

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES

**RAPPORT DE STAGE
AVRIL-MAI 1994**

**ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DE LYSAT DU PROTOZOAIRE,
BONAMIA OSTREAE, PARASITE DES HEMOCYTES DE L'HUITRE
PLATE, *OSTREA EDULIS***

Sébastien Vieillard

**IFREMER
Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales
B.P. 133 - Ronce les bains
7390 LA TREMBLADE**

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon maître de stage, Tristan Renault pour m'avoir accueilli au sein de sa dynamique équipe, pour avoir su me transmettre de façon claire et précise de multiples connaissances sur les techniques et travaux qui ont cours dans son laboratoire et pour m'avoir fourni une base solide pour la rédaction de ce rapport.

Je remercie également Madame Nathalie Cochennec notamment pour sa patience lors du coulage des gels d'électrophorèse (sic), mais aussi pour toutes ses explications et ses multiples conseils lors des manipulations que j'ai entreprises avec elle et ,enfin, pour sa bonne humeur communicative.

Je remercie Patricia, Bruno et Géraldine pour leur aide précieuse pendant ce stage et pour bien d'autres choses encore...

Je remercie enfin les équipes de l'URPIG et du LBEIM pour leur chaleureux accueil.

INTRODUCTION

Mon stage s'est déroulé du 25 avril au 6 mai 1994 à la station IFREMER de Ronce les Bains au sein de l'URPIG (Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales), sur les bords de la Seudre, dans un cadre agréable.

Au cours de ce stage, j'ai plus particulièrement étudié la caractérisation électrophorétique des protéines contenues dans des lysats du protozoaire, *Bonamia ostreae*, parasite des hémocytes de l'huître plate, *Ostrea edulis*. Ce protozoaire est à l'origine de mortalités importantes chez cette espèce.

Après avoir brièvement présenté la structure et l'organisation de l'IFREMER dans une première partie, nous envisagerons, dans une deuxième partie, la caractérisation électrophorétique du parasite sus-cité.

1ère PARTIE : STRUCTURE ET ORGANISATION DE L'IFREMER

I. - L'IFREMER

1. - Historique

Depuis 1913, date de la création de l'Association d'Encouragement des Industries Ostréicoles (A.E.I.O.), il existe à La Tremblade un laboratoire de recherche.

En 1918, se crée l'Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (O.S.P.M.) qui supplante l'A.E.I.O. en 1928 pour le contrôle sanitaire des coquillages cultivés en France et se charge de tous les travaux de recherches liés aux ressources vivantes exploitées.

En 1993, est créé l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) après fusion de l'I.S.T.P.M. (Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes) et du Centre National pour l'Exploitation des Océans (C.N.E.X.O.).

2. - Missions et objectifs de l'IFREMER

L'IFREMER est un Etablissement Public à Caractère Industriel et Commercial (EPIC) placé sous la triple tutelle du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, du Ministère de l'Agriculture et des Pêches, et du Ministère des Transports.

L'IFREMER a reçu de multiples missions par le texte fondateur de l'Institut (décret du 5 juin 1984). Il est le seul organisme de recherche français dont la vocation est exclusivement maritime. L'IFREMER est ainsi :

1. Un organisme de recherche menant des actions propres dans le domaine des connaissances de base et des technologies qui leur sont associées,
2. une agence d'objectifs qui, en s'appuyant sur ses propres laboratoires, stimule l'action des autres acteurs de la recherche nationale,
3. une agence de moyens qui a la charge de la construction, de la programmation et de la mise en oeuvre de la flotte océanographique française,
4. l'IFREMER assure également une mission de service public : suivi des ressources, protection de l'environnement, contrôle des eaux littorales,
5. enfin en tant qu'EPIC (Etablissement Public à caractères Industriel et Commercial), l'IFREMER a mission de valoriser le résultat de ses travaux dans les entreprises et de mobiliser ses compétences pour renforcer la compétitivité des entreprises françaises du secteur maritime.

L'IFREMER s'est donc donné cinq objectifs prioritaires de recherche. Chaque objectif est sous la responsabilité d'un Directeur qui assure une fonction consultative et de conseil pour les domaines concernés.

. Le premier objectif correspond à la valorisation des substances marines ainsi que des biotechnologies associées. Les principaux thèmes abordés sont la prévention, le contrôle, l'amélioration des cheptels et enfin la valorisation des organismes et produits de la mer.

. Le deuxième objectif concerne la connaissance de l'environnement et l'aménagement du littoral. Leur maîtrise est indispensable à la recherche maritime et aux producteurs.

. Le troisième objectif correspond au programme Géosphère-Biosphère par lequel les études portent sur des zones géographiques données sur l'ensemble de l'écosystème : c'est à l'échelle de la planète que le suivi de l'environnement est réalisé.

. Le quatrième objectif regroupe les actions de l'IFREMER en matière d'océanographie. Cela concerne le renouvellement de la flotte océanographique ainsi que la programmation et la gestion du matériel nécessaire aux expéditions.

. Le dernier objectif concerne les études juridiques et socio-économiques liées à l'activité maritime.

II. - STATION DE LA TREMBLADE

1. - Situation géographique

La station est située au coeur du bassin de Marennes-Oléron en Charente-Maritime. Ce bassin se situe au premier rang des régions françaises pour la conchyliculture, celle-ci représente 6 000 hectares de parcs et de claires qui sont exploités par 2 000 professionnels.

Le bassin commercialise 45% des huîtres creuses consommées en France. En 1991, les français ont dégusté 800 millions d'huîtres Marennes-Oléron (produit labellisé) et ainsi dépensé 1 milliard de francs.

La conchyliculture et les activités qui en découlent sont donc essentielles à l'économie de la région de Marennes-Oléron (situation économique, Fig 3). Les activités liées à la conchyliculture peuvent encore se développer ; l'IFREMER contribue à ce développement et à la diversification de ces activités.

2. - Les différentes unités

La station de La Tremblade est divisée en deux laboratoires :

- le laboratoire Environnement Littoral (DEL)
- le Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins (LBEIM) sous la responsabilité de Maurice HERAL. Ce laboratoire est lui-même divisé en quatre unités de recherche :
 - * L'Unité de Recherche Régionale Aquacole (URRA),
 - * L'unité de Recherche en Génétique et Eclosion (URGE) sous la responsabilité d'André GERARD qui assure aussi celle de l'URRA par intérim,
 - * L'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales (URPIG) dirigée par Tristan RENAULT,
 - * L'Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles (UREA) sous la responsabilité de Maurice HERAL.

3. - Objectifs du LBEIM

Les objectifs du LBEIM entrent dans les programmes déclarés prioritaires par l'IFREMER. Par exemple, l'étude de l'évolution du domaine littoral et de l'impact de la qualité des eaux sur la conchyliculture est effectuée par l'UREA, la valorisation des produits de l'aquaculture est assurée par l'URGE dont un de ses objectifs est de produire des populations de mollusques plus résistantes et performantes. L'URRA participe à quelques-uns de ces programmes et assure également une fonction " d'Institut Technique " fournissant études et conseils aux administrations et collectivités locales. L'URPIG contribue à l'apport de nouvelles connaissances dans les domaines de la pathologie, de l'histopathologie, l'épidémiologie et de l'immunologie des mollusques et assure, en cas de mortalités massives, la recherche d'éventuels agents pathogènes responsables.

III - UNITE DE RECHERCHE EN PATHOLOGIE ET IMMUNOLOGIE GENERALES

1. - Objectifs généraux et principaux programmes de recherche

≈ Les objectifs généraux

La présence de maladies dont l'impact socio-économique peut être important et l'accroissement des échanges de produits aquacoles entre pays nécessitent le renforcement des recherches dans les domaines de la pathologie et de l'immunologie générales afin de :

- mieux préserver les cheptels existants et contribuer à l'obtention de souches résistantes,
- participer à l'élaboration des textes et à la prise de décisions concernant des pathologies existantes ou nouvelles,
- contribuer à l'apport de connaissances fondamentales en pathologie, en histopathologie, en épidémiologie et en immunologie des mollusques.

≈ Par rapport à ces objectifs, cinq principaux programmes de recherche ont été établis :

- La mise au point de nouvelles méthodes de diagnostic.
- Le développement de la pathologie expérimentale en relation avec l'épidémiologie descriptive.
- L'établissement d'un atlas d'histologie, cytologie et histopathologie des principales espèces de mollusques élevées en Europe.
- L'acquisition de connaissances en immunologie générale chez les mollusques bivalves marins.
- Le suivi zoosanitaire des différentes zones d'élevage ainsi que l'étude des cas de mortalités anormales pouvant survenir dans les différents bassins ostréicoles (recherche d'agents pathogènes connus ou nouveaux).

