

## Conditions d'élevage des escargots en laboratoire et obtention des pontes

L'élevage des escargots est maîtrisé en laboratoire (Gomot et Deray, 1987 ; Gomot, 1997 ; Gomot de Vaufleury, 2000 ; ISO 15952:2006). Les escargots matures pour la reproduction proviennent de l'élevage interne du laboratoire en parc extérieur de mai à octobre puis ils sont utilisés, selon leur date de récolte, soit directement pour obtenir des pontes, soit après quelques mois d'hibernation (ISO 15952:2006).

Les adultes reproducteurs sont placés dans des cages (40 individus par m<sup>2</sup>) dans une salle régulée avec une photopériode de 18 heures de lumière par jour, une température de 20°C et une humidité d'environ 80% (Figure II-1).



Figure II-1 : Salle et cages d'élevage des escargots en conditions contrôlées

Les cages sont nettoyées 3 fois par semaine. Les adultes sont nourris avec un aliment pour escargots *Helixal*<sup>®</sup> *unique* (SAS Antigny Nutrition, 85510 Le Boupere). Une semaine à 10 jours après avoir observé des accouplements, des pots de ponte (récipients en verre remplis de terreau horticole SEM support de culture NF 44-551, avec engrais ; 82% de matière organique, pH : 6,5) sont placés dans les cellules du dispositif d'élevage en fin de journée. Le lendemain matin, les escargots en cours de ponte (Figure II-2) sont isolés. Une fois la ponte terminée, l'escargot est replacé dans sa cellule et les œufs sont nettoyés à l'aide d'une passoire dans une bassine d'eau à 20°C afin de retirer le maximum de particules de terreau. Ils sont ensuite comptés et déposés dans une boîte de Pétri (Stérilin, 90 x 14,2 mm, polystyrène cristal, 3 ergots) contenant du papier Whatman humidifié (grade I, diamètre 90 mm) jusqu'à leur utilisation ou leur éclosion.

Ces boîtes sont placées en chambre d'incubation dans des conditions identiques à celles de la salle d'élevage.



Figure II-2 : Escargot *Helix aspersa* en cours de ponte et ponte avant nettoyage  
(d'après Druart et al. 2010)

## II.2. Systèmes et modalités d'expositions des oeufs

### II.2.1. Dispositif d'exposition

Le bioessai en phase liquide (LPB - *Liquide Phase Bioessai*) mis au point par Druart et al. (2010, 2012) a été utilisé pour toutes les expositions aux substances chimiques réalisées au cours de ce travail de thèse. Une fois nettoyés, les oeufs sont exposés dès les premiers stades de l'embryogenèse 12 à 24h maximum après la fin de la ponte. Généralement 3 à 5 pontes (réplicats) par essai sont utilisées. Les œufs d'une même ponte sont déposés à raison de 10 par réplikat, dans des boîtes de Pétri (Greiner Bio-one, 35 x 10 mm, polystyrène cristal, 3 ergots), dont le fond est recouvert par 4 papiers filtres (Whatman grade 1 ; 32 mm de diamètre). Les papiers filtres sont ensuite imbibés de 0,8 mL de solution à tester ou d'eau déminéralisée pour la modalité témoin (Figure II-3).

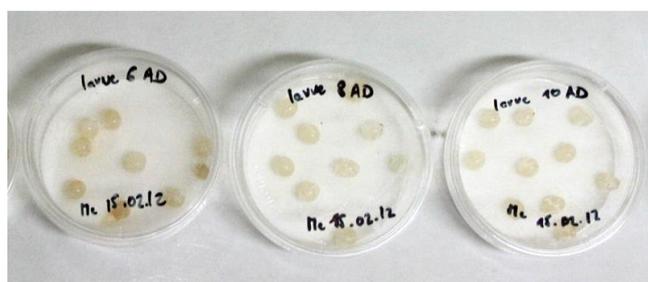


Figure II-3: Dispositif d'exposition utilisant les œufs d'*Helix aspersa*

Les solutions d'exposition sont réalisées à partir de chlorure de cadmium solide ( $\text{CdCl}_2$ , Sigma chemical, 99,99%), de poudre de Bouillie Bordelaise RSR Disperss (20% de Cu, Cerexagri), ou de solution commerciale de Round Up<sup>®</sup> flash (glyphosate 450 g/L, Monsanto) ou Corail<sup>®</sup> (tébuconazole 250 g/L, Bayer Cropsciences). Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau déminéralisée qui sert également de solution témoin. Les concentrations réelles des solutions de Cd et de Cu ont été mesurées par ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy*).

En fin d'exposition, généralement après 20 jours afin de prendre en compte les éventuels retards d'éclosion chez les œufs/embryons exposés aux contaminants, le pourcentage d'éclosion est déterminé ainsi que les paramètres écotoxicologiques courants, comme les Concentrations Efficaces inhibant 10 et 50% du succès d'éclosion ( $\text{CE}_{10}$  et  $\text{CE}_{50}$ ).

