

I. Introduction

Les effets xénoestrogéniques et transgénérationnels chez l'huître creuse du Pacifique (*Crassostrea gigas*) ont été directement corrélés à la présence du polluant aquatique nonylphénol, largement répandu dans l'environnement [1]. La présence d'autres polluants xénoestrogéniques peut ainsi être évaluée en utilisant la vitellogénine, une protéine précurseur du vitellus, comme biomarqueur [2]. Afin de mieux contextualiser l'utilisation de ce biomarqueur, il est pertinent d'étudier les mécanismes par lesquels les œstrogènes induisent la vitellogenèse chez les mollusques [2].

Le clonage moléculaire est une technique permettant de générer une population d'organismes portant une même molécule d'ADN recombinant [3]. Cette méthode a déjà été utilisée pour modéliser la réponse aux œstrogènes. Par exemple, dans une étude menée par Zhang et al. (2011), les chercheurs ont isolé l'ADNc de la vitellogénine chez le carpe mâle (*Cirrhinus molitorella*) afin d'étudier son expression suite à une exposition à l'hormone stéroïde 17β-estradiol [4]. Dans une autre étude réalisée par Osada et al. (2014), une équipe a cloné et caractérisé des ADNc complets codant pour différentes isoformes de vitellogénine chez le loche du Japon (*Misgurnus anguillicaudatus*), ce qui leur a permis de quantifier l'expression de la vitellogénine en réponse à des composés œstrogéniques [5].

Cette expérience a pour objectif de détailler plusieurs étapes du clonage moléculaire, et en particulier le clonage moléculaire de l'ADNc codant la vitellogénine de *Crassostrea gigas*.

II. Matériel et méthodes

Partie I : Manipulation de l'ADN plasmidique

A. Protocole d'Extraction d'ADN

Une souche *E. coli* contenant le plasmide pGEM-T Easy vector (*Annexe 2*), possédant déjà l'ADNc de l'huître (*Annexe 1*), a été cultivée toute une nuit à 37 °C sous agitation dans un milieu LB supplémenté en ampicilline, à partir d'une seule colonie. Sur 4 mL de culture, deux prélèvements successifs de 1,4 mL ont été centrifugés à 15 000 rpm pendant 1 minute, en ne conservant que le culot bactérien à chaque fois. Le culot final est resuspendu dans 200 µL de tampon MP1 (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) à température ambiante, puis incubé 5 minutes. La lyse est effectuée avec 400 µL de MP2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS), suivie d'une incubation de 5 minutes sur glace. Ensuite, 300 µL de MP3 (acétate de potassium 3 M, pH 4,6) sont ajoutés pour précipiter les protéines, avec une incubation de 5 minutes sur glace. Après centrifugation pendant 10 minutes à 13 000 rpm, 400 µL du surnageant contenant l'ADN plasmidique est transféré dans un nouveau tube. L'ADN est précipité avec 800 µL d'éthanol 95 %, incubé 5 minutes à température ambiante, puis centrifugé 10 minutes. Le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol 70 %, centrifugé 5 minutes, puis séché à l'air libre. Enfin, l'ADN est resuspendu dans 30 µL d'eau RNase (1/500e), incubé 30 minutes à 37 °C. La concentration d'ADN est mesurée par nano-spectrométrie à 260 nm.

B. Protocole de la Restriction enzymatique

Une restriction enzymatique est réalisée avec EcoRI en ajoutant dans un tube 6 µg d'ADN plasmidique extrait précédemment (dilué au 1/20ème), 1 µL de tampon 10X, 1 µL d'EcoRI et 2 µL d'eau autoclave. La solution est ensuite incubée pendant 1-2 heures à 37°C puis gardée à -20°C.

C. Protocole de l'Amplification par PCR

Les spécificités des amorces utilisées pour la PCR (Polymerisation Chain Reaction) sont présentées en Annexe (*Annexe 3*).

Dans un microtube de 0,5 mL sont ajoutés 1,7 µL d'eau H₂O, 2,5 µL d'ADN (10 ng/µL), 5 µL d'amorce sens (1 µM), 5 µL d'amorce antisens (1 µM), 5 µL de mélange dNTPs (1mM), 5 µL de tampon 5X (contenant 7,5 mM de MgCl₂), et 0,8 µL de GoTaq ADN polymérase (1U/µL). Le tube est ensuite centrifugé pendant quelques secondes puis placé dans l'appareil PCR. Lorsque la PCR est terminée, le tube est conservé à -20°C.

Partie II : Analyse du fragment d'ADN amplifié et plasmidique

A. Protocole de la transformation et sélection bactérienne

Des bactéries *E.coli* DH5α ont été rendues compétentes par traitement au CaCl₂ en vue d'une transformation par choc thermique. Stockées à -80 °C, elles ont été décongelées lentement sur glace. Les caractéristiques et propriétés du plasmide pGEM-T sont présentées en annexe (*Annexe 2*). La solution d'ADN utilisée pour la transformation correspond à une solution d'ADN plasmidique diluée au 1/20e, préparée au préalable.