2. - Effectifs et moyens

2.1 - Effectifs

Actuellement, l'URPIG est composée d'une équipe de huit personnes ainsi réparties :

Personnel scientifique

- * Cadres :
 - Tristan RENAULT - Responsable de L'URPIG.
 - Patricia MAFFART (contrat à durée déterminée).
- * Techniciens :
 - Nathalie COCHENNEC.
 - Bruno CHOLLET, à mi-temps (Contrat de qualification).
- * Thésard :
 - Rose-Marie LE DEUFF.

Personnel administratif :

- * Secrétaire : - Yvette SIMIAN, à 1/3 temps.
- * Comptable : - Martine GRASSET, à 1/4 temps.
- * Entretien : - Ginette CAILLETEAU, à mi-temps.

2.2 - Matériel

Une partie du matériel disponible dans les locaux occupés par URPIG est donnée dans la liste suivante :

- trois microscopes (Olympus BH-2),
- un microscope inversé (Olympus CK62),
- un microscope électronique (JEOL JEM 1200 EX),
- deux hottes à flux lumineaire,
- une centrifugeuse Beckman J-6M,
- une centrifugeuse Beckman 12,
- un appareil de PCR (Techne PHC-2),
- cuve électrophorèse (Bioblock SE 600) et minicuve (HOEFFER),
- un appareil de transfert sur membrane de nitrocellulose (LKB 211-250),
- Trois étuves,
- une étuve CO₂,
- un ultramicrotome (LKB, ultratome NOVA),
- un microtome (LKB),
- une salle de développement de photographies,
- un automate à déshydratation et imprégnation pour pièces histologiques (LKB),
- un cryomicrotome (LKB NOVA),
- un sécheur de gel avec pompe à vide,
- un lecteur ELISA.

DEUXIEME PARTIE : CARACTERISATION ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DU PARASITE *BONAMIA OSTREAE* PURIFIE

I. - INTRODUCTION

En 1979, une importante mortalité a été observée dans les parcs d'huîtres plates (*Ostrea edulis*) de l'île de Tudy en Bretagne. Cette mortalité a été attribuée à un protiste parasite des cellules de l'hémolymphe (hémocytes), *Bonamia ostreae* (nouveau genre et nouvelle espèce).

La bonamiose ou maladie hémocytaire est redoutable pour les cheptels d'huîtres *Ostrea edulis* de France, Grande-Bretagne, Pays-Bas, Espagne et Danemark. Elle aurait été introduite de Californie en France lors des transferts de coquillages, sans que cette supposition ait pu être confirmée. En 1980, la maladie s'est propagée très rapidement à la majorité des centres conchylicoles de Bretagne et, une année plus tard, jusqu'à 68 % des lots d'huîtres se sont révélés parasités.

La bonamiose, a aujourd'hui de réelles conséquences sur l'économie conchylicole de l'huître plate en France, en association à une autre parasitose observée depuis 1969, la marteiliose (*Marteilia refringens*).

Elles ont entraîné une chute de la production de l'huître plate, *O. edulis*, et ont donc joué un rôle dans l'installation du quasi monoélevage de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, avec les dangers que cela représente (problème de surproduction, risque d'épizooties).

La caractérisation électrophorétique des protéines totales de *B. ostreae* fait partie intégrante des programmes de recherche de l'URPIG afin de mieux connaître ce parasite, d'essayer de développer de nouvelles méthodes de diagnostic, et de chercher les moyens d'enrayer la bonamiose ainsi que de permettre un renouveau de l'élevage de l'huître plate.

II. - *BONAMIA OSTREAE* ET LA BONAMIOSE

1. Le parasite : *Bonamia ostreae*

1.1. - Morphologie

B. ostreae existe sous deux formes :

- les formes claires, de 2,5 μm à 7 μm de diamètre, elles représenteraient les formes végétatives,
- les formes denses, arrondies, de 2 μm et 3 μm de diamètre, elles correspondraient à des formes de résistance qui pourraient assurer l'extension de la parasitose.

Les formes observées possèdent un nombre variable de noyaux allant de un à sept.

1. 2. - Mécanisme d'entrée

B. ostreae est un parasite des cellules de l'hémolymphe Il pénètre dans tous les types hémocytaires sans altération visible de la membrane cytoplasmique. Le mécanisme d'entrée du parasite dans l'hémocyte semble être un phénomène dirigé par l'hôte et laissant intervenir également le parasite lui-même.

La phagocytose semble être le mécanisme d'entrée du parasite *B. ostreae* et aurait pour origine des interactions de types récepteur ligand au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules hôtes de l'huître.

Par ailleurs, chez *O. edulis*, *B. ostreae* semblerait capable d'induire sa propre phagocytose.

1. 3. - Cycle

Le cycle du parasite n'est pas élucidé. Il semble cependant que la phase infestante de ce cycle soit indépendante de la température car *B. ostreae* est infestant toute l'année.

B. ostreae se multiplierait par division binaire simple dans les hémocytes des huîtres et serait ainsi libéré après lyse de la cellule hôte. Les formes libérées infesteraient d'autres hémocytes chez le même animal ou chez d'autres individus proches.

1. 4. - Survie du parasite dans les hémocytes

Le parasite *B. ostreae* est capable d'éviter ou d'inhiber les processus microbicides (dérivés oxygène, enzymes hydroliques) de ses cellules hôtes. Le parasite *B. ostreae* possède une activité catalase qui semble lui permettre de détoxifier les dérivés oxygènes (radicaux libres) et une activité phosphatase acide qui inhiberait la production d'enzymes hydroliques.

2. - La bonamiose

2.1. - Mode de transmission

≈Naturelle

La bonamiose se propage par simple voisinage entre des huîtres parasitées et des huîtres saines . Les sources d'agents pathogènes seraient les huîtres parasitées elles-mêmes et les cadavres d'huîtres parasitées.

≈Expérimentale

La contamination peut se faire par voisinage en bacs, ou inoculation de parasites purifiés dans la cavité péricardique après anesthésie des animaux.

2.2. - Symptômes chez les huîtres infestées

Les huîtres adultes semblent les plus sensibles, tandis que le naissain est très peu parasité.

Les huîtres infestées peuvent présenter des lésions branchiales de types indertation ou perforation, généralement entourées d'un liseré jaune clair pouvant être interprété comme une réaction de cicatrisation de l'hôte. Le système circulatoire de l'huître étant ouvert, le parasite est disséminé dans tout l'organisme.

La bonamiose influe sur le rôle des hémocytes dans l'organisme et gêne : la cicatrisation, la respiration, l'excrétion et l'équilibre du milieu interstitiel, ce qui aboutit à l'épuisement et à la mort de l'huître.

III. - MATERIEL ET METHODES

1. - Obtention de parasites purifiés

Le protocole de purification doit être effectué à chaque fois que l'on veut obtenir des parasites, *B. ostreae*, car il n'existe pas de culture cellulaire hémocytaire d'huître permettant de maintenir *in vitro* ce protozoaire.

1. 1. - Choix des huîtres destinées à la purification

Les animaux infestés expérimentalement sont placés dans la salle de quarantaine de la station IFREMER de La Tremblade en condition de stress (jeûne, eau à forte température 25°C). Chaque matin un contrôle de la mortalité est effectué.

Afin de déterminer le degré d'infestation des huîtres mortes, des appositions cardiaques sont réalisées. Le degré d'infestation est évalué par observation microscopique d'appositions cardiaques après fixation au méthanol et coloration (kit Hémacolor Merck), selon le nombre de parasites observés, comme suit :

- (-) pour les prélèvements où aucun parasite n'a pu être détecté.
- (+) pour les prélèvements où une dizaine de parasites ont été détectés sur plusieurs champs.
- (++) pour les prélèvements où quelques parasites sont observables par champ optique.
- (+++) pour les prélèvements où de nombreux parasites sont observables par champ optique.

