

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



Ifremer

KERDUDOU Nolwenn

Rapport de stage réalisé du 23 octobre 2000 au 26 Janvier 2001
Sous la responsabilité de Nathalie Cochenec
Au laboratoire de pathologie l'Ifremer de La Tremblade

**Mise au point d'outils moléculaires pour
le diagnostic des parasites de type
« Mikrocells » chez l'huître.**

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Nathalie Cochenec de m'avoir permis de réaliser ce stage et de m'avoir suivi au long de ces trois mois, pour sa patience, sa gentillesse et sa bonne humeur.

Je remercie également Monsieur André Gérard, responsable du laboratoire, pour son accueil au sein d'IFREMER.

Je remercie tous ceux qui m'ont si gentiment aidé lors de mes manipulations : M. Robert, F. Leroux, T. Renault, I. Arzul...

Et enfin tous ceux que j'ai oubliés de citer mais qui m'ont permis de passer ce stage dans une bonne humeur permanente.



ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

ARN : Acide Ribo Nucléique

BBY : Bismarck Brown Yellow

BET : Bromure d'ETHidium

β-ME : β-MercaptoEthanol

dNTP : 3' désoxyribo nucléotide 5'-triphosphate

dUTP : 3' désoxyribo uracile 5'-triphosphate

HIS : Hybridation *In Situ*

ITS : Inter Transcriptionnal Spacer

pb : paire de base

PCR : Polymérase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

RLFP : Restriction Length Fragment Restriction

rpm : rotations par minute

RNase : Ribo Nucléase

trs/min : tours par minute

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
RAPPELS SUR LES PARASITES ETUDIES	3
I. <i>Bonamia ostreae</i>	5
II. <i>Bonamia</i> sp	7
III. <i>Mikrocytos roughleyi</i>	9
IV. <i>Mikrocytos mackini</i>	11
MATERIEL ET METHODES	13
I. Extraction d'ADN génomique	14
II. Réaction de Polymérisation en Chaîne (P.C.R.)	16
III. Clonage	19
IV. Hybridation <i>In Situ</i> (HIS)	24
RESULTATS	27
I. Séquençage de la partie terminale du gène 18S de <i>Mikrocytos roughleyi</i> .	28
II. Diagnostic différentiel de <i>B.ostreae</i> , <i>B.sp</i> , et <i>M.roughleyi</i> .	31
III. Mise au point d'une sonde spécifique de <i>Bonamia</i> sp.	33
IV. Etude du gène 18S du parasite <i>Mikrocytos mackini</i> .	37
DISCUSSION/CONCLUSION	40
BIBLIOGRAPHIE	43
ANNEXES	44

Introduction

L'ostréiculture représente une part importante de l'aquaculture française avec une production d'environ 150 000 tonnes par an, classant la France au troisième rang mondial derrière le Japon et la Corée du Sud. Cependant, l'ostréiculture est une activité fragile qui subit régulièrement des épizooties difficiles à combattre. Comparativement aux mortalités d'origine non infectieuse, dont les causes sont mal définies mais dont l'impact sur les cheptels est généralement limité quantitativement et géographiquement, de très nombreux cas de mortalité massive à caractère épidémique ou endémique ont été observés parallèlement à la mise en évidence d'agents infectieux. Des virus, des procaryotes et des parasites métazoaires et protozoaires ont été identifiés, révélant progressivement la diversité étiologique des maladies infectieuses chez les mollusques bivalves.

En 1979, l'apparition de *Bonamia ostreae*, parasite intrahémocytaire d'*Ostrea edulis*, a entraîné la chute de la production d'huître plate française qui, aujourd'hui, ne représente plus que 1800 tonnes par an contre 150 000 tonnes en 1960. Le genre *Bonamia* regroupe deux espèces *B.ostreae* et *B.sp.* Cette dernière espèce parasite les huîtres australiennes *Ostrea angasi*, et l'huître plate de Nouvelle-Zélande *Tiostrea chilensis*.

Dans les années 1950, des protozoaires associés à des mortalités de mollusques de la famille des Crassostréidés, ont été identifiés. Ils ont longtemps été désignés sous le nom de « mikrocells », avant d'être replacés dans un nouveau genre : *Mikrocytos* (décrit à la suite d'études plus approfondies de mortalités apparues au Canada et en Australie par Farley en 1988). Deux espèces ont été identifiées, *M.mackini* et *M.roughleyi*, respectivement décrites pour la première fois par Mackini (1963) et Roughley (1926) chez *Crassostrea gigas* et *Saccostrea commercialis*.

L'identification de ces différentes espèces reposait jusqu'alors sur des observations en microscopie photonique et électronique et donc étaient basées sur des critères morphologiques et ultrastructuraux tels que la taille, la position du noyau et la forme des organites intracellulaires de type « haplosporosome » et/ou corps denses. Pour le genre *Bonamia*, plusieurs classifications se sont succédées. En 1980 Levine les classe dans le phylum des *Ascetospora* et la classe des *Paramyxia*. En 1988 Perkins révisé cette classification sur la base des propositions de Corliss et remplace le genre *Bonamia* dans la classe des *Haplosporida* au côté du genre *Haplosporidium*. En revanche le genre *Mikrocytos* n'a pu être classé. Ces études controversées soulignent les limites des seuls critères morphologiques et ultrastructuraux en taxonomie. La biologie moléculaire semble pouvoir compléter ces analyses par l'étude, par

exemple, de gènes d'intérêt phylogénique et en particulier le gène 18S qui code pour la petite sous unité ribosomiale.

En ce qui concerne le diagnostic de ces différents parasites, pour *B.ostreae*, il a progressivement été simplifié en substituant l'examen de coupes histologiques par celui de frottis. Ces derniers pouvant être préparés à partir de biopsies cardiaques. Cependant ces techniques restent relativement lourdes à mettre en œuvre et inadéquates pour quantifier les infections. C'est pourquoi, des techniques complémentaires d'identification et de diagnostic apparaissent nécessaires, en particulier ces techniques pourraient être utilisées pour aborder la recherche d'hôtes intermédiaires qui ont été suspectés par le Dr.Hine (com.pers) : celui-ci ayant observé des protozoaires ressemblant à *Bonamia* sp chez des mollusques sympatriques de *T.chilensis*.

Au cours de ce stage, trois parasites ont été étudiés : *Bonamia* sp, *Mikrocytos roughleyi*, et *Mikrocytos mackini*. Les expériences réalisées s'intègrent dans le projet de recherche du laboratoire qui consiste à séquencer le gène 18S de ces trois parasites et à mettre au point par la suite des outils moléculaires de diagnostic (PCR, Hybridation *In Situ*).

Pour ma part, j'ai donc complété les travaux de recherche en cours sur le séquençage du gène 18S du parasite *M.roughleyi* afin de comparer cette séquence à celles déjà obtenues des gènes 18S des parasites *B.ostreae* et *B.sp*.

J'ai réalisé un travail identique pour le parasite *M.mackini* : taxonomiquement cette espèce n'est pour l'instant pas rapprochée à d'autres espèces de parasites connus.

Les sondes d'hybridation *in situ* utilisées actuellement pour *Bonamia ostreae* et sp sont des sondes de genre. Nous avons tenté de mettre au point une sonde spécifique de l'espèce *B.sp*.

RAPPELS SUR
LES PARASITES
ÉTUDIÉS.

Les quatre espèces étudiées sont *Bonamia ostreae*, *Bonamia* sp, *Mikrocytos roughleyi* et *Mikrocytos mackini*. Ce sont des parasites du type « mikrocell » affectant les espèces d'huîtres suivantes : *Ostrea edulis*, *O. angasi*, *Tiostrea chilensis*, *Saccostrea commercialis*, et *Crassostrea gigas*.

Ils sont présents dans différentes zones du globe (document 01).



Document 01 : Répartition géographique par espèce des parasites du type « mikrocell ».

Ces parasites font partie du phylum des *Alveolata* dans la famille des *Haplosporida*.

Haplosporida

⊗ *Bonamia*

Bonamia ostreae

Bonamia sp

⊗ *Haplosporidiidae*

• *Haplosporidium*

Haplosporidium costale

Haplosporidium louisiana

Haplosporidium nelsoni

• *Michinia*

Michinia teredinis

⊗ *Urosporidium*

Urosporidium crescens

Les connaissances actuelles des espèces *Mikrocytos roughleyi* et *mackini* ne permettent pas pour l'instant de les insérer dans une classification taxonomique.

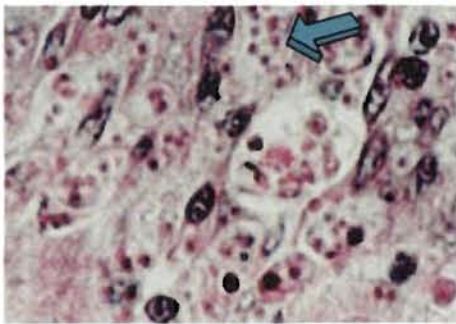
I. *BONAMIA OSTREAE*

Nom de la maladie :

La bonamiose, maladie hémocytaire de l'huître plate.

Nom scientifique ou affiliation taxonomique :

Bonamia ostreae (Haplosporidia).



Coupe histologique d'un tissu d'huître parasité par *Bonamia ostreae* ($\times 1000$). La flèche met en évidence un hémocyte infecté.

Distribution géographique :

Ce parasite se trouve en Europe (le long de la côte d'Espagne au Danemark, en Irlande, en Grande Bretagne (à l'exclusion de l'Ecosse), sur la côte ouest (la Californie et l'état de Washington) et la côte est (Maine) des Etats-Unis.

Espèces hôtes :

L'huître plate *Ostrea edulis* est l'hôte naturel. Expérimentalement les espèces *Ostrea angasi* et *Tiostrea chilensis* (= *Tiostrea lutaria*) ont pu être infectées. Les huîtres creuses *Crassostrea gigas* n'ont pas pu être infectées expérimentalement. Des observations de « mikrocells » dans les cellules vésiculaires de tissu conjonctif d'*Ostrea conchaphila* dans l'Oregon aux Etats-Unis ont été spéculées pour être des parasites *B.ostreae* (Farley *et al* 1988). Cependant, Eltson (1990) a indiqué que bien que les expériences suggèrent que *O.conchaphila* puisse contracter la maladie, l'infection n'a pas été franchement démontrée.

Impact sur l'hôte :

Bien que beaucoup d'huîtres infectées semblent macroscopiquement normales, d'autres peuvent avoir une décoloration jaune et/ou des lésions étendues (c'est à dire des ulcères perforés) sur les branchies et le manteau. La pathologie réelle semble être corrélée avec la destruction des hémocytes due à la prolifération des parasites de *B.ostreae*. Les lésions se produisent dans les tissus conjonctifs des branchies, et du manteau. Bien que quelques

huîtres plates meurent avec des infections légères, d'autres succombent à des infections beaucoup plus lourdes. Dans une étude, la présence de *B.ostreae* a été liée à la taille plus qu'à l'âge de l'huître et le niveau d'infection était statistiquement indépendant du stade de développement gonadal (Caceres-Martinez *et al.* 1995). *B.ostreae*, en même temps qu'une épizootie provoquée par *Martelia refringens*, a causé une baisse importante de la production française d'*O.edulis* qui est passée de 20000 tonnes par an dans les années 70 à 1800 tonnes en 1995 (Boudry *et al* 1996).

