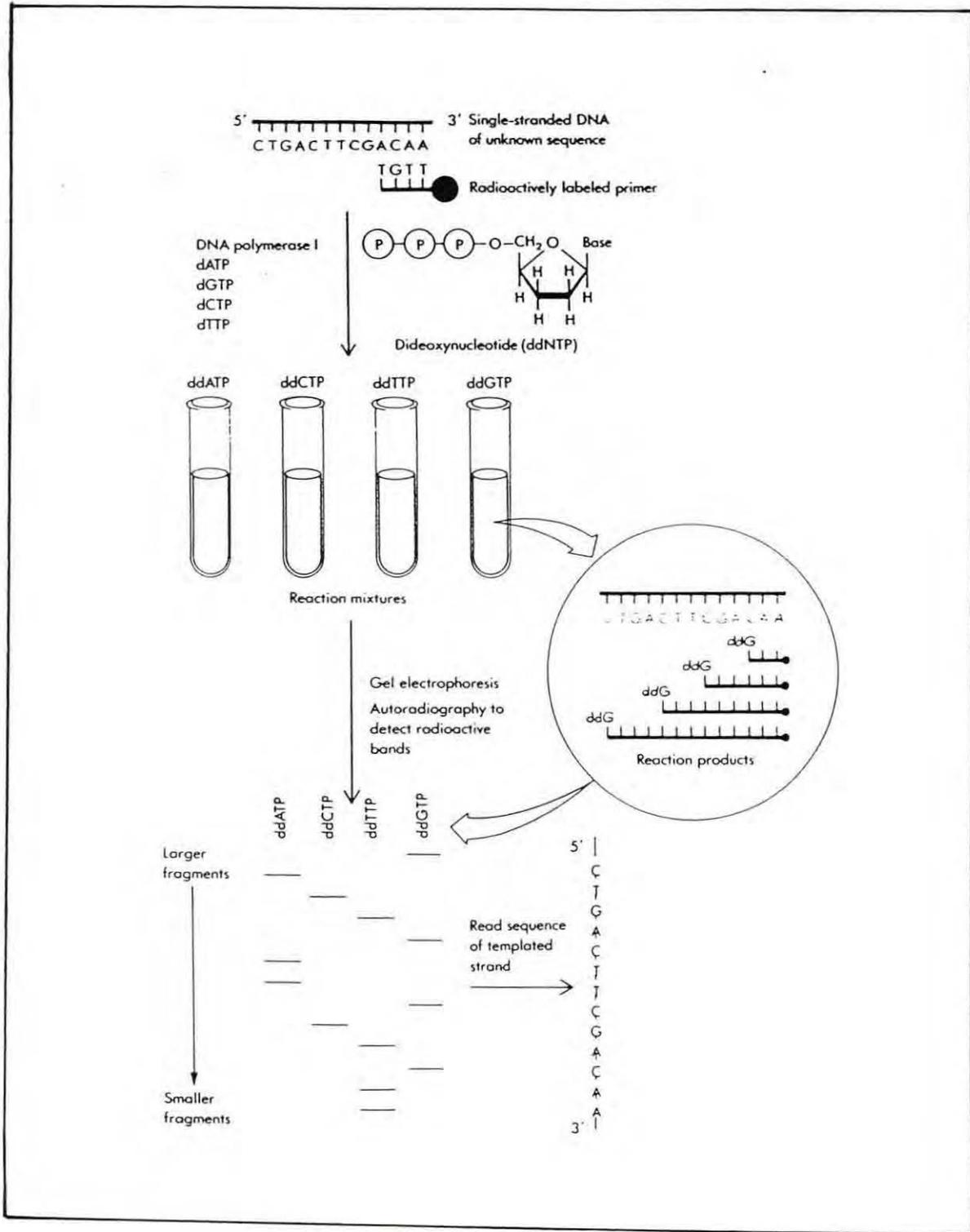


Fig. b

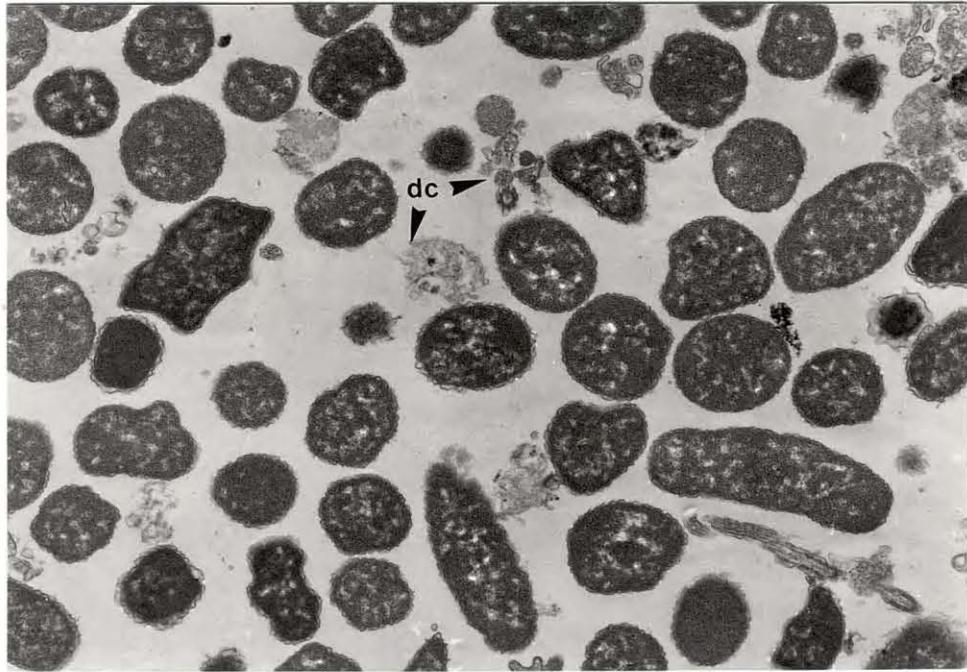


PRINCIPE DES KITS DE MARQUAGE NON RADIOACTIF UTILISES



SEQUENCAGE SELON LA TECHNIQUE DE SANGER : Un