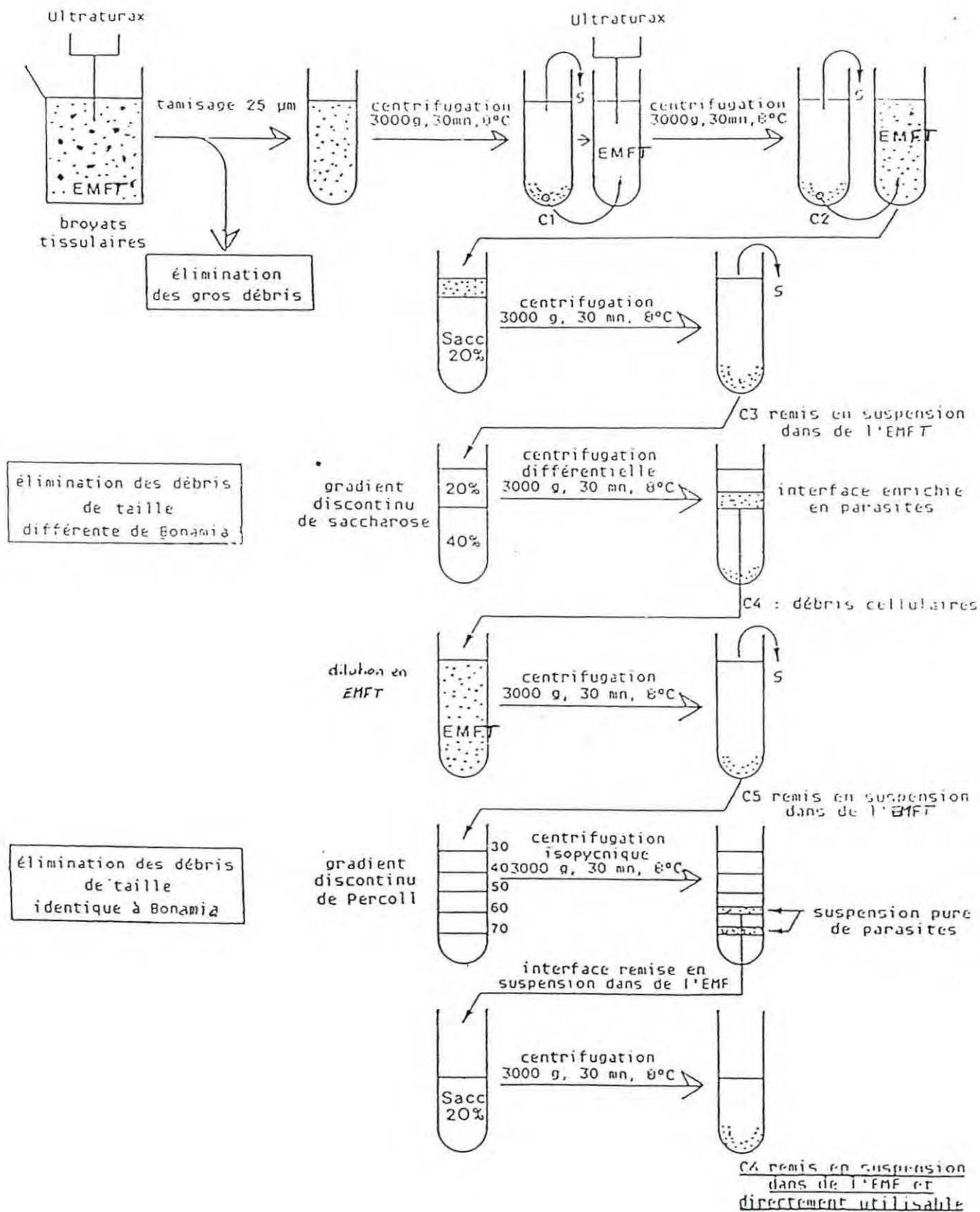
La purification se fait essentiellement sur les huîtres présentant un degré d'infestation (++) ou (+++) en *Bonamia ostreae*, associé à un faible degré d'infestation bactérienne.

1. 2. - La purification :

Pour la purification, la totalité des organes de l'huître est utilisée car ce parasite, du fait de sa localisation intrahémocytaire, est dispersé dans tout l'organisme (système circulatoire ouvert chez les mollusques bivalves), à l'exception du muscle adducteur qui contient peu d'hémocytes et dont la nature fibreuse rend difficile la dissociation.

La dissociation des tissus est effectuée à l'aide d'un homogénéiseur de type ULTRA-TURRAX qui permet une bonne dissociation tissulaire et cellulaire et qui permet également de

Figure 4. Protocole de purification du parasite *Bonamia ostreae*.



S : surnageant ; C1 : culot ; EMF : eau de mer filtrée

EMFT : eau de mer filtrée et débarrassée de la bactérie *Vibrio* par autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

préservé relativement bien les organites cellulaires et les noyaux dont la taille est sensiblement supérieure ou égale à celle de *B. ostreae* (2 µm à 4 µm).

La purification de *B. ostreae* correspond ensuite à une succession de centrifugations différentielles et isopycniques dans de l'eau de mer filtrée, dans des solutions de concentration variable de sucrose et de percoll.

Le protocole opératoire est en annexe II et figure 4.

2. - Les différents traitements du parasite *Bonamia ostreae* après purification

2. 1. - Lyse du parasite purifié

Après la dernière étape de purification, le parasite est centrifugé. Le culot de parasites est repris dans un volume défini de tampon de lyse (annexe III), puis placé 45 minutes dans la glace avec un passage au Vortex toutes les dix minutes. Le lysat de parasites est ensuite traité aux ultrasons (100W-30s) toujours à froid et ensuite conservé congelé à -20°C, avant quantification des protéines et analyse par électrophorèse.

Le tampon de lyse utilisé contient ou non une anti-protéase, le Phenyl Méthyl Sulfonyl Fluoride (PMSF).

2. 2.- Dosage des protéines

Un dosage des protéines est réalisé sur les lysats de parasites purifiés afin de pouvoir calculer la quantité d'échantillon à déposer dans les puits pour l'analyse électrophorétique. La méthode de Lowry est utilisée en raison de sa sensibilité. Le dosage est réalisé sur 90 µl et 200 µl de chacun des échantillons.

Une gamme étalon est préparée de 0 à 200 mg/ml de sérum albumine bovine (SAB) dans de l'eau distillée. Les résultats sont exprimés en mg équivalent sérum albumine bovine par ml.

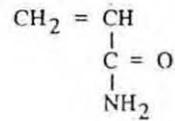
Le protocole opératoire est rapporté en annexe IV.

3. - Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

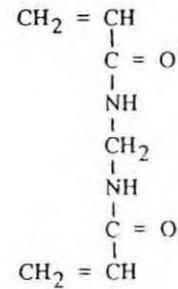
3. 1. - Principe

Le protocole dérive de la méthode originale décrite par Lammler en 1970 Le S.D.S. (Sodium Dodécyl Sulfate) dénature les chaînes polypeptidiques et les charge négativement de façon identique tandis que le βmercaptoéthanol rompt les ponts disulfures reliant certaines chaînes polypeptidiques entre-elles. Placé dans un champ électrique, les chaînes polypeptidiques se comportent comme des polyanions et migrent vers l'anode. De cette manière, la vitesse et la distance de migration des différentes chaînes polypeptidiques ne sont fonction que de leur masse moléculaire.

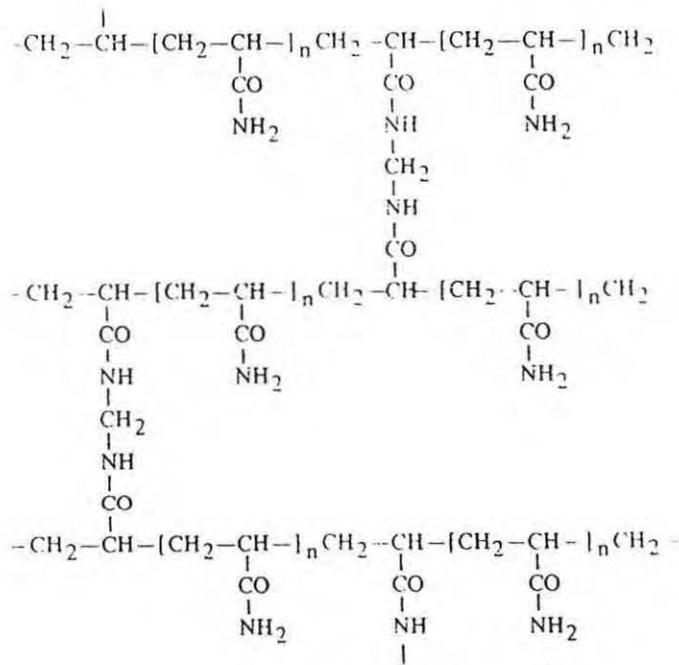
Figure 5. Structure chimique de l'acrylamide, du N, N'- méthylène bisacrylamide et du réseau acrylamide/bisacrylamide.



Acrylamide



N,N'-methylene bisacrylamide



ge de polymerisation

La distance de migration des différentes protéines permet par comparaison avec un kit de masses moléculaires de définir la masse moléculaire de chacun de ces polypeptides ainsi séparés.

Pour que la résolution de cette séparation électrophorétique soit encore meilleure, on utilise un gel avec un gradient croissant de concentration en polyacrylamide. Au fur et à mesure de la migration, les protéines rencontrent un réseau dont les mailles sont de plus en plus serrées.