Technique de diagnostic :

Histologie : examen de sections transversales d'huîtres. Les parasites *B.ostreae* sont distribués systématiquement dans tout l'organisme dans le cas des infections avancées. Pour des infections plus faibles, on observe souvent des parasites dans les hémocytes, associés à des infiltrations du tissu conjonctif des branchies et du manteau, et dans les sinus vasculaires autour de l'estomac et de l'intestin.

Méthodes de contrôle :

Il est important de s'assurer qu'aucune huître plate ayant vécu dans des zones où la bonamiose est décrite, ne soit importée vers une zone saine. Si des animaux infectés sont mis en contact avec une population saine, des mortalités élevées peuvent survenir pendant plusieurs années. Les régions en eau profonde, sont moins sévèrement affectées que les zones intertidales. Quelques huîtres parasitées des zones endémiques peuvent être asymptomatiques et donc difficilement diagnostiquées par les techniques actuellement utilisées.

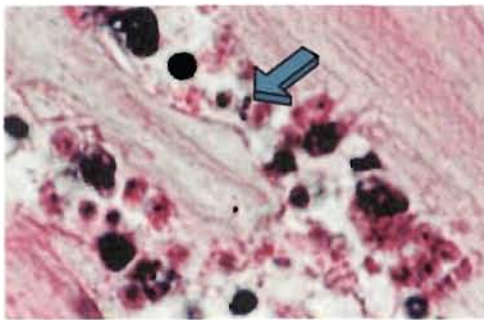
II. *Bonamia* sp

Nom de la maladie :

La bonamiose, maladie hémocytaire des huîtres.

Nom scientifique ou affiliation taxonomique :

L'espèce *Bonamia* sp est actuellement distinguée de l'espèce *Bonamia ostreae*.



Coupe histologique d'un tissu d'huître parasité par *Bonamia* sp ($\times 1000$). La flèche met en évidence trois de ces parasites, libres dans les tissus.

Distribution géographique :

- Détroit de Foveaux et d'autres emplacements au sud de la Nouvelle Zélande.
- Lac Victoria et la Tasmanie, en Australie.

Espèces hôtes :

- *Tiostrea chilensis* (= *Tiostrea lutaria*) en Nouvelle Zélande
- *Ostrea angasi* en Australie.

Impact sur l'hôte :

Comme pour *B.ostreae*, ce protozoaire intrahémocytaire devient rapidement systémique avec des nombres importants de parasites coïncidant avec la mort de l'huître. Des mortalités de grande puissance de l'huître indigène de drague (91% entre 1975 et 1992 dans le détroit de Foveaux en Nouvelle Zélande) ont été attribuées à ce parasite. Il y a une variation saisonnière de l'infection avec les plus hautes prévalences durant l'automne austral (avril).

Technique de diagnostic :

Histologie : examen de sections transversales d'huîtres. Les parasites sont distribués systématiquement dans des infections avancées. Dans des infections moins avancées *B.sp* est souvent observé dans les hémocytes, dans des infiltrations localisées dans le tissu conjonctif des branchies et du manteau, et dans les sinus veineux autour de l'estomac et de l'intestin.

Méthodes de contrôle :

Jusqu'ici il n'y a aucune procédure connue d'éradication ou de contrôle. Jusqu'à ce que les modes de transmission et la spécificité de l'hôte de ce parasite ne soit déterminés par des études approfondies, les mouvements de *T.chilensis*, hors des zones endémiques, devraient être évités.

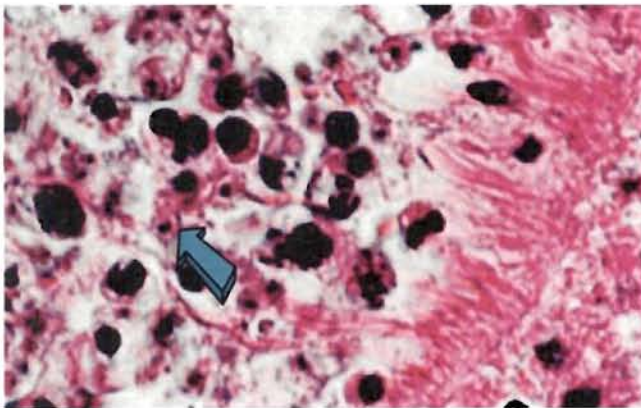
III. MIKROCYTOS ROUGHLEYI

Nom commun de la maladie :

« Winter mortalities »

Nom scientifique ou affiliation taxonomique :

Mikrocytos roughleyi, avec des affinités taxonomiques incertaines.



Coupe histologique d'un tissu d'huître parasité par *M.roughleyi* ($\times 1000$). La flèche met en évidence un de ces parasites, libre dans les tissus.

Distribution géographique :

La Nouvelle-Galle du Sud, en Australie.

Espèce d'hôte :

Saccostrea commercialis (Sydney Rock Oyster).

Impact sur l'hôte :

Une infection intracellulaire systémique des hémocytes est associée à des lésions de type « abcès » dans les branchies. La maladie est associée à des basses températures et à des salinités élevées (30-35 ppt). Elle peut détruire jusqu'à 70% des huîtres avant leur troisième hiver.

Techniques de diagnostic :

Observations macroscopiques : la maladie se caractérise par des ulcérations et/ou des abcès dans les gonades, le manteau (fréquemment près du muscle adducteur) et les branchies, et par une altération de la contraction du muscle adducteur.

Histologie : les abcès contiennent de petits organismes intracellulaires. Quelques parasites ont une vacuole cytoplasmique qui déplace le noyau vers la périphérie de la cellule.

Méthodes de contrôle :

Les huîtres des zones infectées (actuelles ou historiquement) ne devraient pas être déplacées vers des zones saines de *M.roughleyi*.

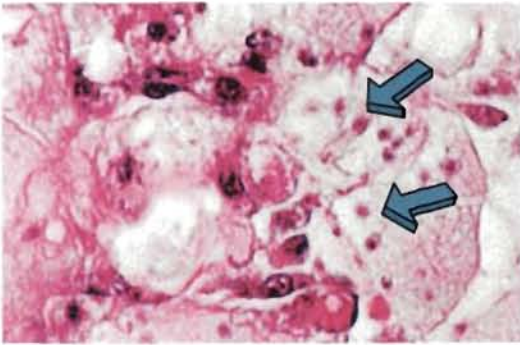
IV. MIKROCYTOS MACKINI

Nom commun de la maladie :

La maladie de l'île de Denman.

Nom scientifique ou affiliation taxonomique :

Mikrocytos mackini, de taxonomie incertaine.



Coupe histologique d'un tissu d'huître parasité par *M.mackini* ($\times 1000$). Les flèches mettent en évidence deux parasites intracellulaires.

Distribution géographique :

Sur la côte occidentale canadienne, probablement omniprésente dans l'ensemble du détroit de la Géorgie et confiné à d'autres localités spécifiques autour de l'île de Vancouver.

Espèces hôtes :

Crassostrea gigas et *Ostrea conchaphila* (= *Ostrea lurida*) sont infectées naturellement. *Ostrea virginica* et *Ostrea edulis* ont pu être infectées expérimentalement.

Impact sur l'hôte :

Il est possible d'observer une infection intracellulaire des cellules vésiculaires du tissu conjonctif qui a pour conséquence une infiltration hémocytaire et une nécrose des tissus. Des infections graves semblent être limitées à des huîtres âgées (2 ans) et les mortalités se produisent principalement en avril et mai après une période de 3 à 4 mois où les températures sont en dessous de 10°C.

Technique de diagnostic :

Observations macroscopiques : il est possible d'observer la présence de pustules vertes de plus de 5 millimètres de diamètre, à la surface des palpes labiaux ou du manteau. Souvent une cicatrice brune est observée à la surface du manteau.

Histologie : un examen en microscopie photonique à fort grossissement ($\times 1000$) des cellules vésiculaires du tissu conjonctif immédiatement à côté de l'abcès permet de détecter la présence de parasites intracellulaires de 2 ou 3 μm de diamètre. On a également observé ce parasite dans des cellules musculaires et de temps en temps dans les hémocytes.

Microscopie électronique : la morphologie ultrastructurale différencie *M.mackini* des espèces de *Bonamia* du fait que le nucléosome de *M.mackini* est situé vers le centre du noyau tandis que chez *B.ostreae* il a un emplacement excentrique. De plus, il y a absence de mitochondries chez *M.mackini*.

Méthodes de contrôle :

Les huîtres des zones infectées (actuelles ou historiquement) ne devraient pas être déplacées vers des zones où la maladie n'a pas été observée. L'effet de la maladie sur les populations infectées peut être réduit à un niveau moindre en récoltant ou en déplaçant les huîtres âgées vers des emplacements plus haut dans la zone intertidale avant mars et en ne redéplaçant ces huîtres à des niveaux plus bas qu'en juin.

MATÉRIEL
ET
MÉTHODES

I. EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE

I.A. A PARTIR DE BIOPSIES D'HUITRE CONSERVEES DANS DE L'ALCOOL.

Principe :

L'ADN est extrait à partir de tissus d'huître parasitée, conservés dans de l'alcool à 95°. Le degré d'infection est préalablement déterminé par une observation de coupe histologique au microscope photonique. Les tissus les plus parasités sont sélectionnés pour l'extraction.


L'ADN extrait n'est pas purifié, il comportera donc de l'ADN d'huître et de l'ADN de parasite.

1. Lyse des tissus.

L'échantillon est déposé dans 800µl de tampon de lyse et 10µl de protéinase K (10 mg/ml) et laissé une nuit au bain-marie à 37°C. Le lendemain 10 µl de protéinase K sont rajoutés dans les tubes. Ils sont replacés au bain-marie à 37°C pendant une heure.

2. Elimination des débris organiques.

Chaque tube est séparé en deux fois 400µl. Puis, sont ajoutés 400µl de phénol pour déprotéiniser et 400µl de chloroforme isoamylalcool (l'isoamylalcool agit comme un anti-moussant et favorise la séparation de la phase aqueuse déprotéinisée). Le mélange est passé au vortex puis centrifugé 10 minutes à 4°C à 10000 trs/min.

 *Le phénol et le chloroforme sont à manipuler sous une hotte aspirante avec des gants en nitrile car ce sont des produits toxiques.*

3. Précipitation de l'ADN.

La phase aqueuse, contenant l'ADN, est récupérée. La différenciation des deux phases est facilitée par l'utilisation de chloroforme isoamylalcool coloré en rose, la phase aqueuse étant incolore. Dans chaque tube est ensuite ajouté 40µl d'acétate de sodium de concentration 3M puis 800µl d'éthanol absolu. Le mélange est passé au vortex puis laissé une heure à -80°C afin que l'ADN précipite. Les tubes sont alors centrifugés 10 minutes à 4°C à 10000 trs/min, et le surnageant est éliminé avec précaution pour ne pas décoller le culot qui contient l'ADN. Le culot est lavé avec 400µl d'éthanol à 70° et le tout est centrifugé 10 minutes à 4°C à 10000 trs/min. Le surnageant est à nouveau éliminé et le culot est mis à sécher sous une hotte aspirante.