didéoxynucléotide incorporé dans le brin d'ADN bloque l'élongation de la chaîne.

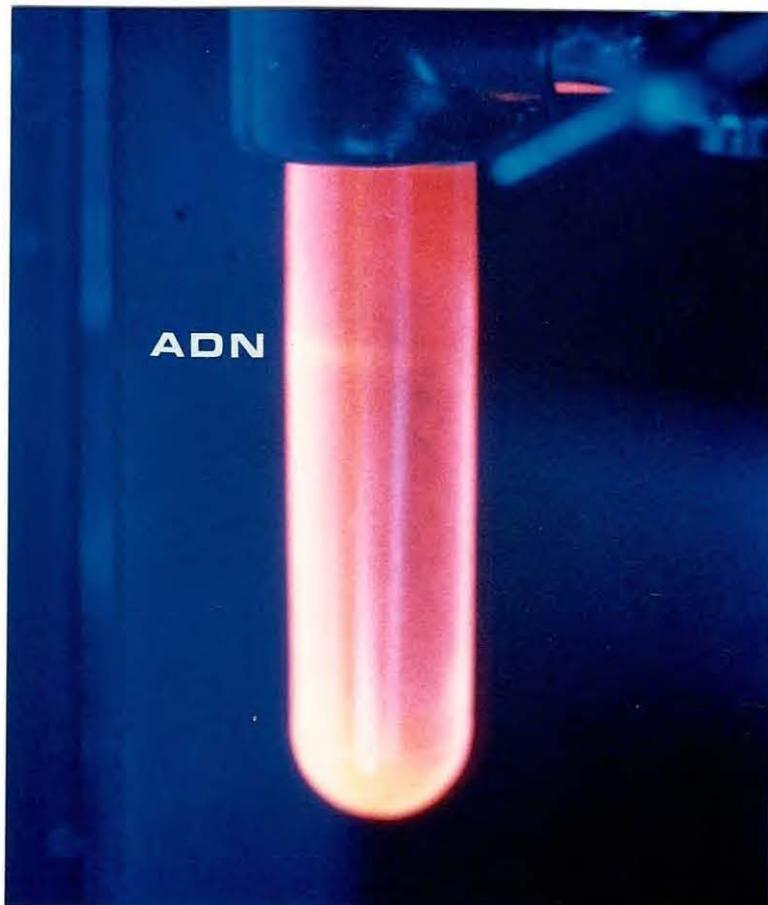
fig.a



dc: débris cellulaires

R.L.O. purifiées de *Pecten maximus* (x10600)