3. 2. - Préparation du gel de séparation

Le gel de polyacrylamide résulte de la polymérisation de monomère d'acrylamide en longues chaînes et de leur pontage grâce à de la N,N'-méthylène bisacrylamide (ou usuellement bisacrylamide), cette polymérisation nécessite la présence de catalyseurs : persulfate d'ammonium ((NH₄)₂ S₂ O₆) et TEMED (Tétra Métyl Ethylène Diamine : (CH₃)₂-N-CH₂-CH₂-N-N-(CH₃)₂). Cf. figure n° 5.

Afin de réaliser un gradient, il est nécessaire de préparer deux solutions à différents pourcentages, on utilise une solution à 9% (Solution A) et une solution à 17,5% (Solution B).

Le pourcentage correspond à la concentration totale en acrylamide de bisacrylamide en gramme pour 100ml. Les pourcentages à utiliser sont calculés en fonction de la taille des protéines.

3. 3. - Coulage du gel de migration

Le gel est coulé entre deux plaques de verre verticales espacées de un millimètre, la taille des gels obtenus est de 14 cm de large et environ 14 cm de haut.

22,5 ml de solution A et 7,9 ml de solution B sont déposés dans les réservoirs d'un formeur de gradient. La solution B, la plus lourde est déposée dans les réservoir contenant un agitateur magnétique qui est relié à une pompe péristaltique. Ce montage permet de réaliser un gradient de concentration homogène (Cf. figure n° 6). La polymérisation se fait en une heure à température ambiante.

3. 4. - Coulage du gel "stacking" ou gel de concentration :

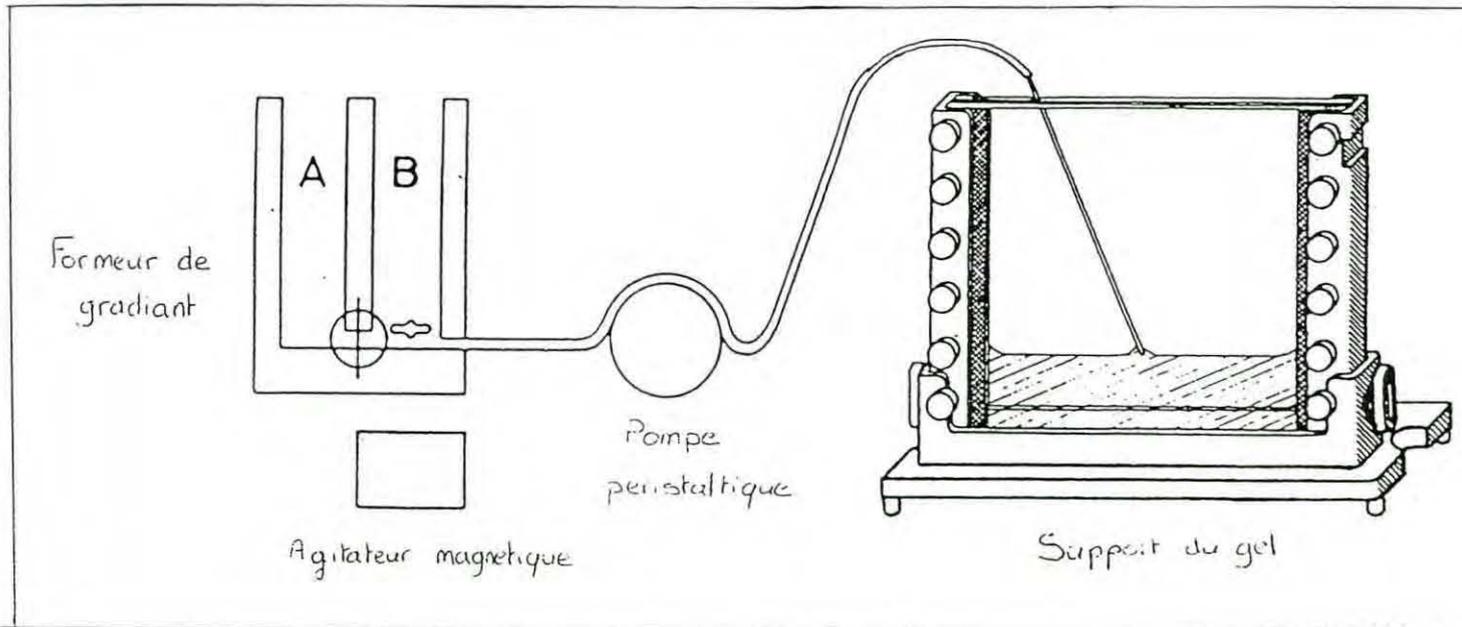
Le "stacking" est un gel à mailles lâches qui est coulé au-dessus du gel de migration lorsque celui-ci est solidifié. Nous avons utilisé un "stacking" à 5,2%. Les puits (15 par gel) sont pratiqués en plongeant un peigne adapté, avant la polymérisation du stacking (15 minutes à température ambiante).

3. 5. - Migration électrophorétique

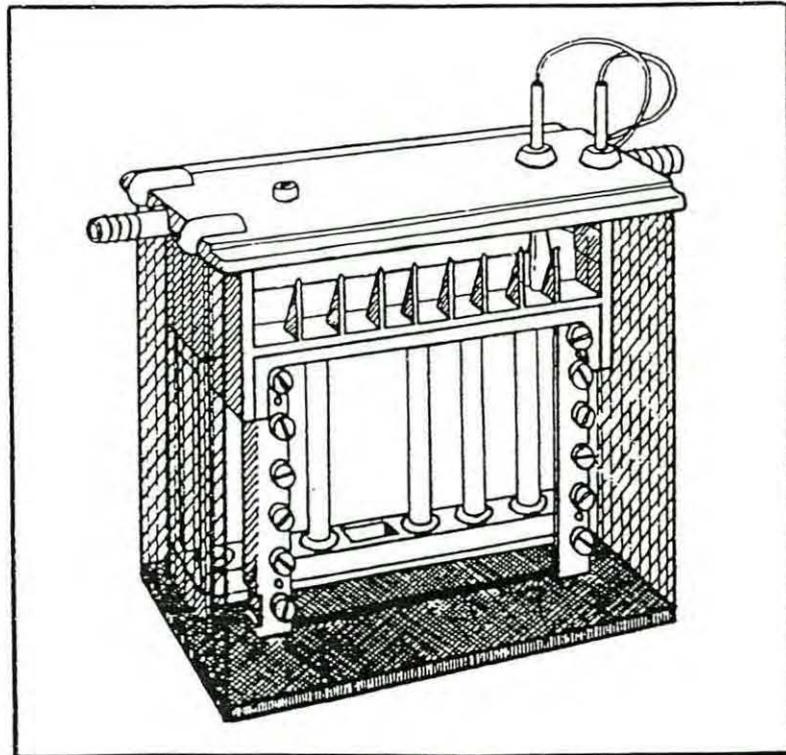
Après dépôt des échantillons et d'un marqueur de masses moléculaires (94, 67, 43, 20.3, 14.4 kDa) dans les puits, la migration électrophorétique s'effectue sous un ampérage de 28 mA pour le "stacking", de 25 mA pour le gel de migration.

L'évolution du front de migration est suivi grâce à l'ajout de quelques gouttes de bleu de bromophénol dans le tampon de migration du bac supérieur de la cuve.

Figure 6



Coulage d'un gel



Cuve à électrophorèse

4. - Traitements du gel après électrophorèse :

4. 1. - Coloration des protéines au bleu de Coomassie

Les spectres électrophorétiques sont visualisés par coloration du gel au bleu de Coomassie -250 (MERCK). L'excès de colorant est éliminé par des rinçages successifs dans un mélange éthanol/acide acétique/eau distillée (2/1/7).

4. 2. - Coloration des protéines au nitrate d'argent : SDS-PAGE

Lorsque la migration électrophorétique est achevée, le gel est démoulé et fixé grâce à un mélange éthanol 40% et acide acétique 10% pendant une nuit.

Après la fixation, le gel est coloré puis développé (annexe VI). La coloration s'estompant rapidement, il est préférable de prendre des clichés juste après la fin du développement.

La coloration à l'argent possède une sensibilité 100 fois supérieure à celle de la coloration au bleu de Coomassie. Ainsi le seuil de détection avec cette technique est de l'ordre du ng.

4. 3. - Transfert sur membrane de nitrocellulose ou sur membrane IMMOBILON (Western Blotting)

Le gel étant relativement fragile, pour obtenir un support plus facile à manipuler que le gel d'acrylamide il est possible de réaliser un transfert. Celui-ci permet de réaliser des "empreintes" de protéines sur membrane de nitrocellulose (BioRad) ou une membrane IMMOBILON (Millipore).