4. Elimination de l'ARN.

Le culot est repris dans 50µl d'eau bidistillée, 1µl de RNase de concentration 10mg/ml est ajouté et les tubes sont incubés 35 minutes au bain-marie à 37°C. Ce temps ne doit pas être dépassé sinon la RNase risque de dégrader l'ADN.

5. Elimination des débris organiques.

Une fois l'ARN dégradé, les étapes d'élimination des déchets organiques sont renouvelées. Il faut donc ajouter 50µl de phénol et 50µl de chloroforme isoamylalcool, vortexer les tubes quelques secondes, puis les centrifuger 10 minutes à 4°C à 10000 trs/min.

6. Précipitation de l'ADN.

La phase aqueuse est récupérée, puis 5µl d'acétate de sodium de concentration 3M et 100µl d'éthanol absolu sont ajoutés. Les tubes sont vortexés quelques secondes et laissés une heure à -80°C. Après avoir été centrifugé 10 minutes à 4°C à 10000 trs/min, le surnageant est éliminé. Le culot est lavé avec 200µl d'éthanol à 70°. Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 4°C à 10000 trs/min et le surnageant est à nouveau éliminé. Le culot est mis à sécher sous une hotte aspirante puis repris dans 50µl d'eau bidistillée.

Les échantillons sont conservés à 4°C.

I.B. A PARTIR D'UNE COUPE HISTOLOGIQUE D'UN BLOC DE PARAFFINE.

Principe :

Cette méthode permet d'obtenir un extrait d'ADN à partir d'un échantillon de tissus fixés inclus dans un bloc de paraffine.

A partir de ce bloc, des coupes épaisses de 7µm sont réalisées puis mises dans un tube de type eppendorf.

Afin de déparaffiner l'échantillon, 500µl de xylène sont ajoutés et laissés 15 à 30 minutes.

 *Le xylène est un produit très toxique, il faut le manipuler sous une hotte aspirante avec des gants en nitrile.*

Le tube est centrifugé 10 minutes à 10000 trs/min. Le surnageant est enlevé. Ces opérations sont réalisées une deuxième fois.

Ensuite, 500µl d'éthanol absolu sont ajoutés et laissés 5 minutes. Le tube est centrifugé 10 minutes à 10000 trs/min. Le surnageant est enlevé. Ces opérations sont réalisées une deuxième fois.

Le tube est séché sous vide, puis 100µl de tampon d'extraction 1X (annexe 01) additionné d'1 µl de protéinase K (10mg/ml) sont ajoutés. Le tube est laissé une nuit à 37 °C.

Le lendemain, le tube est mis 10 minutes à 95 °C, puis une PCR est réalisée avec plusieurs concentration d'ADN. Les échantillons sont conservés à -20°C.

II. REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE

Principe :

La réaction de polymérisation en chaîne ou Polymerase Chain Reaction (PCR) est une technique permettant l'amplification *in vitro* d'ADN. Une enzyme polymérase thermostable (résistante à une température de 95°C) de la bactérie *Thermus aquaticus*, la Taq polymérase, est utilisée pour catalyser la croissance de la chaîne à partir d'amorces d'ADN. Les amorces, correspondant à des brins opposés, sont allongées dans la direction l'une de l'autre. Lorsque la réplication du segment compris entre les deux amorces est terminée (= un cycle), les deux duplex formés sont dénaturés par la chaleur pour produire des matrices monocaténaïres et un second cycle de réplication est effectué en abaissant la température en présence de tous les composants requis pour la polymérisation. La répétition des cycles de synthèse et de dénaturation entraîne un accroissement exponentiel du nombre de fragments répliqués. Ainsi de très petites quantités d'ADN sont requises comme matrice et suffisamment d'ADN est amplifié pour qu'une bande visible sur gel soit obtenue.

II.1. Réactifs.

PRODUITS	QUANTITE POUR 1 TUBE
MgCl ₂ (50mM)	2,5 µl
Tampon 10X	5 µl
dNTP (2mM)	5 µl
Amorces (0,1nmol/µl)	0,5 µl de chaque
Taq (5u/µl)	0,5 µl
ADN	1 µl
H ₂ O	35 µl (qsp 50 µl)

La composition des solutions est en annexe 01.

II.2. Etapes.

L'ADN matrice est tout d'abord dénaturé 3 minutes à 94°C, puis le cycle suivant est répété 40 fois :

- Dénaturation de 1 minute à 94°C,
- Hybridation des amorces sur les matrices monocaténaïres pendant 1 minutes de 45 à 55 °C selon la composition en bases nucléotidiques des amorces utilisées,
- Elongation, par la Taq polymérase, 1 minute à 72°C (température optimale d'activité pour cette enzyme).

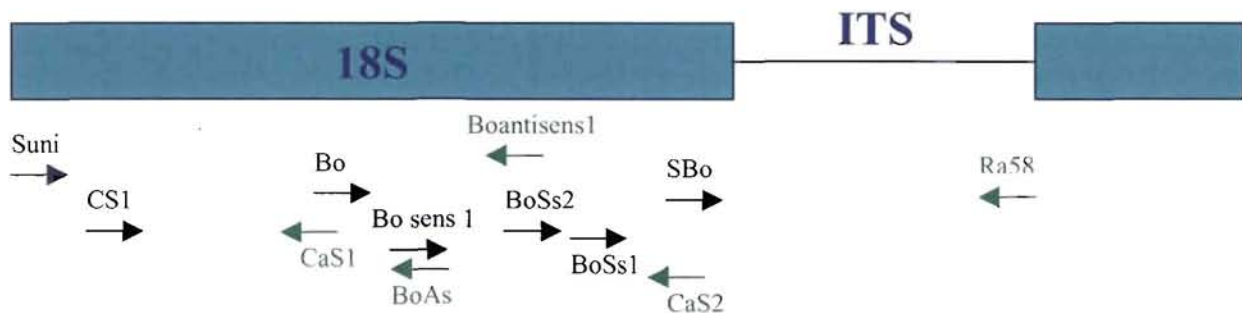
Une élongation finale de 10 minutes à 72°C permet à la polymérase de terminer la synthèse de tous les nouveaux brins d'ADN. Les échantillons sont conservés à 4°C.

Pour chaque PCR un témoin négatif contenant tous les réactifs mais pas d'ADN matrice, est réalisé. Ce contrôle est indispensable pour l'interprétation des résultats. On peut également faire un témoin positif avec un ADN dont on est certain d'obtenir une bande de taille connue.

II.3. Amorces utilisées.

L'ADN extrait n'étant pas purifié, pour permettre l'amplification uniquement de l'ADN du parasite, il faut associer de préférence une amorce spécifique (portion d'ADN parasitaire connue) et une amorce universelle (portion conservée du gène 18S de tous les organismes). Si la séquence est parfaitement connue, on peut associer deux amorces spécifiques. L'utilisation de deux amorces universelles ne permet, la plupart du temps, que d'amplifier de l'ADN d'huître.

Représentation schématique de la position et de l'orientation des différentes amorces : les amorces sens sont représentées en bleu et les amorces antisens en vert.



Le gène 18S est composé de segments conservés et de segments variables. Les amorces situées dans les zones conservées amplifient une portion du gène chez tous les organismes. Les amorces situées dans les zones variables sont spécifiques de genre et/ou d'espèces.

Amorces universelles (dans le sens 5'→3') :

Suni : CAA CCT GGT TGA TCC TGC C
 CS1 : GTA ACG GGG AAT CAG GGT TCG
 CaS2 : ACG GGC GGT GTG TAC AAA GG
 Ra58 : CGC ATT TCG CTG CGT TCT TC
 ITS 2.1 : CGT AGG TGA ACC TGC GAA GGA TC

F1 : GTT CTT TCW TGA TTC TAT GMA (W = A ou T/U), (M = A ou C)

R1 : CTC AWK CTT CCA TCT GCT G (K = G ou T/U)

(R1 et F1 sont des amorces universelles du genre *Haplosporidium* s'hybridant sur le parasite *Mikrocytos mackini*).

Amorces spécifiques de *Bonamia* (5'→3') :

Bo : CCA TTT ATT TGG TCG GGC CGC

BoAs : TCT GAT CGT CTT CGA TCC CC

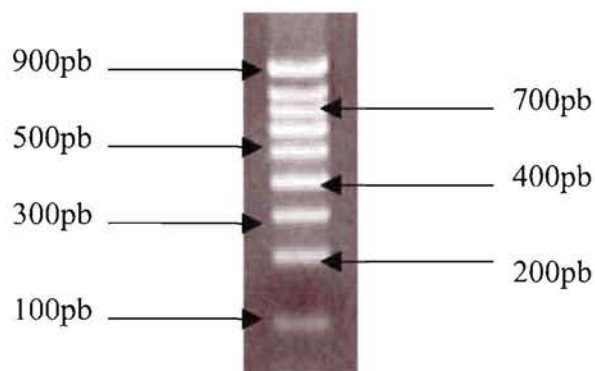
BoSs2 : TAA CTA GCC GGC GCT AAC CC

BoSs1 : GTA ATC TTC AAC GCG CAC CC

II.4. Analyse des produits amplifiés.

Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 ou 2% (annexe 01). La concentration du gel est choisie en fonction de la taille du segment amplifié attendue.

Le marqueur de taille utilisé est le Ladder 100 qui permet d'obtenir une bande tous les 100pb et cela de 100pb à 900pb.



⚠ Le gel d'agarose contient du Bromure d'Ethidium. Ce composé s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN. Il faut donc porter obligatoirement des gants en nitrile car ce produit est cancérigène. Il faut également se protéger des UV.

II.5. La technique de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Cette technique est basée sur l'utilisation d'enzymes de restriction qui permettent de couper de manière spécifique les séquences d'ADN. Les produits de PCR sont digérés avec des enzymes de restriction choisies.

PRODUITS	QUANTITE POUR 1 TUBE
Produit de PCR	5µl
Enzyme de restriction	1µl
Tampon de l'enzyme (10X)	2µl
H ₂ O	qsp 20µl

Le mélange est incubé 1H30 à 37°C, puis 4µL de bleu de charge sont ajoutés. Celui-ci contenant de l'EDTA, stoppe l'action de l'enzyme. On fait ensuite migrer les produits de digestion sur gel d'agarose à 2%.

III. CLONAGE

Principe :

La connaissance du génome d'un organisme n'est possible que par l'analyse de petits fragments étudiés individuellement. Ainsi le clonage permet l'insertion d'un fragment d'ADN dans un élément génétique capable d'autoréplication, nommé vecteur, ce sont ensuite des bactéries qui servent d'hôtes pour l'amplification. Le clonage est donc constitué de deux étapes.