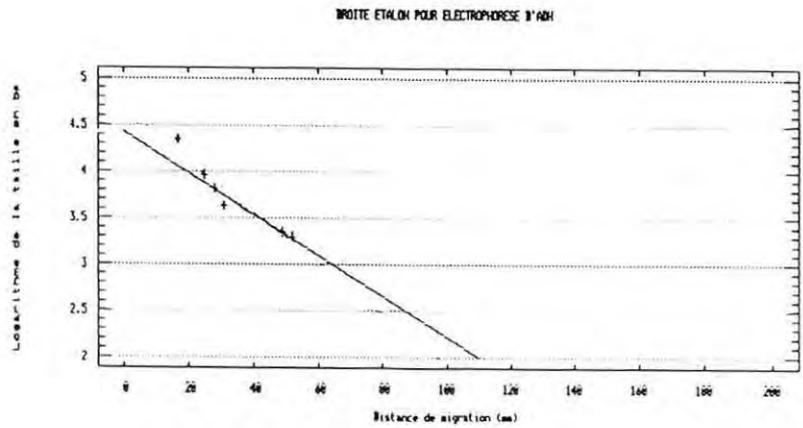
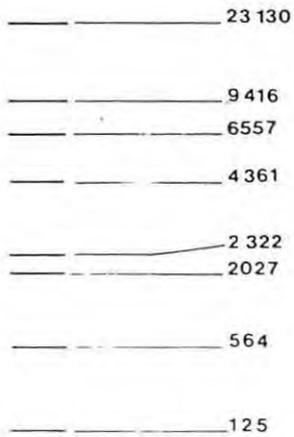
fig.b



A.D.N. de R.L.O. purifié par centrifugation isopycnique sur gradient de CsCl

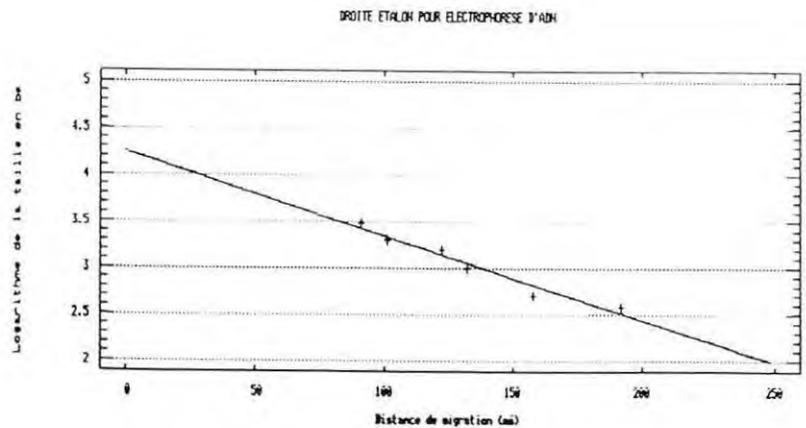
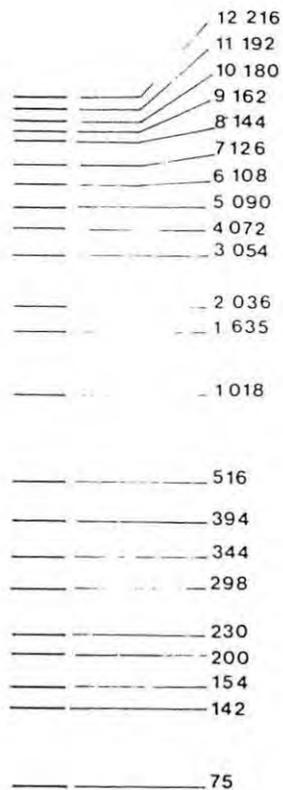
A. Caractéristiques du marqueur λ (Hind III)