Aussitôt après la migration réalisée, on effectue un transfert semi-humide, pendant une heure sous ampérage fonction de la surface du gel à transférer (0,8 mA/cm²) en présence d'un tampon de transfert (annexe VII).

Après transfert, la membrane de nitrocellulose ou la membrane IMMOBILON, séchée à température ambiante est conservée à 4°C dans une pochette plastique scellée. Il est alors possible de découper des bandes et de les traiter différemment. Le mode opératoire est donné en annexe VII.

4. 4. - Coloration des protéines à l'argent sur membrane de nitrocellulose ou membrane IMMOBILON.

Pour visualiser, les différentes bandes de protéines, il est possible de réaliser une coloration à l'argent sur la membrane de nitrocellulose ou la membrane IMMOBILON. Le mode opératoire est donné en annexe VIII.

4. 5. - Technique immunologique de révélation : Immunotransfert

Après transfert électrophorétique des protéines du parasite purifié, des anticorps polyclonaux et monoclonaux anti *B. ostreae* sont testés selon la technique rapportée en annexe IX.

Les anticorps sont incubés en présence de bandelettes de transfert, puis une incubation avec un second anticorps couplé à la peroxydase (Anti Ig de lapin ou Anti Ig de souris) suit cette étape. La révélation se fait par la 3, 3' Diaminobenzidine. Les polypeptides reconnus par les anticorps anti *B. ostreae* apparaissent comme des bandes colorées en brun

4. 6. - Révélation des glycoprotéines:

La concanavaline A (Con A) est une lectine qui possède deux sites actifs. Pour un site elle est capable de se fixer spécifiquement sur les résidus D-mannose et de D-glucose des glycoprotéines. Son deuxième site libre peut accepter l'enzyme peroxydase, la révélation de l'activité peroxydasique s'effectue selon le même protocole que pour l'immunotransfert. Le mode opératoire est en annexe IX.

IV. - RESULTATS - DISCUSSION

1. - Résultats de purification du parasite *Bonamia ostreae*.

Quatre purifications du parasite *Bonamia ostreae* ont été effectuées. Les rendements de ces purifications sont donnés dans le tableau suivant :

Date de purification	Nombre d'animaux ayant servi à la purification	Rendement (nb de B./ml)
25-01-94	2 huîtres	174.10 ⁶
03-02-94	5 huîtres	210.10 ⁶
10-02-94	4 huîtres	930.10 ⁶
17-02-94	4 huîtres	1280.10 ⁶

Les purifications du 25 janvier, des 3 et 17 février 1994 ont servi à réaliser des lysats pour analyse en électrophorèse. La purification du 10 février 1994 a quant à elle servi à inoculer des animaux afin de maintenir en salle de quarantaine un lot d'huîtres infestées expérimentalement et servant par la suite de réserve d'animaux parasités en vue d'effectuer des purifications. 300 animaux ont reçu 350 000 parasites par individu sous un volume de 50 µl, par inoculation intrapéricardique.

Il est à noter que les quantités de parasites purifiés obtenues sont relativement importantes par rapport au nombre d'huîtres utilisées par purification.

Par ailleurs, les rendements de purification semble varier d'une purification à une autre (174 0 1280 10⁶ parasites). Cette constatation peut s'expliquer par une hétérogénéité de degré d'infestation des animaux ayant servi à purifier les parasites, bien que seules les huîtres ++ et +++ soient sélectionnées pour les purifications.

2. - Lysat de parasites purifiés et quantification des protéines

La lyse du parasite a été effectuée sur les produits de purification du 25 janvier 1994, des 3 et 17 février 1994. Une quantification des protéines selon la technique de Lowry a été ensuite réalisée sur ces trois lysats ainsi que sur six autres lysats réalisés au laboratoire préalablement à mon stage, en 1993. Les résultats de ces analyses sont rapportés dans le tableau suivant :

Date de purification	Volume de tampon de lyse pour 10^6 parasites en μl	PMSF dans le tampon de lyse	Q de prot. en mg/ml dans lysats
12.02.93	5	+	18,7
17.02.93	3,3	+	47,8
	3,3	-	42,3
24.02.93	3,3	+	71,7
	3,3	-	71,3
03.03.93	3,3	-	37,9
09.03.93	3,3	-	38
06.04.93	3,3	+	30,6
25.01.94	3,3	+	65
03.02.94	3,3	+	38
17.02.94	3,3	+	23,5

Ces résultats montrent une variation dans la quantité de protéines dans les lysats de *B. ostreae*, entre 20 et 70 mg par ml. Cependant ils restent relativement homogènes. Ces lysats permettent de prévoir des valeurs de dépôts pour les analyses en SDS-PAGE correspondant aux possibilités données par la taille des puits des peignes dont dispose le laboratoire.

En effet, il est possible d'envisager un dépôt de l'ordre du mg par puits, ce qui permet une bonne résolution et correspond à un volume de dépôt compris entre 50 et 100 μl . Ce volume est en adéquation avec le volume de 200 μl disponible pour le peigne à 15 dents utilisés.

Pour la purification du 12 février 1993, le volume de tampon de lyse utilisé, était de 5 μl pour 10^6 *B. ostreae* purifiés; pour l'ensemble des autres purifications, le volume est uniquement de 3.3 μl . Il est intéressant de noter que la plus faible quantité de protéines est obtenue pour le volume de 5 μl pour 10^6 *B. ostreae*. Ce résultat peut s'expliquer par un phénomène de dilution. Le volume de 3.3 μl pour 10^6 cellules a ainsi été retenu puisqu'il donne des résultats en quantification de protéines relativement homogène, et permet avec une purification à rendement moyen d'obtenir un volume conséquent de lysat. Précédemment à mon stage, des travaux ont été réalisés afin de déterminer le volume de tampon de lyse le plus adapté. Des essais ont ainsi été réalisés avec 20, 10, 5, et 3.3 μl de tampon de lyse pour 10^6 *B. ostreae* purifiés.

Concernant la présence d'un antiprotéase (PMSF) dans le tampon de lyse, il semble que son addition ne permette pas une augmentation nette de la quantité en protéines des lysats de parasites purifiés.

Cependant, son utilisation peut permettre une meilleure conservation des polypeptides contenus dans les échantillons.

3. - Analyse de lysat de parasites purifiées en SDS-PAGE

L'analyse comparée (Fig. 1), après coloration du gel au nitrate d'argent, des spectres électrophorétiques en SDS-PAGE en conditions réductrices d'un échantillon de *B. ostreae* purifié (purification du 17.02.93) lysé avec un tampon contenant du PMSF (bandes e, f, g et h) et d'un même échantillon traité avec le même tampon en absence de PMSF (bandes a, b, c et d) montre peu de différence. En effet, plus de 30 bandes (comprises entre 94 kDa et 14 kDa) sont visibles pour les deux échantillons. Les bandes observées sont pratiquement identiques. Cependant, deux bandes nettes supplémentaires sont visibles dans la zone des hautes masses moléculaires pour les spectres électrophorétiques de l'échantillon traité par le tampon de lyse additionné de PMSF. Ce résultat semble indiquer que la présence de l'antiprotéase (PMSF) dans le tampon de lyse peut permettre la conservation de certains polypeptides qui disparaissent en son absence. Par ailleurs, le PMSF étant une petite molécule, il n'est pas repéré sur les gels utilisés.

Pour ce gel, deux quantités de protéines ont été déposées pour chacun des deux traitements (avec ou sans PMSF). Pour les lignes a et b, le dépôt correspond à 1.56 mg, pour les lignes c et d à 2.36 mg, les lignes e et f à 1.76 mg et pour les lignes g et h le dépôt est de 2.67 mg. Ainsi en comparant les pistes c et d aux pistes e et f, il est clair que des bandes supplémentaires sont visibles pour ces deux dernières (Fig. 1), et elles ne correspondent pas à des bandes relevées du fait d'un dépôt plus important.

Le même gel coloré en bleu de Coomassie montre des profils identiques, mais beaucoup moins marqués. Ainsi il n'est possible de détecter qu'une quinzaine de polypeptides. En effet, ce gel a tout d'abord été coloré au bleu de Coomassie, puis décoloré et recoloré au nitrate d'argent. Ces résultats montrent la meilleure sensibilité de la coloration au nitrate d'argent par rapport à la coloration au bleu de Coomassie.

Il semble que les quantités déposées soient insuffisantes pour une coloration au bleu de Coomassie, mais par ailleurs trop importante pour la coloration au nitrate d'argent. Cependant des quantités avaient été choisies dans un premier temps pour être sûr d'obtenir des profils visibles après coloration au nitrate d'argent.