La première étape est une ligation du fragment d'ADN à étudier dans un plasmide (vecteur), possédant un site d'insertion du fragment situé au niveau de marqueurs. Ce plasmide comporte généralement deux types de marqueurs. Un marqueur de sélection, qui est souvent un gène de résistance à un antibiotique, qui permet de différencier les bactéries ayant intégré le plasmide des bactéries ne l'ayant pas intégré. Et un marqueur de recombinaison, concernant un gène codant pour une partie ou une enzyme entière capable de dégrader un sucre comme le X-Gal, qui permet d'identifier les bactéries ayant intégré le plasmide recombiné par rapport aux bactéries ayant intégré un plasmide non recombiné après étalement sur milieu gélosé.

La deuxième étape est une transformation bactérienne qui consiste à insérer le plasmide dans des bactéries dites « compétentes » (aptées à recevoir le vecteur). En se multipliant les bactéries multiplient aussi le plasmide. Il suffit ensuite de sélectionner les bactéries transformées puis d'en extraire l'ADN plasmidique.

III.A. LA LIGATION.

La ligation se fait à partir d'un produit de PCR frais qui va s'insérer au niveau d'un gène codant pour une enzyme responsable de la dégradation du X-Gal.

Pour cette manipulation, ainsi que pour la transformation, c'est le TA Cloning[®] Kit Dual Promoter Version D de Invitrogen[®] qui a été utilisé (annexe 02).

Réaction de ligation :

PRODUITS	QUANTITE POUR 1 TUBE
Produit de PCR frais	2 μ l
Tampon de ligation 10 X	1 μ l
Plasmide PCR [®] II vector (25ng/ μ l)	2 μ l
Eau stérile (qsp 9 μ l)	4 μ l
T4 DNA Ligase (4u/ μ l)	1 μ l
<hr/> Volume total	<hr/> 10 μ l

La composition du tampon de ligation est en annexe 01.

La réaction de ligation est incubée à 14°C pendant toute une nuit afin que l'enzyme agisse. Le produit de ligation est conservé à -20°C si la transformation n'a pas lieu aussitôt.

III.B. TRANSFORMATION.

Les tubes de ligation sont centrifugés rapidement et placés sur la glace.

1. La transformation.

Le β -MercaptoEthanol (β -ME) et les bactéries compétentes (One Shot[®] Cells INV α F'), conservés à -80°C sont décongelés sur un lit de glace. Il faut prendre un tube de bactéries compétentes par tube de réaction de ligation. Le milieu de culture SOC Medium (annexe 01), conservé lui aussi à -80°C est mis à température ambiante.

Dans chaque tube de bactéries, $2\mu\text{l}$ de β -ME sont ajoutés afin de former des pores dans la paroi des bactéries. Ensuite $2\mu\text{l}$ de mélange de ligation sont ajoutés (remettre aussitôt le mélange à -20°C). Les tubes sont incubés 30 minutes dans la glace, les plasmides se « collent » aux bactéries.

Chaque solution est mélangée doucement à l'aide d'un cône, il ne faut surtout pas aspirer puis refouler pour ne pas abîmer les bactéries.

Afin de faire pénétrer le plasmide dans la bactérie, un choc thermique de 30 secondes dans un bain-marie à 42°C est effectué, les tubes sont remis aussitôt dans la glace pendant au moins 2 à 3 minutes.

2. Mise en culture.

Les bactéries ainsi transformées sont mises en culture dans $250\mu\text{l}$ de SOC Medium et incubées une heure à 37°C sous agitation à 225 rpm. Ceci permet à la bactérie de se remettre rapidement en activité.

3. Ensemencement sur boîte de Pétri.

Les bactéries sont ensemencées sur un milieu LB solide additionné d'ampicilline (50mg/ml) ainsi que de $40\mu\text{l}$ de X-Gal (50mg/ml) (ajouté au dernier moment). Par boîte, $100\mu\text{l}$ de bactéries sont ensemencés par la méthode du râteau. Les boîtes sont mises à incuber toute la nuit à 37°C , puis quelques heures à 4°C afin que la coloration des colonies apparaisse complètement.

	Ampicilline	Lactose	Colonies
Bactéries sans plasmide	Non résistantes	Non dégradé	Aucune
Bactéries + plasmides non recombinés	Résistantes	Dégradé	Bleues
Bactéries + plasmides recombinés	Résistantes	Non dégradé	Blanches

4. Repiquage.

Les colonies blanches à prélever sont repérées et repiquées sur une boîte de Pétri quadrillée. Une PCR est réalisée en parallèle afin de vérifier si le plasmide contient le fragment attendu. Les boîtes quadrillées sont incubées une nuit à 37°C, les autres sont conservées à 4°C. Les colonies dont les clones ont intégré le bon fragment sont mises en culture dans 2 ml de milieu LB liquide additionné d'ampicilline et incubées toute la nuit à 37°C sous agitation rapide.

III.C. EXTRACTION PLASMIDIQUE.

Ce protocole a été élaboré pour des plasmides dont l'ADN a été intégré par des bactéries appartenant à *Escherichia coli*. La mini-purification des plasmides est réalisée grâce au kit commercialisé par QIAGEN.

Les milieux de culture sont transvasés dans des tubes de type eppendorf et centrifugés 5 minutes à 12000 trs/min. Le surnageant est jeté dans l'eau de Javel.

La composition des différentes solutions du kit est en annexe 01.

1. Remise en suspension des bactéries.

Après avoir ajouté la RNase à la solution P1, le culot de bactéries est remis en suspension par aspiration - refoulement à l'aide de la pipette avec 300 µl de P1. Ce tampon contenant du Tris et de l'EDTA fragilise les parois cellulaires.

2. Lyse des cellules.

Dans chaque tube, 300 µl de tampon 2 sont ajoutés et mélangés doucement en retournant le tube plusieurs fois. Les tubes sont incubés 5 minutes à température ambiante. Ce tampon qui contient du SDS et du NaOH va casser la membrane des bactéries et fragmenter l'ADN chromosomique tout en laissant intact l'ADN plasmidique du fait de sa conformation superenroulé à ce pH situé entre 12 et 12,5.

3. Neutralisation et précipitation des déchets.

La solution P3 est conservée à 4°C, 300 µl de ce tampon sont ajoutés et mélangés par retournement, il se forme un précipité blanc. Les tubes sont incubés 5 minutes dans la glace. Les lipides, les protéines, et les fragments d'ADN chromosomiques précipitent grâce à l'acétate, après neutralisation du pH par le potassium.

4. Elimination des déchets.

Les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 12000 trs/min. L'ADN chromosomique et les déchets se retrouvent dans le culot, alors que les plasmides sont dans le surnageant qui est retiré rapidement. Le surnageant doit être clair, si ce n'est pas le cas il faut refaire une centrifugation. Ce surnageant sera déposé ensuite sur une colonne.

5. Equilibration des colonnes.

Ce kit utilise le principe de la chromatographie d'affinité électrostatique entre les groupements phosphates des molécules d'ADN chargées négativement et les groupements DEAE sur la surface de la résine chargés positivement. La concentration en sel et les conditions de pH des solutions déterminent si l'ADN va rester dans la colonne ou être élué.

La colonne QIAGEN-tip 20 est donc équilibrée par 1 ml de solution QBT, en laissant le liquide s'écouler par gravité.

6. Elimination des déchets restants.

Quand tout le tampon s'est écoulé, il faut mettre rapidement le surnageant au-dessus de la colonne. La colonne est lavée deux fois successivement par 2 ml de tampon QC. Cette solution élimine les ARN, les protéines, les hydrates de carbone et les petits métabolites restants. L'ADN plasmidique est retenu dans la colonne.

7. Elution des plasmides.

La colonne est mise au-dessus d'un eppendorf et l'ADN plasmidique est élué par 800 ml de solution QF. C'est une solution plus saline qui « détache » l'ADN de la colonne.

8. Précipitation de l'ADN.

L'ADN est précipité par l'ajout de 600 ml d'isopropanol. Les tubes sont centrifugés 30 minutes à 10000 trs/min à 4°C. Le surnageant est enlevé avec précaution.

9. Lavage de l'ADN.

Le culot est lavé par 1 ml d'alcool 70°. Les tubes sont recentrifugés 10 minutes et le surnageant est de nouveau ôté. Les tubes sont séchés 5 minutes à l'air libre.

10. Resuspension de l'ADN.

Le culot est repris dans 20 µl de TE. Les tubes sont conservés à -20°C.

11. Digestion de l'ADN.

Le plasmide utilisé possède un site de restriction pour EcoRI. L'ADN est donc digéré par cette enzyme qui permet de libérer l'insert afin de vérifier (par sa taille) s'il correspond bien au fragment que l'on voulait cloner.

Le mélange de réaction est le suivant :

PRODUITS	QUANTITE POUR 1 TUBE
ADN plasmidique	2µl
EcoRI	0,5µl
Tampon 10X	2µl
H ₂ O	qsp 20µl

Les tubes sont laissés 1H à 1H30 au bain-marie à 37°C qui est la température optimale d'action de l'enzyme. Ensuite sont ajoutés 4µl de bleu de charge. Celui-ci stoppe l'action de l'enzyme car il contient de l'EDTA. Puis les échantillons sont mis à migrer. Sur le gel, au moins deux bandes doivent être obtenues : une de très grande taille correspondant à l'ADN plasmidique, et au moins une autre correspondant au fragment cloné dont la taille correspond à celle du fragment de départ amplifié par PCR

L'échantillon est envoyé chez APPLIGENE qui effectuera le séquençage avec l'amorce universelle T7 présente sur le plasmide. Le séquençage commence avant l'insert ce qui permet de ne pas perdre de portion de séquence.

IV. HYBRIDATION *IN SITU* (HIS)

Principe :

La technique d'Hybridation *In Situ* utilisée ici est une technique basée sur la complémentarité des brins d'ADN. Une sonde spécifique de l'ADN des parasites est mise en contact avec une coupe histologique de tissu d'huître parasitée et va s'hybrider sur l'ADN parasitaire. Après révélation, l'observation microscopique permet de localiser les parasites dans les tissus de l'huître.

V.I. Elaboration de la sonde.

La sonde réalisée par PCR est double brin. Lors de l'hybridation il faudra donc la dénaturer pour que celle-ci puisse se fixer sur l'ADN de l'échantillon.

Pour que la sonde puisse être détectée, des dUTP marqués à la digoxigénine sont ajoutés au réactif de PCR. Lors de la révélation, un anticorps antidigoxigénine marqué à la phosphatase alcaline va se fixer dessus. Celui-ci en présence de son substrat donne une coloration noire.

Pour vérifier que la digoxigénine a bien été intégrée, un témoin sans digoxigénine contenant l'ADN est réalisé, ainsi qu'un témoin négatif ne contenant pas d'ADN pour vérifier l'absence de contaminations.