## **II.2.2. Modalités d'exposition**

Pendant les expériences réalisées au cours de cette thèse, deux modalités d'exposition ont été utilisées.

### **II.2.2.1. Exposition continue**

Cette 1<sup>ère</sup> modalité permet d'étudier les effets d'une exposition telle qu'elle peut se produire en milieu naturel quand l'humidité du sol est constante et que la solution du sol présente une concentration stable d'un contaminant non dégradabile (métaux par exemple). Pour les molécules organiques moins rémanentes, ce scénario permet de prendre en compte leur dégradation dans le milieu au cours de l'exposition. En exposition continue, les œufs sont incubés dans des boîtes de Pétri dont le fond est recouvert de papiers filtres imbibés de solutions contaminées sans renouvellement des papiers filtres au cours du bioessai. Le jour d'exposition au contaminant est appelé jour 0.

### **II.2.2.2. Exposition durant 24 heures**

Ce type de scénario mime une exposition se déroulant en milieu naturel avec une période d'exposition puis un lessivage des contaminants après une pluie par exemple. Dans ce scénario, la durée de l'exposition aux contaminants est fixe (24 h). Après cette étape, les œufs sont transférés sur du papier humidifié non contaminé.

Ce type d'exposition a été utilisé afin d'étudier la régulation des gènes des *MTs* chez les embryons qui ont été exposés à deux stades : 0 et 6 jours (Figure II-4). Après la fin de la ponte les œufs sont rapidement séparés en 2 groupes. Une partie est incubée avec les contaminants pour une durée de 24 heures (du jour 0 au jour 1) puis les œufs sont placés en conditions témoins jusqu'à l'éclosion (J1 à J20). Le reste de la ponte est incubée en conditions

témoins (0,8 mL d'eau osmosée) jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour de développement (début du stade larvaire) avant d'être exposé pendant 24 heures, c'est-à-dire jusqu'au jour 7. Les œufs sont ensuite incubés en conditions témoins jusqu'à l'éclosion (J7 à J20).

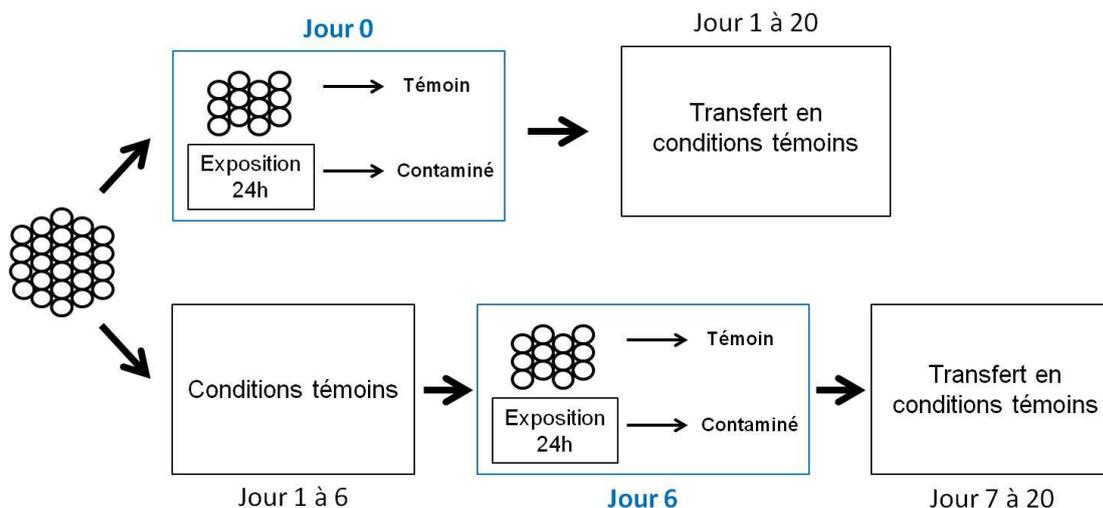


Figure II-4 : Scénario d'exposition de courte durée (24 heures)

## II.3. Prélèvements des œufs/embryons

Les œufs, exposés ou non, ont été utilisés pour plusieurs manipulations : dosage du Cd, suivi du développement, extractions d'acides nucléiques (ADN et ARN). Hormis pour les dosages de Cd, les œufs ont été disséqués afin d'observer le stade de développement de l'embryon et/ou de le prélever.

### II.3.1. Dosage des concentrations en cadmium dans les œufs

Les dosages ont été effectués dans des œufs entiers exposés à des concentrations en Cd de 40 µg/L, 4 ou 6 mg/L. Ces mesures ont été réalisées par ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry*), sur des groupes de 5 œufs afin d'être au-delà des limites de quantification du spectromètre de masse.