Sur un second gel, deux échantillons différents (purification du 17-02-93 et purification du 12-02-93) traités par le tampon de lyse en présence de PMSF ont été testés. Après coloration au nitrate d'argent, les profils électrophorétiques sont identiques pour ces deux échantillons avec une trentaine de bandes visibles (Fig. 2). Des quantités différentes ont été testées : ligne a : 2.67 mg (17-02-93), ligne b : 1.76 mg (17-02-93), ligne c : kit de masses moléculaires, d et e : 1.40 mg (12-02-93) et lignes f et g : 1.04 mg (12-02-93). D'un échantillon à l'autre ayant subi un même traitement (tampon de lyse + PMSF) sur un même gel, les profils électrophorétiques sont comparables. Par ailleurs, d'un gel à l'autre pour un même échantillon, les spectres observés sont reproductibles.

Enfin, il semble qu'un dépôt de plus faible quantité de protéine améliore la définition des profils pour les petites masses moléculaires (lignes f et g), après coloration au nitrate d'argent.

4 - Analyse d'anticorps polyclonaux et monoclonaux anti-*Bonamia ostreae* en Western blotting

Un sérum de lapin, un pool de sérum de souris et deux anticorps monoclonaux (20 B2 et 15 C2 anti *B. ostreae*) ont été testés sur une membrane de transfert après électrophorèse d'un échantillon de parasite purifié (purification du 12-02-93). L'échantillon a été traité par le tampon de lyse en présence de PMSF, et les dépôts ont été de 1.87 mg par piste.

Le sérum de lapin montre une réactivité nette vis à vis de certains polypeptides du parasite après purification et séparation en SDS PAGE (Fig. 3). Cette réactivité est cependant plus marquée pour une dilution du sérum au 1/10e (piste a) par rapport à la dilution 1/100e (piste b). En particulier, deux bandes apparaissent comme majoritaires après révélation. Ces deux bandes sont des bandes qui apparaissent également majoritaires sur gel et sur membrane après coloration au nitrate d'argent.

Le pool de sérum de souris quant à lui, présente une faible réactivité quelque soit la dilution utilisée (pistes c et d) (Fig.3). Sur la piste e, le monoclonal 15 C2 permet de révéler au moins une dizaine de bandes (Fig.3). Ce résultat reste difficile à interpréter. En effet, avec un anticorps monoclonal, nous attendions l'obtention d'une bande ou tout au plus de quelques bandes. Cependant, ce résultat pourrait être expliqué par la présence d'un motif glycosylé commun à plusieurs polypeptides et qui serait l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal (cf paragraphe V dans résultats et discussion). Par ailleurs il est à noter que l'anticorps monoclonal a été utilisé dilué au 1/10e, il serait judicieux de le retester à une dilution plus importante pour éliminer un manque éventuel de spécificité.

Le second anticorps monoclonal (20 B2) testé au 1/10e ne permet pas une révélation nette de bande sur la membrane (piste f). Trois très faibles bandes sont observées (Fig. 3), elles correspondent aux trois bandes les plus intenses révélées par l'anticorps monoclonal 15 C2. Il semblerait possible que ces deux anticorps nonoclonaux possèdent des spécificités comparables. Cependant, le 20 B2 montre une très faible réactivité.

Par ailleurs, les bandes g et h correspondent aux témoins second anticorps seul (anti Ig de lapin ou anti Ig de souris couplé à la peroxydase). Aucun marquage n'est décelable. Cependant cette expérience était une expérience préliminaire, nous n'avons pas effectué un témoin utilisant un sérum anticorps monoclonal ayant des spécificités dirigées contre des agents pathogènes autre que *B. ostreae*.

5. - Glycosylation des polypeptides de *Bonamia ostreae* purifié.

Une recherche de glycoprotéines a été réalisée après séparation électrophorétique en conditions réductrices et transfert sur membrane IMMOBILON ou sur membrane de nitrate de cellulose. L'échantillon testé correspond à des parasites purifiés, traités par le tampon de lyse en présence de PMSF (purification du 12-02-93). Les dépôts sur le gel ont été de 1.87 mg par piste. La révélation par la technique Con A/peroxydase/diaminobenzidine permet de révéler une quinzaine de bandes avec quatre bandes nettes et les autres plus difficilement décelables (Fig 3, pistes i et j).

Ce résultat indique la présence de glycosylation sur plusieurs polypeptides du parasite *B. ostreae* purifié, plus particulièrement la présence de résidus mannose sur lesquels se fixe la Concanavaleine A. Cependant, les marquages restent discrets et pourraient s'expliquer par un pourcentage faible de résidus glycosylés sur les polypeptides du parasite.

Une manipulation supplémentaire effectuée réellement après la fin de mon stage, a été réalisée afin de démontrer que les polypeptides révélés par la technique Con A/Peroxydase/Diaminobenzidine sont bien des molécules glycosylées. Pour cela, une digestion à l'endoglycosidase F qui rompt les liaisons entre les résidus mannose et les protéines a été effectuée avant électrophorèse en SDS-PAGE sous conditions réductrices et transfert. Les résultats de cette expérience ne sont pas rapportés dans mon rapport.

Par ailleurs, une comparaison entre les polypeptides qui apparaissent glycosylés (technique Con A/Peroxydase/Diaminobenzidine) et les bandes révélées par l'anticorps 15 C2 montre une certaine similitude qui pourrait confirmer l'hypothèse d'une spécificité dirigé contre des résidus glycosylés de cet anticorps monoclonal.

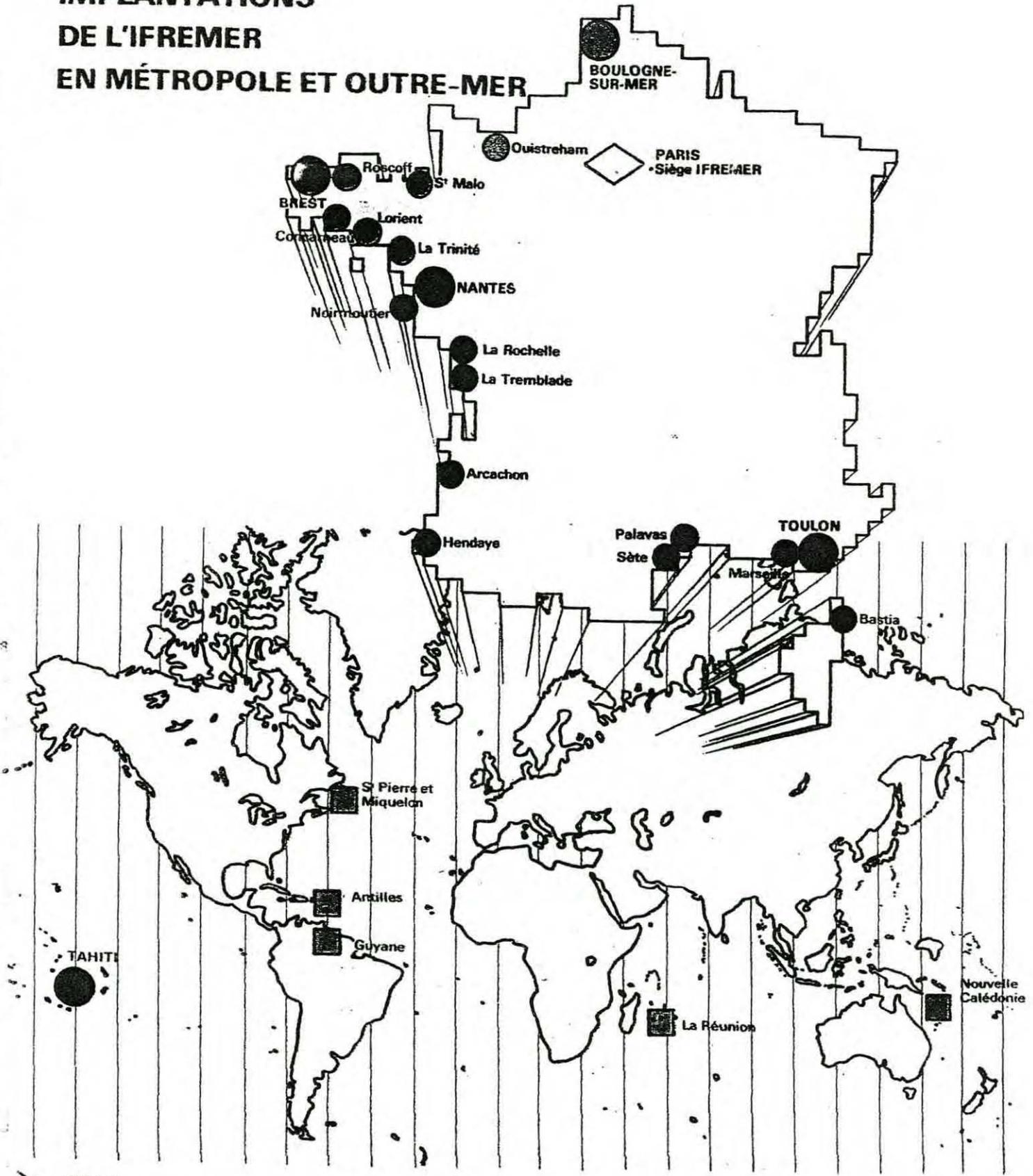
V - CONCLUSION

Pour des raisons techniques, je n'ai pas pu personnellement assister à une caractérisation électrophorétique du parasite *B. ostreae*. Néanmoins, j'ai utilisé des résultats obtenus à l'URPIG quelques semaines auparavant. Il s'agit par ailleurs d'un travail original : c'est la première caractérisation électrophorétique de ce parasite.