Courbe étalon pour carte de restriction du pKSRE 34



B. Caractéristiques du marqueur 1Kb (BRL)

Courbe étalon pour contrôle des fragments B, C, D, E

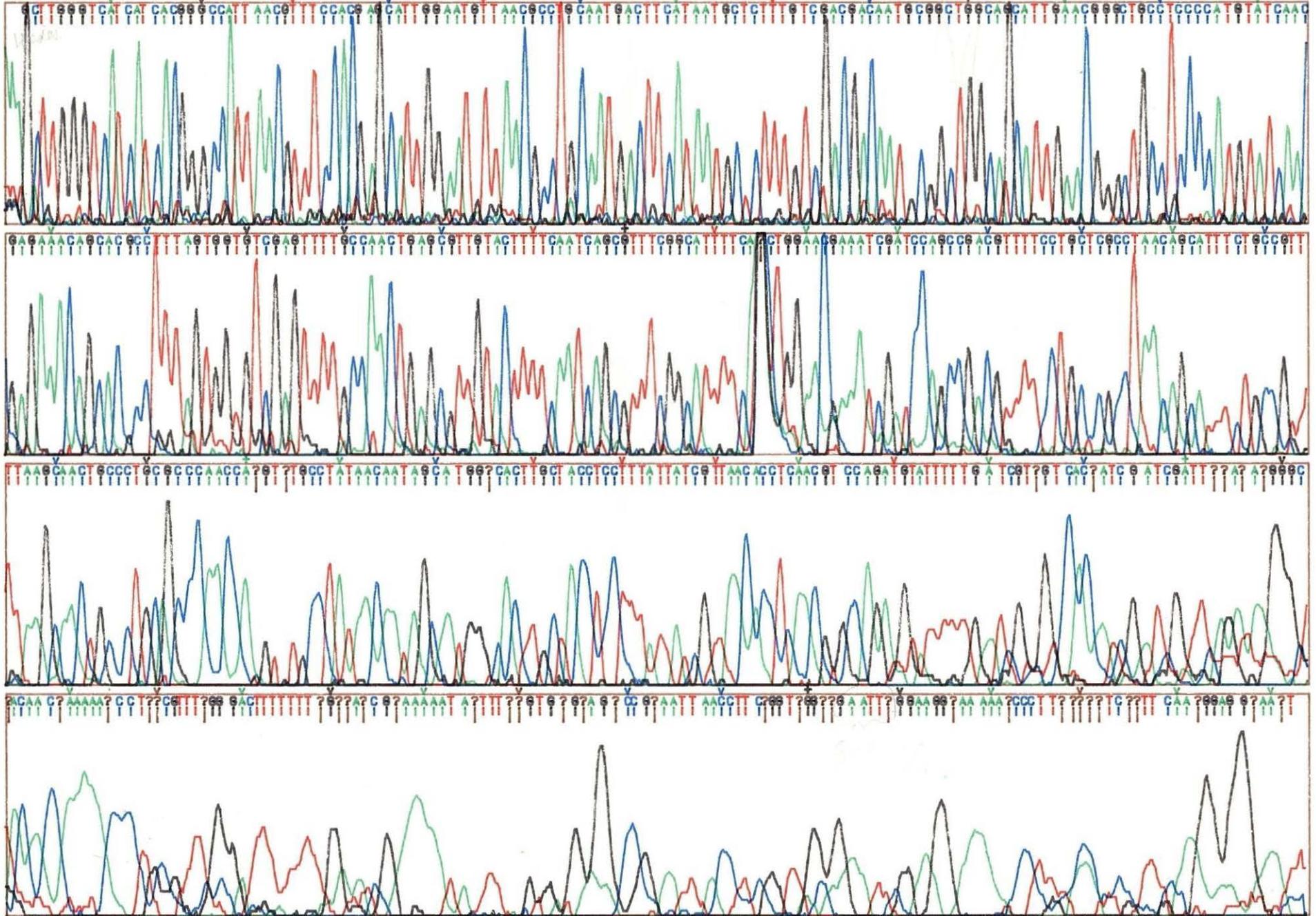


E11.DAT

Ch: 110

Comments:

ABI 370A Ver 1.30

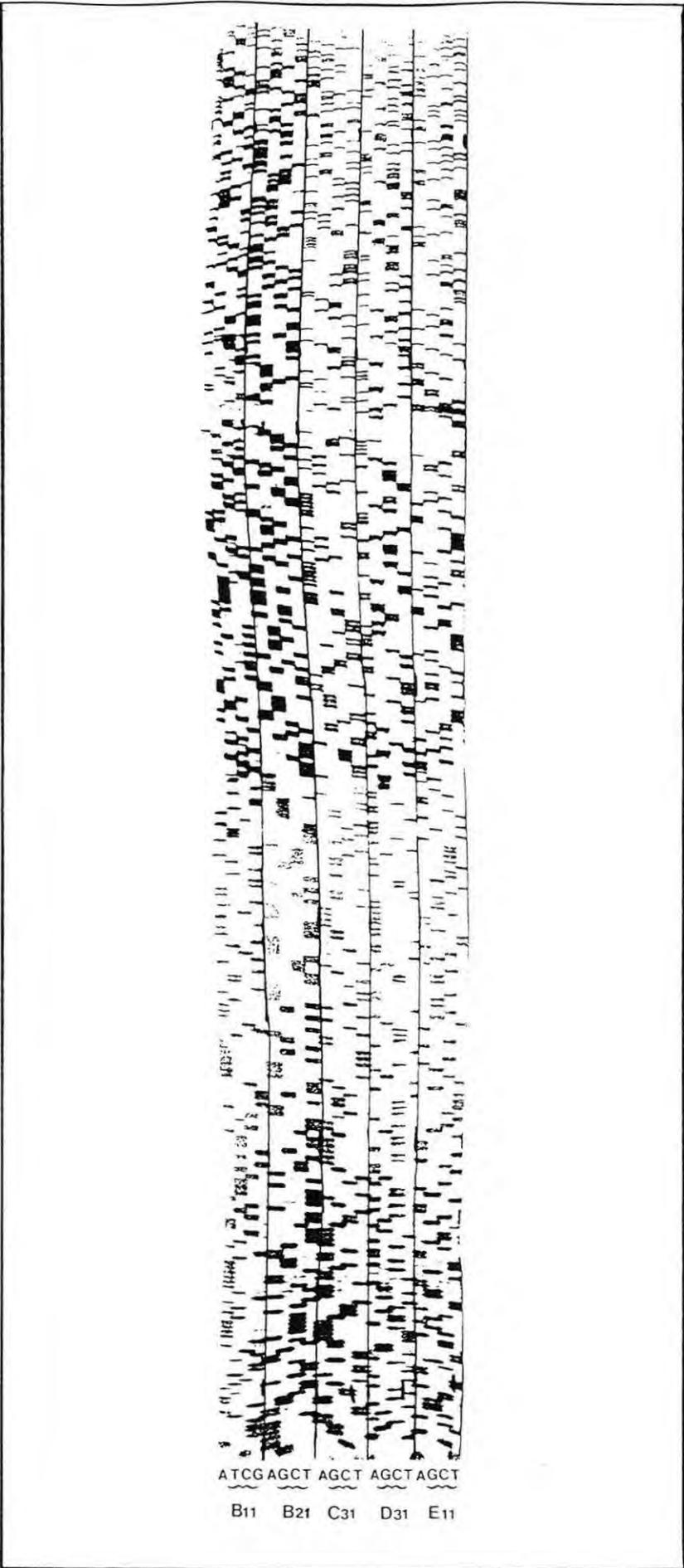


Seq: 123

Primer: -21M13

0 to 6000 Base 1: 0

25 August 1989



SEQUENCAGE PAR LE KIT SEQUENASE

AMBROSIO, R.E., E.S. VISSER and E.S. POSNETT, 1988. DNA probes in the detection of parasitic infections of animals. South African Journal of Science, 84 : 162-164.

BARKER, D.C., L.J. GIBSON, W.P.K. KENNEDY, A.A.A.A. NASSER and R.H. WILLIAMS, 1986. The potential of using recombinant DNA species-specific probes for the identification of tropical Leishmania. Parasitology, 91 : 139-174.

BUCHANAN, J.S., 1978. Cytological studies on a new species of rickettsia found in association with a phage in the digestive gland of the marine bivalve mollusc Tellina tenuis (Da Costa). J. Fish. Dis., 1 : 27-43.

BUCHANAN, J.S., 1979. Ultrastructural studies of a Rickettsia-like organism (with phage) from the digestive gland of the marine bivalve, Tellina tenuis (Da Costa). Haliotis, 8 : 309-316.

CAVANAGH, D., 1989. Nucléic acid probes in the diagnostic and study of Avian nononcogenic viral disease. Prog. Vet. Microbiol. Immunol., 5 : 1-15.

COCHENNEC, N., B. PANATIER, V. BOULO, E. MIALHE, H. ROGIER, H. GRIZEL and F. PAOLUCCI. Use of monoclonal antibody in a direct sandwich immunoassay for the detection of Bonamia ostreae (Ascetospora) in hemolymph samples of flat oyster Ostrea edulis, soumis.