Pour l'exposition continue, les œufs ont été prélevés à J0, J3, J6, J10, J12, J15 et J20. Lors des expositions de 24 heures, les œufs ont été prélevés à J1, J6, J12 et J15 pour les exposés au jour 0 et à J7, J12 et J15 pour les exposés au jour 6.

### II.3.2. Suivi des paramètres de développement

Les travaux sur le suivi de ces paramètres pendant une exposition à 6 mg/L de Cd font l'objet du chapitre 1 de la partie Résultats de cette thèse. Le paragraphe suivant résume les critères de mesure utilisés.

Afin de suivre les paramètres relatifs au développement embryonnaire lors des expositions continues, les œufs sont tout d'abord disséqués. Leur coque calcaire est ouverte à l'aide d'un cutter puis retirée à l'aide d'une paire de pinces de dissection. Les embryons dans l'albumen sont ensuite observés sous microscope.

En exposition continue à 40 µg/L, 4 et 6 mg/L de Cd et à 0,5 g/L de Cu (2,5 g/L de BB), différents paramètres ont été suivis comme la taille des embryons après 3, 6 et 10 jours d'exposition. Les battements cardiaques ont été mesurés à J7. Les délais d'éclosion et les malformations des œufs non éclos ont été déterminés de J15 à J20. Enfin, la masse fraîche des jeunes éclos a été relevée.

### **II.3.3. Dissection des oeufs pour les analyses moléculaires**

Les différentes extractions d'acides nucléiques ont été réalisées sur des embryons en cours (âgés de moins de 12 jours) ou en fin de développement ou (âgés de 20 jours). Une étape délicate de dissection a été nécessaire concernant les oeufs afin de retirer la coque calcaire sans percer l'albumen et de pouvoir extraire l'embryon de l'albumen. Cette dernière étape étant primordiale pour éviter le surplus d'albumen qui peut colmater les colonnes d'extraction d'acides nucléiques. Les embryons âgés de moins de 6 jours ont été extraits de l'albumen à l'aide d'une micropipette. Pour les embryons plus âgés, les prélèvements ont été réalisés à l'aide de 2 paires de pinces de dissection préalablement stérilisées.

## **II.4. Etude de la génotoxicité des contaminants**

### **II.4.1. Extraction d'ADN**

L'ADN génomique a été extrait à partir d'embryons en cours de développement (depuis J1) jusqu'aux jeunes éclos (J20). Pour les embryons âgés de moins de 7 jours, les faibles quantités de matériel biologique (MF < 10 mg) ont nécessité l'emploi du kit d'extraction QIAamp® DNA Micro (Qiagen, Hilden, Germany). Pour les embryons les plus développés (âge > 7 jours) le kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germany) a été utilisé.

Les protocoles suivis sont ceux proposés dans les kits pour des extractions réalisées à partir de tissus animaux. Quelques étapes ont dû être optimisées pour obtenir des rendements et des qualités d'extraction suffisants pour les études post-extraction.

#### **II.4.1.1. Embryons jusqu'à 7 jours de développement**

Pour les embryons de moins de 7 jours le protocole du kit QIAamp<sup>®</sup> DNA Micro a été suivi avec quelques modifications. Afin d'obtenir des quantités suffisantes d'ADN, des nombres d'embryon différents ont été utilisés en fonction de leur stade de développement :

- 15 embryons de 0 à 1 jour
- 10 embryons de 2 à 3 jours
- 5 embryons de 4 à 5 jours
- 3 embryons de 6 à 7 jours

Après 15 sec d'homogénéisation (vortex) en présence de 180 µL de tampon de lyse et 20 µL de Protéinase K, les embryons sont incubés à 56°C pendant des durées variables afin d'optimiser la lyse des tissus:

- Embryons de 0 à 1 jour → 30 min
- Embryons de 2 à 3 jours → 45 min
- Embryons de 4 à 5 jours → 1 heure
- Embryon de 6 à 7 jours → 2 heures

Ensuite, les embryons sont une nouvelle fois homogénéisés durant 15 sec. Les ARNs sont dégradés après une incubation de 30 min à 37°C avec 1 µL de RNase A (100 mg/mL). La dernière étape de lyse est réalisée par ajout de 200 µL de tampon AL. Après homogénéisation des échantillons, 200 µL d'éthanol (96 – 100 %) froid (4°C) sont ajoutés. Les échantillons sont incubés 5 min à température ambiante. La totalité du mélange obtenu est transférée dans une colonne Dneasy Mini spin puis le tout est centrifugé 75 sec à 10 000 rpm. 500 µL de tampon de lavage sont ajoutés dans chaque colonne avant une nouvelle centrifugation (75 sec à 10 000 rpm). Un second lavage est réalisé avec 500 µL de tampon. Les colonnes sont ensuite séchées lors de 2 centrifugations successives (2 min à 14 500 rpm). L'élution de l'ADN est réalisée en 2 temps par ajout de 30 µL de tampon d'élution au centre de la colonne. Les échantillons sont incubés 5 min à température ambiante puis centrifugés 1 min à 14 500 rpm afin de récupérer l'ADN fixé sur la résine. La seconde partie de l'élution s'effectue avec 15 µL de tampon. Après élution, les échantillons sont conservés à -20°C.