Tube sonde (S).

PRODUITS	QUANTITE POUR 1 TUBE
MgCl ₂ (50mM)	2,5µl
Tampon 10 X	5µl
dNTP (2mM)	5µl
Amorces (0,1nmol/µl)	0,5µl × 2
Taq (5u/µl)	0,5µl
H ₂ O	30µl
dUTP (25nmol)	5µl
ADN	1µl

Tube témoin dig (Td).

PRODUITS	QUANTITE POUR 1 TUBE
MgCl ₂ (50mM)	2,5µl
Tampon 10 X	5µl
dNTP (2mM)	5µl
Amorces (0,1nmol/µl)	0,5µl × 2
Taq (5u/µl)	0,5µl
H ₂ O	35µl
dUTP (25nmol)	0µl
ADN	1µl

Tube témoin négatif (T-).

PRODUITS	QUANTITE POUR 1 TUBE
MgCl ₂ (50mM)	2,5µl
Tampon 10 X	5µl
dNTP (2mM)	5µl
Amorces (0,1nmol/µl)	0,5µl × 2
Taq (5u/µl)	0,5µl
H ₂ O	36µl
dUTP (25nmol)	0µl
ADN	0µl

V.2. Histologie.

Les échantillons d'huîtres parasitées sont fixés par du Davidson (annexe 01) puis inclus en bloc de paraffine. Avant d'être découpés les blocs sont mis à 4°C. Avec un microtome, des coupes de 7µm d'épaisseur sont réalisées. Les bandes de coupes sont posées dans un bain-marie puis récupérées sur des lames silanisées. Pour un bloc, environ six lames sont faites. Les lames sont séchées une nuit à l'étuve à 50°C. Pour vérifier le degré d'infection par le parasite, ainsi que la qualité de la coupe, une des lames est colorée à l'hémalum-éosine.

Cette coloration s'effectue par la succession de bains suivant :

- deux bains de 30 minutes dans du xylène,
- un bain de 15 minutes dans de l'alcool absolu,
- un bain de 15 minutes dans de l'alcool à 95°,
- 5 minutes sous l'eau courante,
- un bain de 1 minute 30 dans l'hémalum,
- 5 minutes sous l'eau courante,
- un bain de 3 minutes 30 dans l'éosine,
- deux bains de 1 minute dans de l'alcool à 95°,
- un bain de 1 minute dans de l'alcool absolu,
- deux bains de 1 minute dans du xylène.

Dès la sortie du dernier bain de xylène, les lames doivent être montées avec une résine : l'eukitt. Elles sont ensuite observées au microscope photonique à l'objectif 100.

V.3. Préparation des lames.

Les lames sont tout d'abord déparaffinées par 2 bains de 15 minutes dans du xylène puis 2 bains de 10 minutes dans de l'éthanol absolu. Elles sont ensuite laissées sécher à l'air libre verticalement.

La protéinase K (10 mg/ml) est diluée dans son tampon de dilution de façon à être à une concentration de 100µg/ml. Sur chaque lame sont déposés 200µl de cette solution. A l'aide d'un cône la goutte est étirée de façon à recouvrir tous les tissus. Les lames sont incubées en chambre humide 20 minutes à 37°C. La protéinase K lyse partiellement les tissus ce qui va permettre une meilleure accessibilité de la sonde tout en gardant intact la morphologie tissulaire.

Les tissus sont déshydratés par un bain de 5 minutes dans de l'éthanol absolu. Puis les lames sont laissées sécher à l'air libre.

V.4. Préhybridation et hybridation.

La composition des différentes solutions est en annexe 01.

Afin que la sonde ne se fixe que sur de l'ADN, les tissus sont tout d'abord saturés en déposant 200µl de mix d'hybridation par lame. Les lames sont incubées au moins une heure à 42°C. Le tampon est retiré avec un papier absorbant, il faut essuyer la lame autour des tissus pour installer une chambre autocollante sur celle-ci. Le mélange de sonde (6µl de sonde dans

60µl de tampon d'hybridation par lame) est déposé sur la fenêtre qui est ensuite fixée sur la chambre en faisant attention à ne pas laisser de bulles. La sonde qui est double brin est dénaturée 4 minutes à 94°C sur un appareil à PCR, puis refroidit aussitôt 2 minutes sur un lit de glace. Les lames sont incubées en chambre humide dans un four à 42°C toute la nuit.

Le lendemain la chambre est démontée et les lames sont lavées dans 2 bains successifs de 2 minutes dans du SSC 2X puis un bain de 10 minutes avec du SSC 0,4X à 42°C. Les différences de salinité et de température permettent d'éliminer les liaisons non spécifiques.

V.5. Détection.

Les lames sont plongées dans du tampon DIG1, puis essuyées autour des tissus. Les tissus sont couverts par 200µl de tampon DIG2 (1X) puis incubés 30 minutes en chambre humide à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées dans du tampon DIG1. L'anticorps α -digoxigénine est dilué au 1/500^{ème} en tampon DIG2 et 100µl sont déposés par lame. Les lames sont incubées une heure à température ambiante. Elles sont ensuite lavées 2 fois en tampon DIG1 pendant 1 minute puis équilibrées 5 minutes en tampon DIG3 (tampon du substrat). Le substrat de la phosphatase alcaline est préparé (20µl NBT/BICP dans 1 ml DIG3), puis 100µl sont déposés par lame. Les lames sont incubées au moins 2 heures à l'obscurité. La réaction est bloquée par un lavage en tampon DIG4.

V.6. Contre coloration.

Elle colore les tissus en jaune-orangé ce qui permet de localiser les parasites au niveau des différents organes.

Elle consiste à réaliser 3 bains successifs de 1 minute, dans respectivement, du Bismarck Brown Yellow (BBY), de l'alcool à 95° et de l'alcool absolu. Les lames sont ensuite mises dans du xylène afin d'être montées avec de l'eukitt. L'observation des lames est réalisée au microscope photonique à l'objectif 100.

RÉSULTATS

I. SEQUENÇAGE DE LA PARTIE TERMINALE DU GENE 18S DE *MIKROCYTOS ROUGHLEYI*.

Connaissances actuelles :

Le parasite *Mikrocytos roughleyi* n'a actuellement pas de position taxonomique précise. Le début du gène 18S a été séquencé et comparé avec une banque de gène. La séquence déjà obtenue au laboratoire a montré des homologues avec celles d'autres protozoaires comme ceux du genre *Haplosporidium* et plus particulièrement avec ceux du genre *Bonamia*.

Objectif :

Le but de cette expérience est d'avoir la séquence complète du gène 18S et celle du gène ITS du parasite *Mikrocytos roughleyi* et ceci pour plusieurs raisons.

Tout d'abord cela aura un intérêt phylogénique. Cette séquence pourra être comparée à celles de *Bonamia ostreae* et *Bonamia* sp et ainsi permettre de définir la position taxonomique de ce parasite. Cela servira également à élaborer des amorces spécifiques de cette espèce afin d'établir un diagnostic par HIS ou PCR-RFLP (Restriction Length Fragment Polymorphism).

1. Amplification du gène.

L'ADN génomique de *M.roughleyi* est extrait à partir de deux biopsies d'huître parasitée conservées dans de l'alcool à 95°.

Afin d'amplifier la fin du gène 18S de *M.roughleyi*, plusieurs couples d'amorces ont été testés :

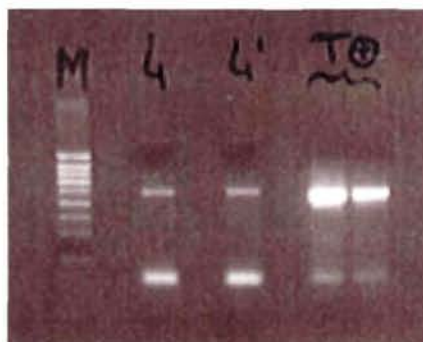
- CS1/CaS1 : couple d'amorces universelles qui amplifie une portion du gène 18S conservée chez tous les organismes, ce qui permet de vérifier la qualité de l'ADN.

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{BoSs1/CaS2} \\ \text{BoSs1/Ra58} \end{array} \right.$$

BoSs1 est une amorce spécifique de *B.ostreae* et *B.sp* alors que CaS2 et Ra58 sont des amorces universelles. CaS2 se situe à la fin du gène 18S et Ra58 à la fin du gène ITS.

L'ADN est amplifié par les amorces CS1/CaS1. Bien que le produit de PCR amplifié soit faible après migration sur gel, on considère que cet ADN peut être utilisé pour rechercher la présence d'ADN parasitaire.

Seul le couple BoSs1/Ra58 a donné un résultat positif. On obtient une bande de même taille que celle du témoin positif (ADN de *Bonamia ostreae*), soit 500pb ce qui correspond à l'amplification de la fin du gène 18S et celle du gène ITS (document 02).

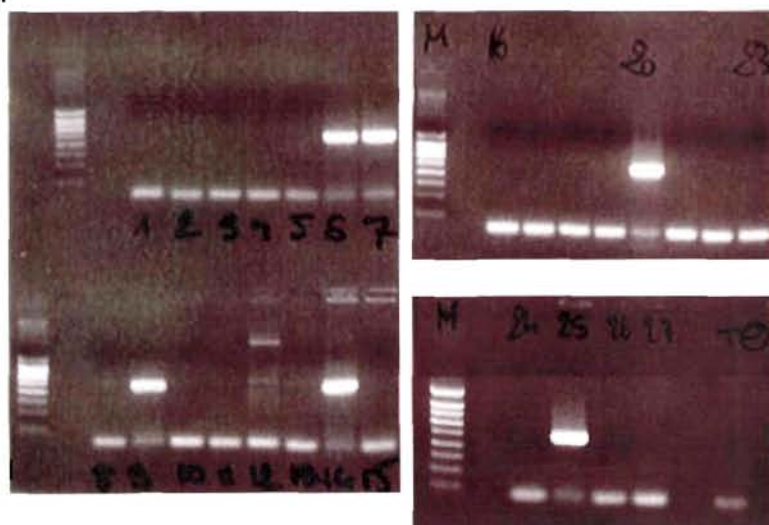


M : marqueur de taille.
4, 4' : échantillon d'ADN d'huître parasitée par *M.roughleyi*.
T+ : ADN de *B.ostreae*

Document 02 : migration des produits de PCR réalisés avec les amorces BoSs1/Ra58.

2. Ligation et clonage du fragment amplifié.

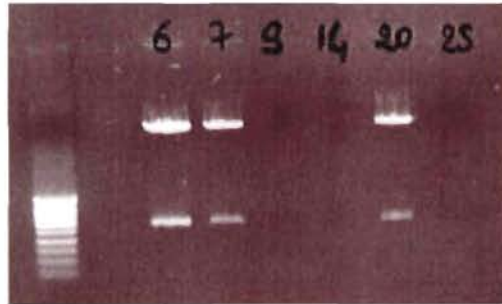
Les échantillons 4 et 4' sont donc ligués puis clonés. 27 colonies blanches sont prélevées et mises en culture. En parallèle, une PCR est réalisée avec les amorces BoSs1/Ra58, afin de vérifier si les clones contiennent la séquence d'intérêt de 500pb (document 03).