COMPS, M., 1980. Infections rickettsiennes chez les Mollusques bivalves marins. Int. Counc. Explor. Sea. Special Meeting on Diseases of Commercially Important Marine Fish and Shellfish, Copenhagen, 1-3 Oct. 1980, Cont. n°40.

COMPS, M., 1983. Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. Thèse Doct. Univ. Sci. et Techn. du Languedoc, Montpellier. pp 196 + ann.

COMPS, M. et R. RAIMBAULT, 1978. Infection rickettsienne de la glande digestive de Donax trunculus L. Science et Pêche, 281 : 11-12.

COMPS, M. et J.P. DELTREIL, 1979. Un microorganisme de type rickettsien chez l'huître portugaise Crassostrea angulata Lmk. C.R. Acad. Sci. Paris, 289 (D) : 169-171.

COMPS, M., J.R. BONAMI, C.VAGO and A.CAMPILLO, 1976. Une virose de l'huître portugaise (Crassostrea angulata (Lmk)). C.R. Acad. Sci. Paris, 282 : 1991-1993.

COMPS, M., J.R. BONAMI et C. VAGO, 1977. Mise en évidence d'une infection rickettsienne chez l'huître Crassostrea gigas Th. R. Acad. Sci. Paris, 285 (D) : 427-429.

COMPS, M., G. TIGE, J.L. DUTHOIT et H.GRIZEL, 1979a. Microorganismes de type rickettsien chez les huîtres Crassostrea gigas Th. et Ostrea edulis L., *Haliotis*, 8 : 317-321.

DALLAS, P.B., J.L. FLANAGAN, B.N. NIGHTINGALE and B.J. MORRIS, 1989. Polymerase chain reaction for fast, Nonradioactive detection of High-and low-risk Plasmodium types in Routine Cervical Specimens and Biopsies. *Journal of medical virology*, 27 : 105-111.

DONAVAN, R.M., C.E. BUSH, W.R. PETERSON, L.H. PARKER, S.H. COHEN, G.W. JORDAN, K.M. VANDEN BRINK and E.GOLDSTEIN, 1987. Comparison of non-radioactive DNA hybridization probes to detect human immunodeficiency virus nucleic acid. *Molecular and Cellular probes*, 1 : 359-366.

DUTILH, B., C. BEBEAR, D.TAYLOR-ROBINSON and P.A.D. GRIMONT, 1988. Detection of Chlamydia trachomatis by in situ hybridization with sulfonated total DNA. *Am. Inst. Pasteur/Microbiol.*, 139 : 115-128.

ELSTON, R.A., 1986a. Occurrence of branchial rickettsiales-like infections in two bivalve molluscs, Tapes japonica and Patinopecten yessoensis, with comments on their significance. *J. Fish. Dis.* 9 : 69-71.

ELSTON, R.A., 1986b. Occurrence of branchial rickettsial-like infection in the pacific razor clam Siliqua patula. *J. Inv. Pathol.*, 44 : 84-96.

ELSTON, R.A. and M.G. PEACOCK, 1984. A Rickettsiales-like infection in the pacific razor clam Siliqua patula. *J. Inv. Pathol*, 44 : 84-96.

ELSTON, R.A. and M.T. WILKINSON, 1985. Parasitology, management and diagnosis of oyster velar disease, (OVVD). *Aquaculture*, 48 : 89-210.

GEARY, S.J., 1987. Development of a biotynylated probe for the rapid detection of Mycoplasma gallisepticum. *Isr. J. Med. Sci.*, 23 : 747-751.

GOPO, J.M., R. MELIS, E. FILIPSKA, R. MENEVERI and J. FILIPSKI, 1988. Development of a Salmonella-specific biotinylated DNA probe for rapid routine identification of Salmonella. *Molecular and Cellular Probes*, 2 : 271-279.

GULKA, G., P.W. CHANG and K.A. MARTI, 1983. Procaryotic infection associated with a mass mortality of the sea scallop, Placopecten magellanicus. *J. Fish. Dis.*, 6 : 355-364

HANAHAN, D., 1983. Techniques for transformation of E.coli. *Methods in Enzymology*, Chap. VI. Ed. RAY WU.

HARSHBARGER, J.C., S.C. CHANG and S.V. OTTO, 1977. Chlamydia (with phages), mycoplasmas and rickettsiae in Cheasepeacke Bay Bivalves. *Sciences*, 196 : 666-668.