#### **II.4.1.2. Embryons au-delà de 7 jours de développement**

Les quantités de matériel biologique de départ étant plus importantes, seuls 3 escargots sont regroupés pour former un échantillon dont la masse fraîche est comprise entre 15 et 30 mg. Un maximum de coquille des jeunes éclos est retirée afin d'éviter le colmatage des colonnes fixatrices d'ADN. Les mêmes volumes de tampon de lyse tissulaire et de protéinase

K que précédemment sont utilisés. Cependant, la lyse s'effectue sur une nuit. Le lendemain, les tubes sont centrifugés 2 min à 14 500 rpm pour culotter les débris tissulaires et ne prélever que 170  $\mu$ L de surnageant. Les étapes suivantes sont les mêmes que celles du kit DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue. L'élution finale a également lieu en deux phases : la première est réalisée avec 70  $\mu$ L de tampon d'élution et la seconde avec 40  $\mu$ L. Une fois élué, l'ADN est conservé à -20°C.

#### II.4.1.3. Analyse qualitative et quantitative de l'ADN

Suite à l'extraction, la qualité de l'ADN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% (p/v) après coloration au bromure d'éthidium (BET). L'intégrité de l'ADN est confirmée lorsqu'il présente une taille proche de 20 kpb, sans fragment d'ARN résiduels aux alentours des 2 kpb (Figure II-5).

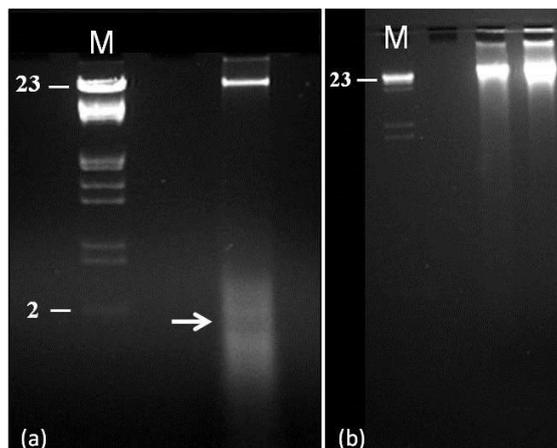


Figure II-5 : Exemple de résultats de la migration d'ADN sur gel d'agarose 1,5% (p/v)  
(a) La flèche blanche montre des fragments d'ARN au environ de 2 kpb élués avec l'ADN (b) ADN seul

Les échantillons d'ADN sont ensuite dosés par spectrophotométrie (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Le Nanodrop permet une quantification précise de l'ADN présent dans l'échantillon, il permet également d'estimer la pureté de l'échantillon grâce au ratio d'absorbance 260/280 nm.

#### II.4.2. Analyse de la génotoxicité par RAPD

Les paragraphes suivants résument les principales étapes d'optimisation de la méthode RAPD sur des embryons âgés de 20 jours après exposition en continu au Cd. La RAPD a été également utilisée pour évaluer la génotoxicité de 3 pesticides sur des embryons de 20 jours et sur des embryons en cours de développement exposés au Cd pendant 24 heures.

Le kit PuRe Taq Ready-To-Go PCR (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) a été utilisé. Il présente l'avantage de proposer des billes lyophilisées contenant les dNTPs, la

BSA et l'enzyme polymérase AmpliTaq™ ce qui permet de s'affranchir des étapes de mise au point avec ces 3 réactifs. Pour une réaction d'amplification, sont ajoutés dans un tube PCR, une bille du kit, 5  $\mu$ L d'amorces (5 pmol/ $\mu$ L), 40 ng d'ADN et de l'eau ultra pure (qsp pour 25  $\mu$ L) (Figure II-6).