M : marqueur de taille.
De 1 à 27 : clones sélectionnés.
T- : témoin sans ADN

Document 03 : migration des produits de PCR réalisée avec les amorces BoSs1/Ra58 sur les clones prélevés.

Les clones 6, 7, 9, 14, 20, et 25 présentent une bande à 500pb, ils correspondent donc à des bactéries ayant intégré un plasmide recombiné avec la séquence d'intérêt. Sur ces clones, une extraction d'ADN plasmidique est réalisée. Afin de vérifier si l'extraction a été réussie, les ADN sont digérés par l'enzyme de restriction Eco RI ce qui libère l'insert du plasmide (document 04).



De 6 à 25 : plasmides digérés par EcoRI

*Document 04 : migration des ADN plasmidique après digestion par Eco RI.
La bande supérieure à 1000pb correspond au plasmide linéarisé
et celle à 500pb à l'insert.*

Après digestion, on migre les produits obtenus sur un gel d'agarose.

Les clones 6, 7 et 20 présentent une bande à 500pb. Le clone 6 est envoyé à séquencer chez APPLIGENE.

3. Séquence.

Après avoir effectué une recherche sur GENBANK, on constate que la séquence obtenue ne présente aucune homologie d'alignement avec les séquences attendues et n'est pas située dans le gène 18S. Une PCR est alors réalisée en choisissant des amorces à l'intérieur de la séquence BoSs1/Ra58 déjà connue et qui permettent d'amplifier l'ADN de *Bonamia ostreae* et/ou *Bonamia* sp, les amorces SBo (amorce spécifique) et Ra58 (amorce universelle).

Aucune bande n'est obtenue. Les fragments amplifiés ne viennent donc pas du gène 18S. Il s'agit sans doute d'une contamination contenue dans l'ADN d'huître extrait.

II. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DE *B.OSTREAE*, *B.SP*, ET *M.ROUGHLEYI*.

Objectif :

La comparaison des séquences du gène 18S entre *B.ostreae*, *B.sp*, et *M.roughleyi*, a permis de mettre en évidence la présence de sites de restriction pour les enzymes Bgl I et Hae II différents pour ces trois parasites (annexe 03).

Les sites de coupure de ces deux enzymes sont les suivants :

Bgl I : GCCNNNN↓NGGC

Hae II : RGCGC↓Y (R = A ou G, Y = C ou T)

La répartition des sites est la suivante :

	Bgl I	Hae II
<i>Bonamia ostreae</i> (300pb)	1 site (121 et 179pb)	1 site (116 et 184pb)
<i>Bonamia sp</i> (304pb)	Aucun site	1 site (116 et 188pb)
<i>Mikrocytos roughleyi</i> (304pb)	Aucun site	Aucun site

Théoriquement, ces trois espèces peuvent donc être différenciées les unes des autres par deux digestions en parallèle. C'est ce qu'on appelle un diagnostic différentiel par PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

1. Extraction des différents ADN.

Les échantillons utilisés sont des extraits d'ADN génomique de chacun des parasites suivants : *B.ostreae*, *B.sp* et *M.roughleyi*. Une PCR est réalisée avec le couple d'amorce Bo/BoAs spécifique du gène 18S de ces trois parasites. On obtient une bande de 300 pour *B.ostreae* et 304pb pour *B.sp* et *M.roughleyi* (document 05).



M : marqueur de taille.
Mr : ADN d'huître parasitée par *M.roughleyi*.
B.sp : ADN d'huître parasitée par *B.sp*.
B.o : ADN d'huître parasitée par *B.ostreae*.
T- : témoin sans ADN.

Document 05 : migration des produits de PCR réalisée avec les amorces Bo/BoAs.

2. Digestion des produits PCR

Les produits PCR sont ensuite digérés avec les deux enzymes de restriction Bgl I et Hae II séparément (document 06).



M : marqueur de taille.
B.o. : ADN d'huître parasitée par *B.ostreae*.
B.sp : ADN d'huître parasitée par *B.sp.*
Mr : ADN d'huître parasitée par *M.roughleyi*.
Bgl I : même échantillons digérés par Bgl I
Hae II : même échantillons digérés par HaeII

Document 06 : migration de B.ostreae, B.sp et M.roughleyi, respectivement non digéré, digéré par Bgl I et digéré par Hae II.

L'ADN amplifié de *B.ostreae* est digéré partiellement en deux bandes de 121 et 179pb par Bgl I, et 116 et 184pb par Hae II

L'ADN de *B.sp* n'est pas digéré par Bgl I et est digéré en deux bandes de 116 et 188pb par Hae II.

Pour *M.roughleyi* on obtient le même résultat que pour *B.ostreae*.

La séquence de *M.roughleyi* n'ayant théoriquement pas de site de restriction, nous pensons qu'il a dû être contaminé par de l'ADN de *B.ostreae*. Le diagnostic spécifique de chacune des espèces n'est vérifié que pour *B.ostreae* et *B.sp.*

III. MISE AU POINT D'UNE SONDE SPECIFIQUE DE *BONAMIA* SP.

Connaissances actuelles :

Bonamia sp fait partie du phylum des *Haplosporidia*. La séquence du gène 18S est connue.

Objectif :

Les sondes utilisées actuellement s'hybrident indifféremment avec les deux espèces de parasites *Bonamia ostreae* et sp. Ce sont des sondes de genre. La sonde que l'on souhaite mettre au point ne doit s'hybrider que sur le parasite *B.sp*, ce sera une sonde d'espèce. Cette sonde a un intérêt au niveau du diagnostic différentiel des deux parasites *B.ostreae* et *B.sp*.

1. Elaboration de la sonde « contrôle positif ».

Comme dans toute étude, un témoin positif est nécessaire. Ici il s'agira d'une sonde spécifique du genre *Bonamia*.

Tout d'abord l'ADN génomique de *Bonamia ostreae* est extrait à partir d'un fragment de branchie d'une huître parasitée congelée. Afin de vérifier si l'ADN est de bonne qualité et contient de l'ADN parasite, une PCR est réalisée avec les amorces spécifiques Bo/BoAs, situées sur le gène 18S, qui génèrent un fragment de 300pb (document 07).

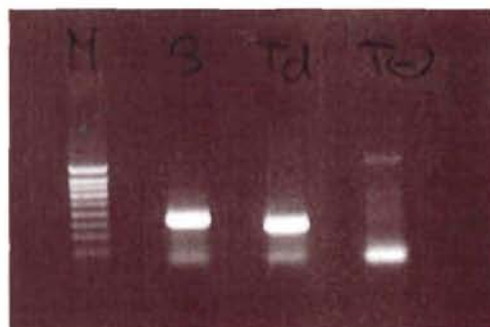


M : marqueur de taille.
De 1 à 2' : ADN d'huître parasitée par *B.ostreae*.
T- : témoin sans ADN

Document 07 : migration des produits de PCR réalisée avec les amorces Bo/BoAs.

Pour les 4 échantillons testés, une bande de 300pb est obtenue qui correspond à l'amplification de l'ADN parasite. Le témoin négatif confirme l'absence de contaminations.

A partir de l'échantillon 2, une sonde est réalisée par PCR en incorporant des dUTP marqués avec de la digoxigénine (document 08).

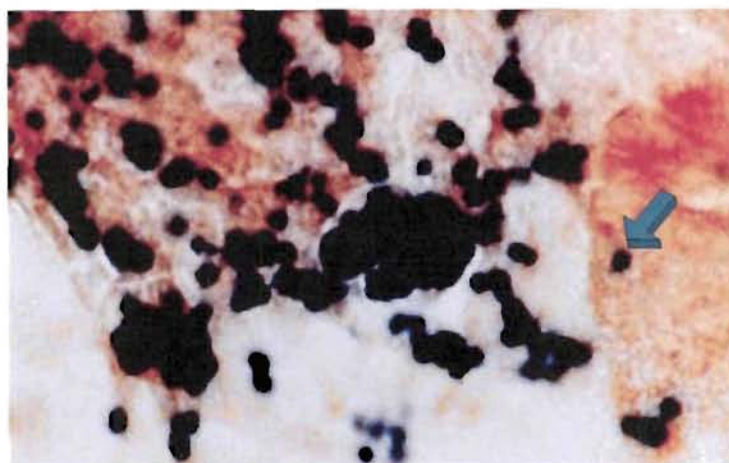


M : marqueur de taille.
S : ADN + digoxigénine.
Td : ADN - digoxigénine.
T- : témoin sans ADN et sans digoxigénine.

Document 08 : migration des produits de PCR réalisée avec les amorces Bo/BoAs après incorporation de digoxigénine.

Les dUTP marqués à la digoxigénine ont bien été intégrés puisque l'on obtient après migration sur gel une bande de taille supérieure à celle du témoin (Td) correspondant à l'échantillon sans digoxigénine. Cette différence de migration est due au fait que la digoxigénine « alourdit » le produit de PCR obtenu qui donc migre plus lentement.

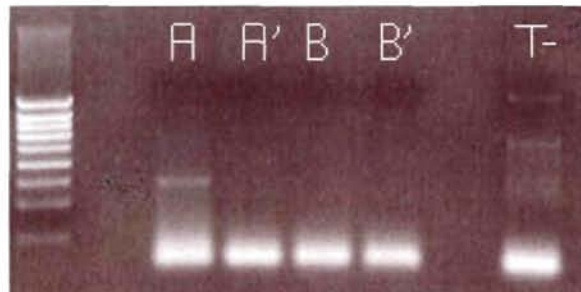
Pour vérifier la spécificité de cette sonde, une Hybridation *In Situ* est réalisée avec une coupe histologique de tissus parasités par *Bonamia ostreae*. L'observation au microscope à l'objectif 100 montre des points très noirs correspondant au complexe (ADN parasite/ADN sonde) hybridé et donc aux parasites *B.ostreae*. Les tissus apparaissent jaunes. Ces résultats confirment l'absence d'hybridation non spécifique sur les tissus d'huîtres (document 09).



Document 09 : observation microscopique à l'objectif 100 d'une coupe histologique de tissu d'huître parasitée par B.ostreae après hybridation avec la sonde « contrôle positif ». La flèche indique un parasite.

2. Elaboration de la sonde spécifique de *B.sp.*

L'ADN de *Bonamia* sp est extrait à partir de biopsies d'huître parasitée conservées dans de l'alcool à 95°. Afin de vérifier la qualité de l'extraction et la présence d'ADN parasite, une PCR est réalisée avec les amorces Bo/BoAs (document 10).



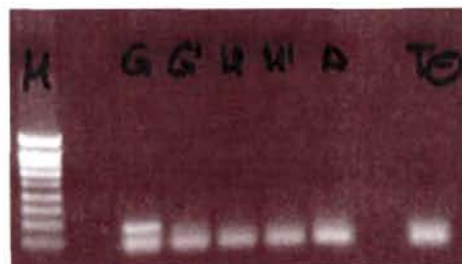
De A à B' : ADN d'huître parasitée par *B.sp.*
T- : témoin sans ADN.