HASKIN, H.H., L.A. STAUBER and J.A. MACKIN, 1966. Minchinia nelsoni n.s.p. (Haplosporida, Haplosporidiidae) : causative agent of the Delaware Bay oyster epizootic. Science 153 : 1414-1416.

HAVEN, D.J., W.J. HAGIS and P.C. KENDALL, 1978. The oyster industrie of Virginia : its status, problems and promise. Special report n° 168 - VIMS.

HOLT, J.G., 1984. Bergey's manuel systematic bacteriology, Vol.I, p.684.

HOPP, H.E., L. GIAVEDONI, M.A. MANDEL, A. ARESE, B. ORMAN, F.B. ALMONACID, H.N. TORRES and A.N. MENTA BERRY, 1988. Biotinylated nucleic acid hybridization probes for potato virus detection. Arch. Virol., 103 : 231-241.

HYMAN, H.C., D. YOGEV and S. RAZIN, 1987. DNA probes for detection and identification of Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium. Journal of Clinical Microbiology, 25 : 726-728.

KAN-NO, H., M.SASAKI, Y.SAKURAI, T.WATANABE and K.SIZUKI, 1965. Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay. General aspects of the mas mortality of the oyster in Matsushima Bay and its environmental conditions. Bull. Tohoku, Reg. Fish. Res..

LE BACQ, P., D. SQUALLI, M. DUCHENNE, P. POULETTY and M.JOANNES, 1988. A new sensitive non isotopic method using sulfonated probes to detect picogram quantities of specific DNA sequences on blot hybridization. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 15 : 255-266.

LE GALL, G., D.CHAGOT, E.MIALHE, H.GRIZEL, 1988. Branchial rickettsial-like infection associated with a mass mortality of sea scallop Pecten maximus. Dis. Aquat. Org., 4 : 229-232.

LE PENNEC, M., M. DIOURI and A. HERRY, 1988. Endocytosis and lysis of bacteria in gill epithelium of Bathylmodiolus thermophilus, Thyasina flesuosa and Lucinella divaricata (bivalves molluscs). J. Shellfish, Res., 7 : 483-489.

LURAIN, N.S., K.D. THOMPSON and S.K. FARRAND, 1986. Rapid detection of cytomegalovirus in clinical specimens by using biotinylated DNA probes and analysis of cross reactivity with Herpes Simplex virus. Journal of Clinical Microbiology, 24 : 724-730.

MANIATIS, T., E.F. FRITSCH and J. SAM BROOCK, 1986. Molecular cloning ed° cold Spring harbor, 5ème Ed°.

MARTEIL, L., 1969. La maladie des branchies des huîtres portugaises des côtes françaises de l'Atlantique. Données générales sur la maladie des branchies. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 33 : 145-150.

MARTI, K.A., 1982. Population age structure and mortality determination for the Sea scallop Placopecten magellanicus. M.S. Thesis Univ. of Rhodes Island, Graduate School of Oceanography. 6 : 355-364.

MATTHEWS, J.A. and L.J. KRICKA, 1988. Analytical strategies for the use of D.N.A. probes. *Analytic Biochemistry*, 169 : 1-25.

MEDDENS, M.J.M., W.G.V. QUINT, H. VAN DER WILLIGEN, J.T.H. WAGENVOORT, W.C.V. DIJK, J. LINDEMAN and P. HERBRINK, 1988. Detection of Chlamydia trachomatis in cultures and urogenital smears by in situ DNA hybridization using a biotinylated DNA probe. *Molecular and Cellular probes*, 2 : 261-268.

MEURIOT, E. and H.GRIZEL, 1984. Note sur l'impact économique des maladies de l'huître plate en Bretagne. Rapport IFREMER.

MIALHE, E., E. BACHERE, C. LE BEC et H. GRIZEL, 1985. Isolement et purification de Marteilia (Protozoa : Ascetospora) parasites de bivalves marins. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 4 : 137-142.

MIALHE, E., D. CHAGOT, V. BOULO, F.RUANO et H.GRIZEL, 1986. Infection rickettsienne chez Ruditapes decussatus (Bivalvia). *Proc. 2nd inter. colloq. Pathol. Marine aquac. Porto. sept. 1986.* : 89.