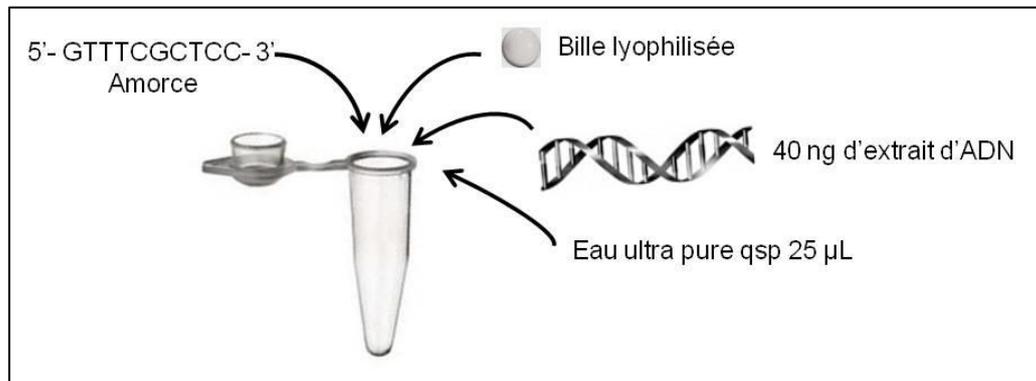


Figure II-6 : Différents réactifs utilisés lors d'une réaction RAPD

La quantité optimale de matrice ADN utilisée lors des réactions d'amplification a été déterminée lors d'un test préliminaire avec 4, 40 ou 400 ng d'ADN (Figure II-7). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une quantité de 40 ng (profils clairs, intensité et nombre de fragments obtenus satisfaisants).

#### II.4.2.1. Sélection des amorces nucléotidiques

16 amorces ont été testées (Tableau II-1) afin de sélectionner celles donnant, sur un échantillon témoin, des profils d'amplification satisfaisants : nombre de fragments suffisants (> 3) avec une bonne séparation et une forte reproductibilité (nombre de fragments identique chez les échantillons de même nature) afin de pouvoir réaliser des comparaisons de profils. Tous ces critères ont dans un premier temps été évalués après électrophorèse classique sur gel d'agarose. Cette approche a permis de sélectionner 2 amorces (X19 et OPG17) pour la recherche de signes de génotoxicité chez l'embryon après exposition continue au Cd. L'amorce Saad 2 a été utilisée pour l'étude des effets génotoxiques des pesticides.

Tableau II-1: Amorces testées lors des amplifications RAPD-PCR sur les embryons d'*Helix aspersa*.

Nom	Séquences
P 1 (Kit RTG RAPD)	GGTGCGGGAA
P 2 (Kit RTG RAPD)	GTTTCGCTCC
P 3 (Kit RTG RAPD)	GTAGACCCGT
P 4 (Kit RTG RAPD)	AAGAGCCCGT
P 5 (Kit RTG RAPD)	AACGCGCAAC
P 6 (Kit RTG RAPD)	CCCGTCAGCA
H 18	GAATCGGCCA
H 19	CTGACCAGCC
X 19	CCACCGCCAG
OPA 02	TGCCGAGCTG
OPB 08	GTCCACACGG
OPG 05	CTGAGACGGA
OPG 17	ACGACCGACA
Saad 2	GTGCTACGTC
Osama 5	GACCATCGTC
Essam 8	GCTCGAACTT

#### II.4.2.2. Analyse des profils

Après présélection d'une amorce par électrophorèse sur gel d'agarose, les profils d'amplification obtenus, sur 5 échantillons témoins différents (préparés à partir de 5 pontes différentes), sont analysés par un système d'électrophorèse capillaire haute résolution (SHR, système QIAxcel<sup>®</sup>, Hilden, Germany). Le SHR permet une séparation et une détection optimales des fragments constituant les profils d'amplification. Les images de migration obtenues sont de haute qualité comparées à celles issues d'une électrophorèse classique (Figure II-7 et Figure II-8).

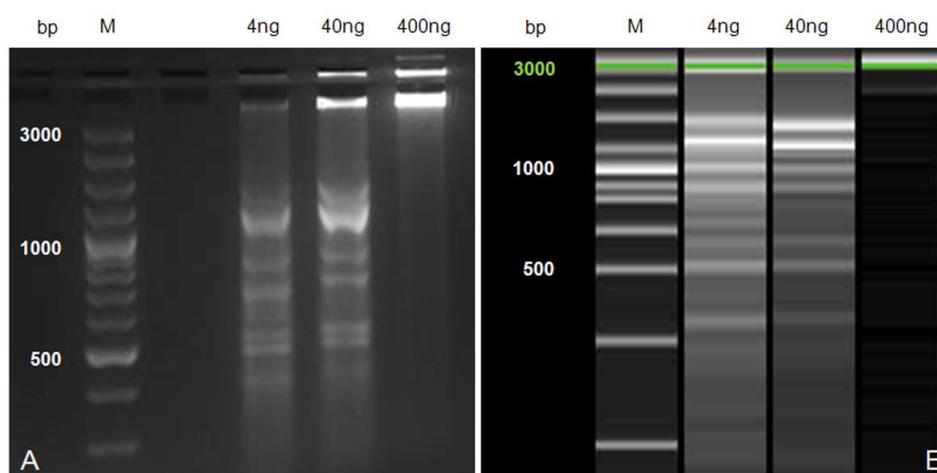


Figure II-7 : Différences de migration entre 2 systèmes d'électrophorèse.