Document 10 : migration des produits de PCR réalisée avec les amorces Bo/BoAs.

Seul l'échantillon A présente une bande à 300pb, c'est donc lui qui va servir d'ADN matrice à l'élaboration de la sonde spécifique de *Bonamia* sp. Une PCR est réalisée avec les amorces SBo/Ra58 en incorporant de la digoxigénine. Ces deux amorces sont situées respectivement à la fin du gène 18S et à la fin du gène ITS, le but est de vérifier la qualité de l'ADN.

Aucune bande n'est obtenue suggérant une qualité médiocre de l'ADN ou un problème d'inhibition.

Une nouvelle extraction d'ADN de *Bonamia* sp est donc effectuée. Une PCR est réalisée avec les amorces spécifiques SBo/BspAs situé dans le gène ITS, et générant un fragment de 200pb (document 11).

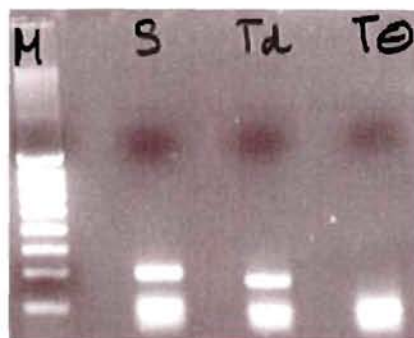


M : marqueur de taille.
De G à A : ADN d'huître parasitée par *B.sp.*
T- : témoin sans ADN.

Document 11 : migration des produits de PCR réalisée avec les amorces SBo/BspAs

L'échantillon G présente une bande à 200pb, il va donc servir à l'élaboration de la sonde.

Une seconde PCR est donc réalisée avec cet échantillon en incorporant de la digoxigénine (document 12).



M : marqueur de taille.
 S : ADN d'huître parasitée par *B.sp* avec incorporation de digoxigénine.
 Td : ADN d'huître parasitée par *B.sp*.
 T- : témoin sans ADN.

Document 12 : migration des produits de PCR réalisée avec les amorces SBo/BspAs.

Les dUTP marqués par la digoxigénine ont bien été intégrés au produit de PCR puisque l'on obtient une bande de taille supérieure à celle du témoin sans digoxigénine. Cette sonde va être testée en hybridation *in situ* sur coupes histologiques.

3. Hybridation In Situ.

Chacune des deux sondes est testée sur chacune des deux espèces de parasites, *Bonamia ostreae* et *Bonamia sp.*

Sonde utilisée :	Coupe histologique d'huître parasitée par :	
	<i>B.ostreae</i>	<i>B.sp</i>
Sonde + (Bo)	+++	*
Sonde Bsp	-	*

Légende :

- +++ : très forte hybridation
- : aucune hybridation
- * : la grande majorité des tissus s'est détachée de la lame lors de l'hybridation, aucun résultat n'a donc pu être observé.

Ce tableau regroupe les résultats obtenus après la technique d'hybridation *in situ*. La sonde « contrôle positif » a permis de mettre en évidence un marquage intense des parasites *B.ostreae* sur la coupe histologique. La sonde *B.sp* n'a pas permis d'obtenir d'hybridation sur les parasites *B.ostreae*.

Ni la sonde « contrôle positive », ni la sonde spécifique, n'ont donné de résultats interprétables sur les coupes *B.sp*.

III. ETUDE DU GENE 18S DU PARASITE *MIKROCYTOS MACKINI*.

Connaissances actuelles :

Très peu de recherches ont été effectuées sur ce parasite, les connaissances sur *Mikrocytos mackini* sont donc minces. Le gène 18S n'est pas séquencé et aucune affiliation taxonomique est connue.

Objectif :

L'objectif est de trouver des amorces permettant d'amplifier l'ADN de *M.mackini* et de les tester en hybridation *in situ*. Si celles-ci permettent une hybridation, un séquençage pourra être réalisé.

De l'ADN de *Mikrocytos mackini* est extrait à partir de biopsies d'huître parasitée conservées dans de l'alcool à 95°. Une PCR est réalisée sur deux échantillons avec le couple d'amorces R1/F1 qui sont des amorces dégénérées universelles du groupe des *Haplosporidium* situées à la fin du gène 18S et générant un fragment d'environ 190pb (document 13).



M : marqueur de taille.
1, 4 : ADN d'huître parasité
par *M.mackini*.
T- : témoin sans ADN.

Document 13 : migration des produits de PCR
réalisée avec les amorces R1/F1.

L'échantillon 1 présente une bande de taille d'environ 200pb, ce qui était attendu. A partir de cet échantillon une sonde est réalisée en incorporant de la digoxigénine lors de la PCR (document 14).



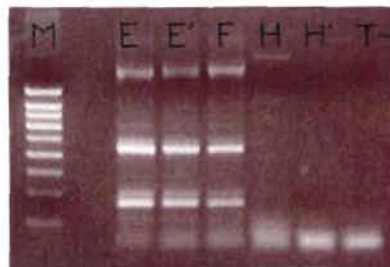
M : marqueur de taille.
S : ADN d'huître parasitée par *M.mackini* avec incorporation de digoxigénine.
Td : ADN d'huître parasitée par *M.mackini*.
T- : témoin sans ADN.

Document 14 : migration des produits de PCR après incorporation de la digoxigénine.

La bande obtenue pour la sonde est faible, ce qui donne des résultats difficilement interprétables en hybridation *in situ*.

Avec l'arrivée de nouveaux échantillons du Canada, nous avons décidé de recommencer cette expérience. L'ADN de *M.mackini* est donc extrait à partir de ces nouvelles biopsies d'huîtres infectées conservées dans de l'alcool à 95°.

Une PCR est réalisée sur trois échantillons avec les amorces R1/F1. Deux témoins négatifs (ADN d'huître) sont ajoutés pour vérifier la spécificité de la PCR (document 15).



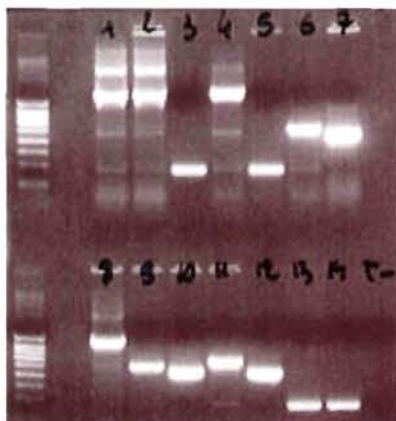
M : marqueur de taille.
E, E', F : ADN d'huître parasitée par *M.mackini*.
H, H' : ADN d'huître saine.
T- : témoin sans ADN.

Document 15 : migration des produits de PCR réalisée avec les amorces R1/F1.

Avec les huîtres négatives aucune bande n'est obtenue. Avec les huîtres parasitées quatre bandes de respectivement 190pb, 200pb, 450pb et 500pb sont obtenues.

Dans ces conditions, il n'est pas possible de réaliser une sonde. Par contre il est intéressant de liguer puis de cloner ces trois fragments indépendamment afin de les étudier.

L'échantillon E est donc ligué puis cloné. Une PCR est réalisée sur les clones afin de vérifier quel fragment a été intégré (document 16).



De 1 à 14 : clones prélevés.
T- : témoin sans ADN.

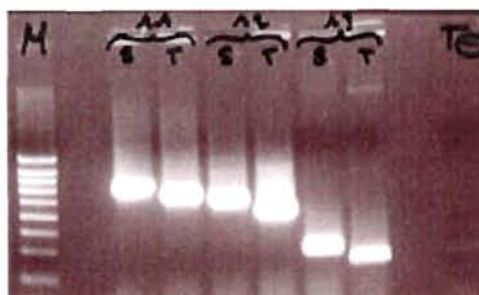
Document 16 : migration des produits de PCR réalisée sur les clones avec les amorces R1/F1.

Tous les clones ayant une bande unique (c'est à dire les clones de 3 à 14) sont choisis pour l'extraction d'ADN plasmidique.

Les extraits d'ADN obtenus sont digérés par Eco RI. A la migration sur gel d'agarose, aucune bande n'est obtenue, l'extraction est donc à refaire.

Parallèlement trois sondes sont réalisées à partir des clones 11, 12 et 13, respectivement de taille 500pb, 400pb et 200pb.

Une PCR est donc réalisée sur ces trois échantillons avec les amorces R1/F1 en incorporant de la digoxigénine (document 17).



M : marqueur de taille.
11, 12, 13 : ADN du plasmide recombiné.
S : avec incorporation de digoxigénine
T : sans digoxigénine
T- : témoin sans ADN.

Document 17 : migration des produits de PCR réalisée avec les amorces R1/F1 après incorporation de la digoxigénine.

Les dUTP marqués à la digoxigénine ont bien été incorporés. Une Hybridation *In Situ* est donc réalisée avec ces trois sondes sur des coupes histologiques d'huître parasitée par *M.mackini*.

En hybridation *in situ*, les sondes 11 et 12 n'ont donné aucun marquage. La sonde 13 a donné des résultats très difficiles à interpréter. Des structures sont très faiblement marquées. Il faudrait compléter ces premiers résultats par d'autres tentatives en modifiant le protocole d'hybridation *in situ*, par exemple les températures d'hybridation des sondes.

DISCUSSION
CONCLUSION

I. SEQUENÇAGE DE LA PARTIE TERMINALE DU GENE 18S DU PARASITE *M.ROUGHLEYI*.

La séquence obtenue ne présente aucune homologie avec les séquences de *B.ostreae* et *B.sp.* Ce résultat a souligné le problème des contaminations dues au fait que l'on utilise de l'ADN parasitaire non purifié. En effet les extractions sont réalisées à partir de tissus d'huîtres parasités et non à partir de parasites purifiés.

La combinaison d'amorces spécifiques et universelles a pour but de limiter ces amplifications aspécifiques mais ne résout pas entièrement ce problème.

L'utilisation de protocoles de purification pourrait être une solution puisque l'échantillon ne contiendrait plus que de l'ADN parasitaire. Cependant ces protocoles ne sont disponibles que pour *B.ostreae*.

II. LA TECHNIQUE DE PCR-RFLP.

Cette technique est intéressante puisqu'elle nous a permis de différencier les parasites *B.ostreae* et *B.sp.* Toutefois son utilisation a montré des limites avec notamment des problèmes de contaminations lors de la PCR.

En effet les produits de PCR sont très contaminants puisqu'une microgoutte contient un nombre important de fragments amplifiés. L'aérosol qui peut être libéré au moment de l'ouverture des tubes peut contaminer la paillasse et ces contaminations sont difficiles à éliminer.

Lors de la technique de PCR, les ADN des trois parasites étant manipulés en même temps, cela a pu entraîner la contamination de l'ADN de *M.roughleyi* par des fragments amplifiés d'ADN de *B.ostreae*.