MIALHE, E., E.BACHERE, D.CHAGOT, H.GRIZEL, 1988. Isolation and purification of the protozoan Bonamia ostreae (Pichot et al., 1980), a parasite affecting the flat oyster Ostrea edulis. *L. Aquaculture*, 71 : 292-299.

MORRISON, C. and G.SHUM, 1983. Rickettsia in the kidney of the bay scallop, Argopecten irradians (Lmk.). *J. Fish. Dis.*, 6 : 537-541.

MEYERS, T.R., 1981. Endemic disease of cultured shellfish of Long Island, New-York : adult and juvenil American oyster (Crassostrea virginica) and hard clams (Mercenaria mercenaria). *Aquaculture*, 22 : 305-330.

MYERS, W.F. and C.L. WISSEMAN, 1981. Rickettsiae and rickettsial disease. Ed. by W. BURGDORFER and R.L. ANACKER ACADEMIC PRESS.

OTTO, S.V., J.C. HARSHBARGER and S.C. CHANG, 1979. Status of selected unicellular euryaryote pathogens, prevalence and histopathology of inclusions containing obligate procaryote parasites in commercial bivalve molluscs from Maryland estuaries. *Haliotis*, 8 : 285-295.

PICHOT, Y., M.COMPS, G.TIGE, H.GRIZEL and M.A. RABOUIN, 1980. Recherches sur Bonamia ostreae gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate Ostrea edulis L. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 43 (1), 131-140.

QADRI, S.M.H., S.G.M. QADRI, G.Y. KHAN, T.J. Mc GARRY and M.N. AL-AHDAL, 1988. Detection of Herpes simplex virus by biotinylated DNA probes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 11 : 145-149.

RAZIN, S., H.C. HYMAN, I.NUR and D.YOGEV, 1987. DNA probes for detection and identification of Mycoplasmas. *Isr. J. Med. Sci.*, 23 : 735-741.

RIPALTI, A., B. TREVISANI, M.P. LANDINI and M. LA PLACA, 1988. Diagnostic avail of a biotinylated DNA probe made from the Xba I fragment of human cytomegalovirus genome. *Microbiologica*, 12 : 1-6.

SAMUEL, J.E., M.E. FRAZIER, M.L.KAHN, L.S. THOMASHOW and L.P. MALAVIA, 1983. Isolation and characterisation of a plasmid from phase I Coxiella burnetti. *Infection and Immunity*, 41 : 488-493.

SETHABUTR, O., A.E. BROWN, J. GINGRICH, H.K. WEBSTER, N., POOYINDEE, D.N. TAYLOR and P.ECHEVERRIA, 1988. A comparative field study of radiolabelled and enzyme conjugated synthetic DNA probes for the diagnosis of Falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39 : 227-231.

SWERDLOW, E.D., G.S. MONASTYRKKAYA, L.I. GUSKOVA, T.L. LEVITAN, V.I. SHEICHENKO and E.I. BODOWSKY, 1974. Modification of cytidine residues with a bisulfite -O-methylhydroxylamine mixture. *Biochem. biophys. Acta (Amst)*, 340 153-165.

TENOVER, F., 1988, DNA probes. Where are they taking us ? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7 : 457-459.

VAN EYS, G.J.J.M., G.J. SCHOONE, G.S. LIGHTART, J.J. LAARMAN and W. J. TERPSTRA, 1987. Detection of Leishmania parasites by DNA in situ hybridization with non-radioactives probes. *Parasitol. Res.*, 73 : 199-202.

VODKIN, M.H., HMC WILLIAMS and E.H. STEPHENSON, 1986. Genetic heterogeneity among isolates of Coxiella burnetii. *Journal of general microbiology*, 132 : 455-463.

WELBURN, S.C. and W.C. GIBSON, 1988. Cloning of a repetitive DNA from rickettsia-like organisms of tsetse flies (*Glossina* spp.) *Parasitology*, 98 : 81-84.

WOOD, J.L., J.D. ANDREWS, 1962. Haplosporidium costale (Sporozoa) associated with a disease of Virginia oysters. *Science*, 136 : 710-711.

YEVITCH, P.P., and C.A. BARSZCZ, 1980. Histopathology as a monitor for marine pollution. Results of the histopathology examination of the animals collected for the U.S. 1976 mussels watch program. *Int. Counc. Explor. sea, Special Meeting on Diseases of commercially important Marine Fish and Shellfish. Copenhagen, 1-3 Oct. 1986.*