A : système classique, B : système haute résolution, M : marqueur de taille en pb

Le SHR fournit également, en plus d'une image numérisée, un graphique appelé électrophérogramme qui représente la fluorescence détectée pour chaque fragment amplifié par l'appareil en fonction du temps de migration. Ce graphique est généralement composé de pics de fluorescence, chacun correspondant à un fragment composant un profil RAPD (Figure II-8A et B). Le logiciel bioinformatique relié au SHR permet aussi une détection de fragments après une étape de paramétrage (bornes inférieure et supérieure de taille pour chacun des fragments). Les résultats obtenus à partir de ce logiciel sont présentés sous forme d'une matrice binaire où 1 correspond à la présence d'un fragment et 0 à son absence (Figure II-8C). Cette caractéristique du SHR permet une automatisation de la lecture des profils ainsi qu'une analyse haut-débit des échantillons. Avec ce système, 12 échantillons migrent en 10 min sans préparation préalable. Le nombre maximal de lectures pendant une migration est de 96 (soit 1 h 30 min de migration). Les données d'analyse des profils sont disponibles quelques secondes après la fin de la migration des échantillons.

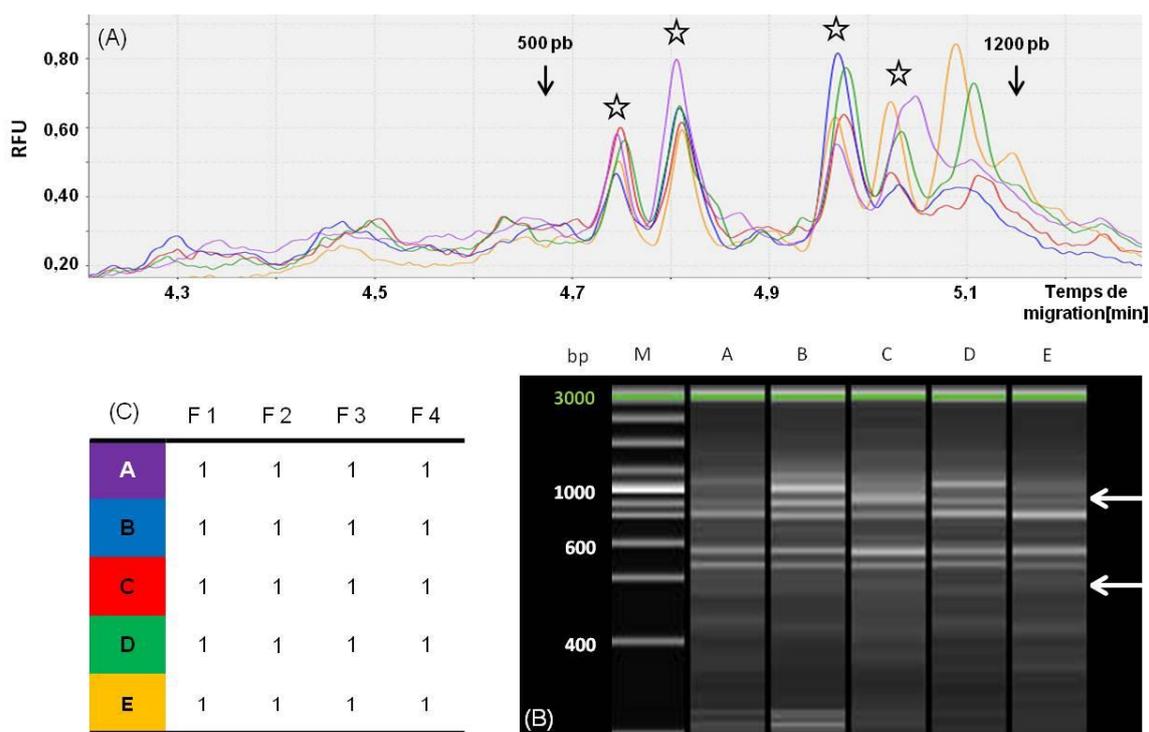


Figure II-8 : Données obtenues avec le Système d'électrophorèse Haute Résolution

(A) : électrophérogramme, (B) : image haute résolution et (C) : matrice de détection. L'explication détaillée de cette figure sera présentée dans le chapitre 4

Les 5 profils témoins obtenus vont permettre de créer un profil dit de référence qui servira aux comparaisons de profils entre les échantillons témoins et les échantillons exposés. Les fragments présents dans 100% des profils des 5 échantillons témoins sont retenus pour les analyses. Le détail de toutes les étapes de l'analyse des profils RAPD est donné dans le chapitre 2.

## II.5. Etude de l'expression des gènes des métallothionéines

L'étude portant sur les métallothionéines a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Professeur Dallinger au sein de l'Institut de Zoologie d'Innsbrück en Autriche lors de 2 séjours réalisés au cours de l'année 2013 (1 mois en Juillet et 15 jours en Novembre). Les prélèvements biologiques ainsi que la mise au point des extractions d'ARN sur embryon ont été effectués à Besançon. Les étapes suivantes (extraction des ARN, synthèse d'ADNc, étude de l'expression de gènes en qPCR) ont été effectuées à Innsbrück au cours des 2 séjours.