Cette caractérisation montre une trentaine de bandes de protéines du parasite *B. ostreae* qui apparaissent à chaque révélation des électrophorèses SDS-PAGE réalisées.

Après ces électrophorèses, le travail réalisé sur les transferts sur membrane de nitrocellulose, ou membrane IMMOBILON, ont montré essentiellement quatre bandes de protéines glycosylées avec des résidus mannose (grâce à la concanavaleine A). L'anticorps monoclonal anti-*B. ostreae* 15 C₂ réagit avec une dizaine de bandes. Il semblerait aussi qu'il puisse reconnaître des motifs glycosylés, il ne semble pas spécifique d'un déterminant protéique.

IMPLANTATIONS DE L'IFREMER EN MÉTROPOLE ET OUTRE-MER



- ▷ PARIS
Siège IFREMER
- centre
- station rattachée
- délégation

Figure 2



Le bassin en chiffres

6 000 hectares de parcs et de Claires
et 2 000 exploitations.

■ Superficies concédées sur le Domaine Public Maritime

a) parcs à huîtres	2 897 ha
b) bouchots	95 km
total (10 m ² = 1 are)	2 992 ha
nombre d'exploitations conchylicoles env.	2 000
superficie moyenne des exploitations	1,6 ha
superficie des Claires sur domaine privé	2 000 ha
répartition géographique des concessionnaires de parcs	
. rive gauche de la Seudre	27 %
. rive droite de la Seudre et Charente	39 %
. Oléron	29 %
. autres	5 %

En 1991, les français ont dégusté 800 millions de Marennes-Oléron et dépensé 1 milliard de francs.

■ Répartition des établissements (chiffres approchés)

800 établissements d'expédition
1 100 établissements d'élevage

Ventes d'étiquettes professionnelles :

. huîtres	6 579 100
. moules	194 000

■ Chiffre d'affaires (1990): 1 milliard de francs

Les prix en 1991

. à l'élevage	12 F/kg
. à l'expédition	
- Fines de Claires, le colis standard	260 F
- Spéciales de Claires, le colis standard	340 F

(le colis standard, d'un poids de 13 à 14 kg comprend 200 huîtres M3 ou 250 M4, ou 300 P5)

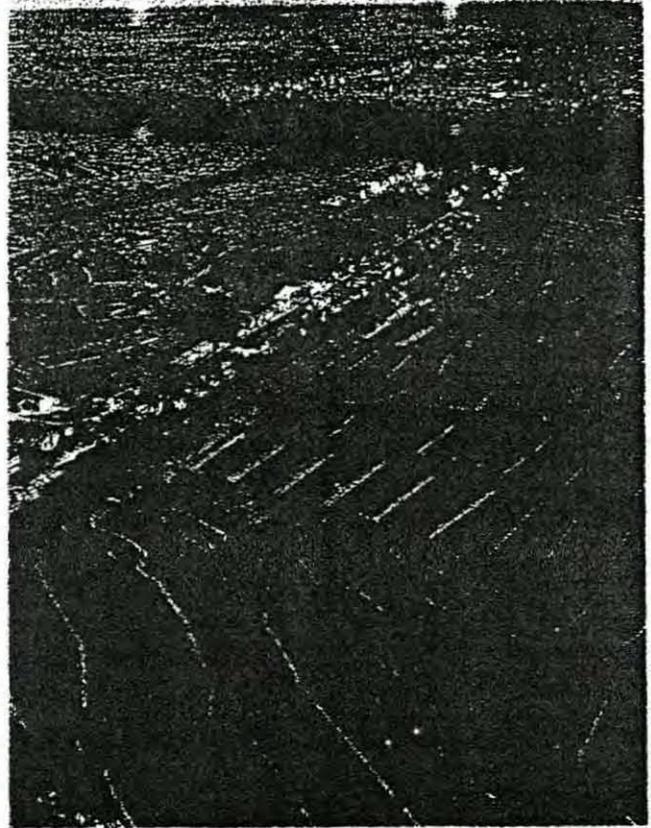


Photo: J-P B

Situation sociale

Les gars de la côte et les femmes de cabanes

■ Répartition des concessionnaires de parcs par âge

. de 18 à 35 ans	22 %
. de 35 à 55 ans	50 %
. + de 55 ans	28 %

■ Les salariés de la conchyliculture

. Ouvriers permanents	
a) inscrits maritimes	761
b) inscrits Mutualité Sociale Agricole	518

total 1279

. Ouvriers saisonniers : le travail saisonnier concerne environ 1500 personnes, dont le temps de travail va de quelques semaines à plusieurs mois.

ANNEXE II : Protocole de purification du parasite *Bonamia ostreae*.

Les tissus infectés, à l'exception du muscle adducteur, sont lavés avec de l'eau de mer filtrée (EMF) additionnée de détergent Tween 80 (qui réduit efficacement les phénomènes d'agrégation, observables notamment en fin de purification dans le gradient de densité de percoll, et qui diminue le rendement de la purification) à la concentration finale de 1% (EMFT), puis broyés dans l'EMFT à l'aide d'un ULTRA-TURRAX qui permet de dissocier tissus et cellules sans altérer les protozoaires.

L'homogénéisat est ensuite filtré sur 300 µm, 60µm puis 25µm pour éliminer les gros débris fibreux.

La suspension est ensuite centrifugée (30mn - 3500 tr - 8°C). Les culots sont repris et lavés avec de l'EMFT, puis homogénéisés de nouveau à l'ULTRA-TURRAX.

Les parasites qui sédimentent avec les noyaux sont alors efficacement séparés de la majorité des éléments cellulaires par une centrifugation différentielle (3500tr - 30mn - 8°C) effectuée dans une solution de sucrose à 20% (p/p dans l'EMFT) correspondant à une pression osmotique d'environ 1600 mOsm.

Pendant cette centrifugation, les parasites sont dans un milieu hypertonique par rapport à leur milieu normal, l'hémolymphe, dont la pression osmotique est similaire à celle de l'EMF (soit 900 - 1000 mOsm). Ce milieu hypertonique pour le parasite doit provoquer une augmentation de sa densité; le culot est remis en suspension progressivement dans l'EMFT. Les parasites subissant alors un choc hypotonique.

Les contaminants - noyaux surtout - sont éliminés par une centrifugation (3500tr - 30mn - 8°C) isopycnique sur un gradient discontinu de sucrose : 20% - 40% p/p dans de l'EMFT.

Les parasites, concentrés à l'interface 20% - 40%, sont prélevés à l'aide d'une seringue à aiguille rôdée, et dilués très lentement afin d'éviter un choc hypotonique avec de l'EMFT vol/vol.

Les parasites ainsi dilués sont de nouveau centrifugés (3500 tr - 30 mn - 8°C) et remis en suspension dans de l'EMFT.

L'étape suivante de purification repose sur une centrifugation isopycnique dans un gradient discontinu de percoll : 30% - 40% - 50% - 60% - 70% vol/vol percoll, NaCl 0,7 M// EMFT.

Les parasites purifiés, localisés aux interfaces 50-60 et 60-70 (la pureté des parasites étant relativement moindre dans la première), sont prélevés et dilués vol/vol dans de l'EMF (sans Tween).

Afin de permettre l'élimination du percoll et de concentrer les parasites, une dernière centrifugation (3500 tr - 30 mn - 8°C) ~~sur~~ sucrose 20% (p/p dans l'EMF) est effectuée.

Le nombre de parasites obtenus est déterminé par comptage.

ANNEXE III : Tampon de Lyse

Tris 0,01M	120 mg
NaCl 0,15M	877 mg
EDTA	29 mg
NP40 0,5%	500µl
H ₂ O qsp	100 ml.

Ajuster le PH à 7,4.

ANNEXE IV : Dosage colorimétrique des protéines par la méthode de Lowry.