Cette technique devra être complétée par la mise au point de techniques telles que l'Hybridation *In Situ*, plus spécifiques. Mais pour cela la séquence des ITS doit être connue.

III. L'HYBRIDATION *IN SITU*.

Lors de cette technique, l'importance de la qualité des échantillons de départ a été mise en évidence.

En effet les échantillons de *B.sp* provenaient de laboratoires étrangers. Le fixateur ainsi que la durée de fixation ne sont pas connus.

Au cours de cette expérimentation les tissus se sont décollés de la lame après le traitement à la protéinase K. Ceci n'a donc pas permis l'observation de résultats interprétables.

Pour obtenir des résultats, il faudrait adapter le protocole, par exemple, en diminuant le temps de traitement à la protéinase K.

BIBLIOGRAPHIE

COCHENNEC N., LEROUX F., BERTHE F. and GERARD A., 2000, Detection of *Bonamia ostreae* based on DNA tools, Journal of Invertebrate Pathologie.

LUCOTTE G., Technique de clonage moléculaire.

FARLEY C A., WOLF p H., AND ELSTON R A., 1988, A long-term study of « mikrocell » disease in oysters with a description of new genus, *Mikrocytos* (G.N.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (SP.N.) and *Mikrocytos roughleyi*, Fishery Bulletin : vol 86, N°3, 581-593.

MOREAU DIMITRI, 2000, Caractérisation moléculaire des parasites du genre *Mykrocytos*.

PERKINS FO., phylum Haplosporidia, Contribution N° 1507, Virginia institute of Marine Science, School of Marine Science, The College of William and Mary, Gloucester point, VA23062.

ANNEXES

ANNEXE 01 **1**

COMPOSITIONS DES DIFFERENTS REACTIFS, TAMPONS ET MILIEUX UTILISEES

ANNEXE 02 **3**

PRESENTATION DU KIT DE CLONAGE TA CLONING[®] KIT, INVITROGEN[®]

ANNEXE 03 **4**

ALIGNEMENT DES SEQUENCES DE *B.OSTREAE*, *B.SP*, *M.ROUGHLEYI*

ANNEXE 01 : **COMPOSITION DES DIFFERENTS REACTIFS, TAMPONS ET MILIEUX UTILISES**

REACTIFS UTILISES LORS D'UNE EXTRACTION D'ADN.

- Tampon de lyse : γ -kétoglutarate 0,1%
- Tampon d'extraction 10X : Tris 500mM pH 8,5, EDTA 10mM pH 8,0, Tween 20 5%.

REACTIFS UTILISES LORS DE LA PCR.

- Tampon de stockage de la Taq : Tris-HCL 50mM à pH 8,0, KCL 100mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, glycérol 50%, Tween 20 0,5% et Nonidet-P40 0,5%.
- Tampon de réaction : consensus pour pH 8,4 par Tris-HCL 10mM, sel par KCL 50mM, 0,1% de triton 100X.
- $MgCl_2$: Tris-HCL 10mM, KCL 50mM, $MgCl_2$ 2,5mM.

ELECTROPHORESE.

- TAE 1X (liquide de migration) : Tris-acétate 0,04M, EDTA 0,001M.
- Gel d'agarose à 1% : 1g d'agarose et 5 μ L de BET pour 100mL de TAE 1X.

REACTIFS DU TA CLONING[®] KIT DUAL PROMOTER VERSION D DE INVITROGEN[®]

- Tampon de ligation : Tris-HCl à pH 7,5, $MgCl_2$ 60 mM, NaCl 50 mM.
- Milieu de culture SOC : Tryptone 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, $MgCl_2$ 10mM, $MgSO_4$ 10mM, glucose 20mM.

REACTIFS DU MINI KIT PLASMID QIAGEN.

- | | |
|--|---|
| • Tampon 1
(tampon de resuspension) | 50mM TrisCl, pH 8,0 ; 10mM EDTA
100 μ g/mL RNase A à ajouter extemporanément |
| • Tampon 2
(tampon de lyse) | 200mM NaOH, 1% SDS |
| • Tampon 3
(tampon de neutralisation) | 3,0M acétate de potassium, pH 5,5 |

- Tampon QBT
(tampon d'équilibration) 750mM NaCl ; 50mM MOPS, pH 7,0 ; 15% isopropanol
0,15% Triton[®] X-100
- Tampon QC
(tampon de lavage) 1,0M NaCl ; 5 mM MOPS, pH 7,0 ; 15% isopropanol
- Tampon QF
(tampon d'élution) 1,25M NaCl ; 50 mM TrisCl, pH 8,5 ; 15% isopropanol
- TE 10mM TrisCl, pH 8,0 ; mM EDTA

REACTIFS UTILISES POUR L'HYBRIDATION *IN SITU*.

- Davidson : eau de mer filtrée, alcool à 95°, formol, glycérine, 10% d'acide acétique au moment de l'emploi.
- Tampon de dilution de la protéinase K : TE 50 :10, Tris 1M pH 7,4, EDTA 0,5M pH8, NaCl 5M.
- Mix d'hybridation : formamide 100%, sulfate dextran, SSC 20X, t RNA, denhart 50X
- Tampon DIG1 : acide malique 0,1M, NaCl 0,15M, pH 7,5.
- Tampon DIG2 : Blocking reagent, tampon DIG1.
- Tampon DIG3 : Tris 1M pH 8, NaCl 5M, MgCl₂, pH 9,5.
- Tampon DIG4 : Tris 1M pH 8, EDTA 0,5M pH 8

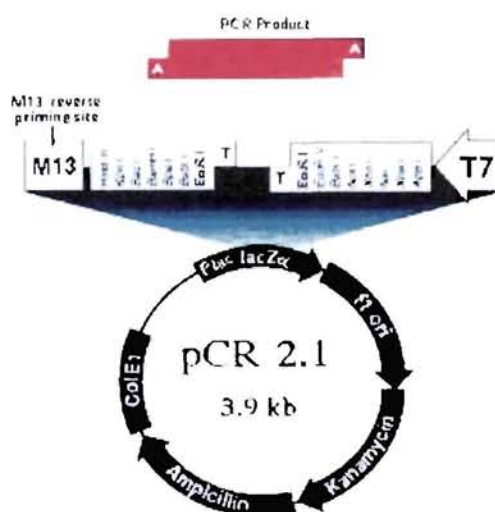
MILIEUX DE CULTURE BACTERIENNE.

- Milieu LB solide : LB Broth base, GIBCO BRL (lennox L agar), 32g par litre d'eau distillée, autoclavé 15 minutes à 121 °C. Ce milieu est additionné d'1ml d'ampicilline à 50mg/ml par litre de milieu et coulé en boîte de Pétri.
- Milieu LB liquide : LB Broth base, GIBCO BRL (lennox L Broth base), 20g par litre d'eau distillée, autoclavé 15 minutes à 121 °C.

ANNEXE 02 : **PRESENTATION DU KIT DE CLONAGE TA CLONING[®] KIT, INVITROGEN[®]**

LIGATION :

La ligation est effectuée à partir d'un produit de P.C.R. frais, le vecteur utilisé est le plasmide pCR 2.1. Le produit de PCR possède deux extrémités cohésives avec une adénosine libre, le vecteur linéarisé possède les extrémités cohésives complémentaires avec une thymine libre. Le plasmide pCR 2.1 possède deux marqueurs de résistance à des antibiotiques, l'ampicilline et la kanamycine, il est ouvert au niveau d'un troisième marqueur de sélection, correspondant à un gène codant pour la partie N-terminale de la β -galactosidase (la partie C-terminale étant codé par le génome de la bactérie transformée), qui sera muté lors de l'insertion du produit de P.C.R., empêchant ainsi la production de la β -galactosidase, et donc la dégradation du X-Gal, introduit dans le milieu de culture, et par le fait la coloration des colonies en bleu. Le site d'insertion est entouré de deux sites de restriction pour EcoRI, permettant la libération de l'insert, effectué lors de la dernière vérification avant l'envoi au séquençage.



Site de restriction de Eco RI : G↓AATTC

TRANSFORMATION :

Les bactéries sont les Escherichia coli INV α F' compétentes, ne possédant pas de répresseur du promoteur Lac Z α (évitant ainsi d'IPTG lors de la mise en culture).

ANNEXE 03 :
ALIGNEMENT DES SEQUENCES DE
B.OSTREAE, B.SP ET M.ROUGHLEYI

- 1 *Bonamia ostreae*
 2 *Bonamia sp*
 3 *Mikrocytos roughleyi*

	10	20	30	40	50	60	
1	CCATTTAATTGGTCGGG	CCGCTGGTCCTGATCCTTTACTTTGAGAAAATTA	AAAGTGCTCA	60			
2	CCATTTAATTGGTCGGG	CCGCTGGTCCTGATCCTTTACTTTGAGAAAATTA	AAAGTGCTCA	60			
3	CCATTTAATTGGTCGGG	CCGCTGGTCCTGATCCTTTACTTTGAGAAAATTA	AAAGTGCTCA	60			
Bgl I							
	70	80	90	100	110	120	
1	AAGCAGGCTCGCGCCTGAATGCATTAGCATGGAATAATAAGACACGACTTCGGCGCCGCC	120					
2	AAGCAGGCTCGCGCCTGAATGCATTAGCATGGAATAATAAGACACGACTTCGGCGCCGCC	120					
3	AAGCAGGCTCGCGCCTGAATGCATTAGCATGGAATAATAAGACACGACTTCGGCACCCGCC	120					
Hae II							
	130	140	150	160	170	180	
1	TC-----GGCGGTTGTTTTGTTGGTTTTGAGCTGGAGTAATGATTGATAGAAACAATTGGG	176					
2	ACTCGTGGCGGGTGTGTTTTGTTGGTTTTGAGCTGGAGTAATGATTGATAGAAACAATTGGG	180					
3	ACTCGTGGCGGGTGTGTTTTGTTGGTTTTGAGCTGGAGTAATGATTGATAGAAACAATTGGG	180					
	190	200	210	220	230	240	
1	GGTGCTAGTATCGCCGGGCCAGAGGTAAAATTCTTTAATTCGGTGAGACTAACTTATGC	236					
2	GGTGCTAGTATCGCCGGGCCAGAGGTAAAATTCTTTAATTCGGTGAGACTAACTTATGC	240					
3	GGTGCTAGTATCGCCGGGCCAGAGGTAAAATTCTTTAATTCGGTGAGACTAACTTATGC	240					
	250	260	270	280	290	300	
1	GAAAGCATTACCAAGCGTGTGTTTTCTTTAATCAAGAACTAAAGTTGGGGGATCGAAGACG	296					
2	GAAAGCATTACCAAGCGTGTGTTTTCTTTAATCAAGAACTAAAGTTGGGGGATCGAAGACG	300					
3	GGAAGCATTACCAAGCGTGTGTTTTCTTTAATCAAGAACTAAAGTTGGGGGATCGAAGACG	300					
1	ATCA	300					
2	ATCA	304					
3	ATCA	304					