### II.5.1. Extraction d'ARN

Directement après les prélèvements, les embryons sont placés dans un liquide qui stabilise l'ARN (RNA later<sup>®</sup>, Ambion<sup>®</sup>) puis conservés à -20°C afin de préserver au mieux les échantillons avant leur transport jusqu'à Innsbrück.

Comme pour l'ADN, les extractions d'ARN ont été réalisées sur embryon en cours de développement (à partir de J1) jusqu'au jeune éclos (J20). Pour les embryons âgés de moins de 7 jours, les faibles quantités de matériel biologique ont nécessité l'emploi du kit RNeasy<sup>®</sup> plus Micro (Qiagen, Hilden, Germany). Les tissus embryonnaires ont été placés dans le tampon de lyse additionné de  $\beta$ -mercapto-éthanol puis homogénéisés par pipetage jusqu'à lyse complète des tissus. Pour les embryons les plus développés (âge > 7 jours), le kit RNeasy<sup>®</sup> Mini a été utilisé. La lyse des tissus pour ces embryons bien développés a été réalisée en deux temps, en broyant les embryons à l'aide d'un pilon en plastique, puis, par pipetage. Les protocoles classiques des 2 kits pour les tissus animaux ont été suivis.

#### II.5.1.1. Digestion de l'ADN génomique

A 20  $\mu$ L d'ARN élué sont ajoutés 2,5  $\mu$ L de tampon réactionnel 10X (Invitrogen), 2,5  $\mu$ L de DNase I (Invitrogen) et 1  $\mu$ L d'inhibiteur de RNase (RiboLock<sup>™</sup>, ThermoScientific). Après homogénéisation, les échantillons sont incubés à 25°C pendant 15 min. La digestion de l'ADN génomique est stoppée par ajout de 2,5  $\mu$ L d'EDTA et incubation à 65°C pendant 10 min.

La qualité de la digestion et l'intégrité des ARN sont vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % (p/v). Les fragments sont révélés aux UV après coloration au GelRed<sup>™</sup> (Biotum, Hayward, CA, USA).

### II.5.1.2. Quantification des ARN

La quantification précise des ARNs extraits a été réalisée via le kit RiboGreen® RNA quantification (Invitrogen). La quantité d'ARN est déterminée à l'aide d'une sonde qui s'intercale entre les bases d'acides nucléiques, le RiboGreen®, dont l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ARN présente dans l'échantillon. Les mesures ont été réalisées sur un lecteur microplaque VICTOR™ X4 2030 (Perkin Elmer). La relation entre la fluorescence et la quantité d'ARN est déterminée à l'aide d'une courbe étalon qui est réalisée avec des standards d'ARN de concentration connue (0,1 à 100 ng).

### II.5.2. Synthèse d'ADNc

L'ADNc simple brin a été synthétisé avec le kit M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase (Invitrogen). La synthèse a été réalisée en 3 étapes.

#### II.5.2.1. Hybridation des amorces

Chaque réaction est réalisée à partir de 250 ng d'ARN avec 2,5 µL d'amorces Random Hexamer (Fermentas) et d'eau DEPC pour un volume final de 27,5 µL. Les échantillons sont incubés durant 5 min à 70°C dans un thermocycleur (Mastercycler Gradient, Eppendorf).

#### II.5.2.2. Transcription

Les volumes des réactifs présentés dans le tableau ci-après (Tableau II-2) sont ajoutés aux échantillons après l'hybridation pour obtenir un volume final de 50 µL. Des échantillons dépourvus d'enzyme RevertAid™ H Minus M-MLV (Fermentas) servent de contrôle négatif.

Tableau II-2 : Réactifs utilisés pour la synthèse ADNc

<b>Réactifs</b>	<b>Volume pour une réaction</b>
5X reaction MuLV RT buffer	10 µL
dNTP's	5 µL
RiboLock™ (inhibiteur de RNase)	1,25 µL
Eau DEPC	5,75 µL
Enzyme RevertAid™ H Minus M-MLV	0,5 µL

#### II.5.2.3. Synthèse

Les échantillons sont incubés dans un thermocycleur (Mastercycler Gradient, Eppendorf), en utilisant le programme ci-dessous puis ils sont conservés à -20°C jusqu'aux étapes suivantes (Tableau II-3).

Tableau II-3 : Programme utilisé pour la synthèse d'ADNc

Etapes	Température [°C]	Temps [min]
Hybridation	25	10
Extension	42	60
Extension finale	70	10

### II.5.3. Mesures d'expression des gènes par PCR en temps réel

Les mesures d'expression des 3 isogènes des *MTs* ont été réalisées par PCR en temps réel dans les mêmes conditions que lors des travaux sur les adultes d'*H. aspersa* de Höckner et al. (2011). Chaque mesure sur un échantillon a été réalisée en triplicat afin d'obtenir des résultats fiables et d'éviter les erreurs de quantification dues au pipetage. Chaque valeur obtenue est donnée par la moyenne des 3 valeurs mesurée (1 par triplicat) pour un même échantillon.