Principe :

La méthode de Lowry permet de doser les liaisons amides des protéines et les acides aminés : tyrosine et tryptophane.

Cette méthode (10 fois plus sensible que la technique de Biuret) se caractérise par la formation d'un complexe cuivrique des protéines qui réduit le phosphomolybdate en milieu basique (apparition d'une coloration bleu violacée).

Courbe étalon :

Faire une courbe étalon de 0 à 200mg/ml (0-2-5-10-20-50-100-150-200) de sérum albumine de boeuf en eau distillée. Les résultats sont exprimés en μg équivalent sérum albumine de boeuf par μl .

Solutions des dosages :

- Solution A : Na_2CO_3 à 2% dans NaOH à 4g/l.
- Solution B : CuSO_4 à 1% dans H_2O distillée.
- Solution C : Tartrate de sodium et potassium à 2% dans H_2O distillée.
- Solution D : 19,6 ml de solution A + 200 μl de solution B + 200 μl de solution C.
- Solution E : Réactif de Folin-Ciocalteu dilué au demi en eau distillée.

Mode opératoire :

- mettre dans un tube * 50 μl ou 100 μl de l'extrait,
 - * compléter à 100 μl avec H_2O distillée
 - * 1ml de solution D.
- après 10 minutes à température ambiante, ajouter 100 μl de solution E,
- laisser 1 h 30 mn à température ambiante afin que la coloration atteigne son maximum,
- ajouter 1 ml H_2O ainsi que dans la gamme étalon pour avoir une quantité suffisante,
- s'il se produit un précipité, centrifuger 10 minutes à 3000 g,
- lecture de l'absorbance à 750 nm.

ANNEXE V : Composition des produits nécessaires à l'électrophorèse

TAMPON 1 : Tampon du gel de séparation

- Tris 1,5 M

- SDS 0,4%

Ajuster le pH à 8,8 avec HCl concentré.

Compléter avec H₂O bidistillée.

TAMPON 2 : Tampon du " stacking "

- Tris 1 M

- SDS 0,4%

Ajuster le pH à 8,8 avec HCl concentré.

Compléter avec H₂O bidistillée.

TAMPON 3 : Tampon de migration des plaques

- Tris 0,05 M

- Glycine 28,8g/l

- SDS 0,1%

Compléter avec H₂O bidistillée.

SOLUTION 1 : Acrylamide - Bisacrylamide 30%

- Acrylamide 292 g/l

- Bisacrylamide 8 g/l

Compléter avec H₂O bidistillée.

SOLUTION 2 : Acrylamide 30% dans H₂O bidistillée.

SOLUTION 3 : Bisacrylamide 1% dans H₂O bidistillée.

SOLUTION 4 : Glycérol à 75% dans H₂O bidistillée.

SOLUTION 5 : Persulfate d'ammonium à 10% dans H₂O bidistillée.

Toutes ces solutions sont conservées au congélateur à -20°C après préparation.

ANNEXE VI: Coloration des protéines à l'argent après séparation en SDS-PAGE.

I - FIXATION

1 - 40 % Ethanol, 10 % Acide acétique, 300-400 ml, une nuit.

2 - "Fixing Buffer", préchauffé à 50°C, 12 min.

200 ml de FB :	Sodium thiosulfate	0,1 %	0,4 g
	Sodium acétate	0,3 %	1,2 g
	Ethanol	30 %	120 ml
	Glutaraldéhyde	0,5 %	8 ml
	H ₂ O		272 ml

3 - 10 % Ethanol, 5 % Acide acétique, 2x400 ml, 50°C, 2x8 min.

4 - Eau distillée, 50°C, 2x400 ml = 2x4 min.

II - COLORATION ET DEVELOPPEMENT

1 - 0,4 % Nitrate d'argent, préparé extemporanément, 37°C, 20 min, 13 min.

2 - Eau distillée, T° amb., minimum 2x500 ml = 4x30 sec.

3 - Dans la pénombre : Développeur, T° amb., 6-8 min, à surveiller.

Développeur : 160 µl Formaldéhyde 38 %.
10 g (2,5%) Sodium carbonate.
400 ml H₂O dist.

4 - Background réduire! T° amb., 2x4 min.

BR :	Sodium thiosulfate	10 g
	Trizma hydrochloride	14,8 g
	H ₂ O	400 ml

* le Trizma peut être remplacé par de l'acide acétique glacial (3-7 ml) pour obtenir un pH entre 5 et 6.

5 - Stopper par un bain de glycérol 5% (gels de concentration homogène) à 10% (gradients).

III DECOLORATION

Facultative, si une pellicule argentée se forme sur le gel : gel pas suffisamment rincé après l'AgNO₃, trop de lumière pendant le développement, révélation trop longue...

1 - Solution A :

3,7 g NaCl

3,7 g CuSO₄

85 ml H₂O, la solution est bleu clair. Ajouter de l'ammoniaque jusqu'à ce qu'un précipité épais se forme et se redissolve, ça devient bleu marine. Compléter à 100 ml avec H₂O

ANNEXE VII : Transfert électrophorétique

Mode opératoire :

- Humidifier les plaques de graphite de l'anode et de la cathode avec de l'eau distillée.
- Placer sur la plaque de graphite (côté anode), neuf feuilles de papier filtre humidifiées en tampon de transfert.
- Poser la membrane de nitrate de cellulose puis le gel humidifiés en tampon de transfert.
- Superposer le tout par neuf feuilles de papier filtre humidifiées en tampon de transfert et la seconde plaque de graphite (cathode).
- Brancher l'électrode et la cathode.
- Laisser transférer pendant une heure.

Composition :

Tampon de transfert : - Glycine 39 mM

- Tris 48 mM
- SDS 0,02%
- Méthanol 18% à 20%

Compléter avec H₂O bidistillée.

ANNEXE VIII : Coloration des protéines à l'argent après séparation en SDS-PAGE et transfert sur membrane.

NB : ne pas manipuler les membranes à mains nues : on verra les traces de doigts!

Mettre les membranes à laver dans l'eau distillée, sous agitation, pendant ce temps préparer les solutions suivantes :

* Na_3 citrate 40 % : 600 mg + 1,5 ml H_2O

* $\text{FeSO}_4-7 \text{H}_2\text{O}$ 20 % : 240 mg + 1,2 ml H_2O

* AgNO_3 20 % : 60 mg + 0,3 ml H_2O

* Bien mélanger 27 ml H_2O + 1,5 ml Na_3 citrate 40 % + 1,2 ml $\text{FeSO}_4-7 \text{H}_2\text{O}$ 20 %, puis ajouter en agitant vigoureusement 0,3 ml AgNO_3 20 %. La solution devient brun-vert foncé.

colorer les membranes pendant 5-10 min, en surveillant la coloration, puis laver longuement (1/2h-1h), en changeant le bain d'eau distillée plusieurs fois. Sécher les membranes et les conserver à l'abri de la lumière. On peut recolorer les membranes de la même façon si nécessaire.

ANNEXE IX : Techniques immunologiques de révélation

1. Immunotransfert

Après transfert électrophorétique, la membrane est immergée une heure dans du PBSM - 5% Régilait. Ainsi saturé, la membrane de nitrocellulose est découpée en bandelettes, ces dernières sont individuellement incubées (2 heures à température ambiante ou 1 nuit à 4°C) en présence de différents anticorps dilués en PBS - 5% Régilait - 0,05% Tween20.

Trois opérations de lavages (PBS - 0,5% Régilait - 0,05% Tween) précèdent l'incubation du conjugué (Anti-Ig de lapin ou Anti-Ig de souris, couplés à la peroxydase) dilué au 1/500ème pendant une heure. Après une heure d'incubation à l'obscurité, trois lavages sont effectués dont le dernier en PBS.

L'activité peroxydasique est révélée par le 3,3' Diaminobenzidine tertahydrochloride dilué à 0,05% en PBS et en présence de 0,3% de H₂O₂.

Les différentes étapes sont réalisées à température ambiante et sous agitation.

2. Révélation des glycoprotéines

Après transfert électrophorétique, la membrane est immergée pendant une heure à 47°C en PBS - 5% Tween. Ainsi saturée, la membrane est lavée une fois en PBS, puis elle est incubée 30 minutes en PBS additionné de 0,5 mg par ml de Concanavaleine A (Con A), à température ambiante.

Au terme de trois lavages en PBS, la membrane est placée 30 minutes en PBS - 0,25 mg par ml de peroxydase, à température ambiante.

Après trois nouveaux lavages, l'activité peroxydasique est révélée par le 3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride dilué à 0,05% en PBS et en présence de 0,3% d'H₂O₂.

Les différentes étapes sont réalisées sous agitation.