Un thermocycleur de type 7500 Real Time PCR System (AB applied Biosystems, USA) a été utilisé avec le kit Power SYBR<sup>®</sup>Green (AB applied Biosystems, USA). Pour l'ensemble des réactions PCR, pour chacune des 3 isoformes de *MTs*, les différents couples d'amorces spécifiques à chaque gène ont été utilisés à une concentration optimale. Le tableau ci-dessous (Tableau II-4) donne les informations concernant ces amorces.

Tableau II-4 : Séquence et concentration optimale des amorces spécifiques des 3 gènes des métallothionéines utilisées en qPCR

Amorce	Concentration [nM]	Taille de l'amplicon (pb)	Séquence
<i>CdMT</i> sens	300	56	5'-GCC GCC TGT AAG ACT TGC A-3'
<i>CdMT</i> antisens	900		5'-CAC GCC TTG CCA CAC TTG-3'
<i>CuMT</i> sens	900	74	5'-AAC AGC AAC CCT TGC AAC TGT-3'
<i>CuMT</i> antisens	900		5'-CGA GCA CTG CAT TGA TCA CAA-3'
<i>CdCuMT</i> sens	900	59	5'-TGT GGA GCC GGC TGT TCT-3'
<i>CdCuMT</i> antisens	300		5'-CAG GTG TCA TTG TTG CAT TGG-3'

Un pré-mix est ensuite réalisé pour chacun des 3 couples d'amorces. Pour un échantillon, 2 µL de BSA 10X (Sigma-Aldrich, USA) sont ajoutés à 2 µL d'amorce sens, 2 µL d'amorce antisens (chacune à la concentration optimale) et 2 µL d'eau ultra pure.

Des plaques 96 puits ont été utilisées pour les mesures. 10 µL de Power SYBR<sup>®</sup>Green ont été distribués par puits puis 8 µL de pré-mix. Enfin, 2 µL d'ADNc ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite recouverte d'un film adhésif (MicroAmp<sup>®</sup>, AB applied Biosystems, USA) afin d'éviter l'évaporation durant la PCR. Le programme d'amplification présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau II-5) a été utilisé :

Tableau II-5 : Programme d'amplification utilisé en qPCR

Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	40

Les résultats bruts obtenus suite aux amplifications par PCR quantitative sont exprimés en Ct (*Cycle Threshold* ou cycle seuil), ce dernier étant déterminé automatiquement par le thermocycleur. Le Ct correspond au cycle d'amplification à partir duquel le signal de fluorescence mesuré (en début de phase exponentielle) est statistiquement différent du bruit de fond. L'efficacité des réactions PCR a été également déterminée automatiquement pour chacun des 3 couples d'amorces (95% à 99%). Des travaux antérieurs (mémoire de master réalisé à Innsbruck) effectués à l'aide de courbes standards ont permis de déterminer les relations linéaires existantes entre le logarithme du nombre de copies du gène initialement présentes dans l'échantillon et le Ct mesuré pour chacun des 3 gènes des *MTs* (Figure II-9, pour le gène *CdMT*). Les valeurs de Ct moyen sont calculées à partir des triplicats pour chacun des échantillons. Le Ct moyen est ensuite converti en logarithme du nombre de copies du gène initialement présent dans l'échantillon à partir des relations déterminées grâce à la gamme étalon. Ces relations sont données dans la Figure II-10 pour chacun des 3 gènes étudiés. Les résultats sont finalement exprimés en nombre de copies d'ARN/10 ng d'ARN total.

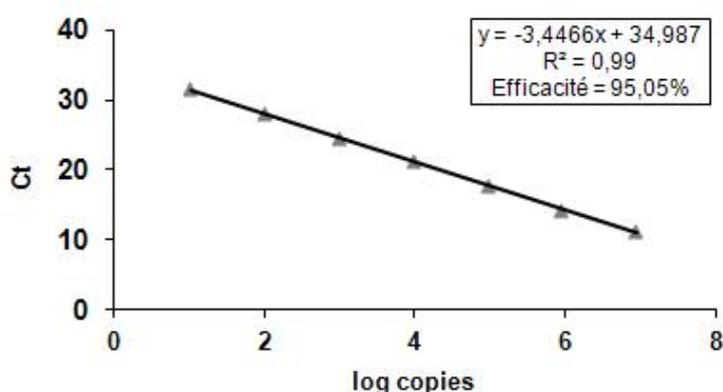


Figure II-9 : Courbe standard pour le gène *CdMT*

Ct : cycle seuil