1 µL d'ADN plasmidique recombinant (10-20 ng) est transféré dans un tube de 1,5 mL pré-refroidi, puis placé sur glace. Ensuite, 25 µL de cellules compétentes sont ajoutés, et le mélange est incubé sur glace pendant 20 minutes. Le tube est ensuite transféré dans un bain-marie à 42 °C pendant 20 secondes (choc thermique), puis replacé sur glace pendant 2 minutes. Puis, 1 mL de SOC est ajouté à température ambiante. La suspension bactérienne est homogénéisée, puis incubée pendant 45 minutes à 37°C. Après l'incubation, 100 µL de bactéries transformées sont étalés sur boîte LB/agar contenant de l'ampicilline (Boîte n°1). Le reste de bactéries transformées est centrifugé pendant 1 minute à 12 000 rpm. Le surnageant est éliminé, et le culot est

remis en suspension dans 150 µL de SOC stérile. 100 µL de cette solution sont ensuite étalés sur une seconde boîte LB/agar contenant de l'ampicilline (Boîte n°2). Les boîtes sont placées à l'étuve à 37°C jusqu'au lendemain, puis conservées à 4°C.

Toutes les étapes doivent être réalisées dans des conditions stériles : l'utilisation du bec Bunsen est donc obligatoire.

B. Protocole d'Analyse de la réaction de PCR et de l'ADN plasmidique

Les gels d'électrophorèse sont préparés en coulant un gel 1% d'agarose contenant 3 µL de Gel Red 1X et 0,3 g d'agarose dans du tampon TAE (Tris Acétate EDTA) 1X

Différents échantillons sont préparés dans des tubes de 1,5 mL en vue de l'analyse par électrophorèse. Le marqueur de taille (WM, échelle d'ADN de 1kb de Promega™) est préparé en mélangeant 5 µL de marqueur (0,5 µg/µL) avec 1 µL de solution de dépôt 6X. Le produit PCR est utilisé tel quel en prélevant 10 µL de la réaction préparée précédemment. Pour l'échantillon d'ADN plasmidique extrait, 10 µL d'ADN sont mélangés avec 2 µL de solution de dépôt 6X. Concernant l'échantillon d'ADN plasmidique digéré par EcoRI, 10 µL d'ADN digéré sont également mélangés avec 2 µL de solution de dépôt 6X. Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits d'un gel d'agarose. La migration est réalisée à 80 V pendant 30 à 45 minutes. Le gel est ensuite observé sous lumière UV pour analyser les bandes d'ADN.

III. Résultats et discussion

A. La quantité d'ADN plasmidique extraite déterminée par nano-spectrophotomètre

D'après le nano-spectromètre, la concentration d'ADN obtenue est de 3444,1 ng/µL, ce qui est très élevée, indiquant une extraction efficace avec une quantité importante d'ADN.

De plus, le ratio A260/A280, indicateur de la pureté de l'échantillon, est de 2,080, ce qui est supérieur à la valeur attendue d'environ 1,8 pour de l'ADN pur.

Cela suggère la présence résiduelle d'ARN dans l'échantillon. Cette contamination pourrait être due à une homogénéisation insuffisante, limitant l'efficacité de la RNase, ou à une élimination incomplète du surnageant, laissant de l'ARN en solution avec l'ADN.

B. Lecture de la culture des bactéries E.coli transformées

Les bactéries ont été étalées sur une gélose LB/ agar contenant de l'ampicilline pour permettre la sélection des bactéries transformées. En effet, le plasmide pGEM-T utilisé pour la transformation contient un gène de résistance à l'ampicilline. Ainsi, seules les bactéries ayant intégré ce plasmide pourront se multiplier en présence de l'ampicilline.

Ainsi, après incubation, la compétence des bactéries obtenue pour la première boîte (*Figure 2*) est estimée à 56 000 colonies/ μ g d'ADN, calculée à partir de l'observation de 56 colonies pour 100 μ L. En revanche, les colonies présentes sur la deuxième boîte (*Figure 3*), sont non dénombrables, car elles sont trop nombreuses et forment un tapis bactérien continu, empêchant une délimitation individuelle (voir les cultures et le calcul de compétence en *Annexe 4*).

C. Résultats de l'électrophorèse

Le gel d'électrophorèse (*Annexe 6*) a été partagé entre deux groupes. Seuls les résultats en rouge concernent cet article. Les résultats du groupe rouge montrent la perte d'un puits (x), due à une erreur de pipetage. Dans la bande A1 du groupe rouge, une bande brillante apparaît autour de 2 000 pb, bien que la taille attendue du plasmide soit d'environ 3 515 pb (3 015 pb pour l'épine dorsale + ~500 pb d'insertion). Cette différence s'explique probablement par la mobilité électrophorétique accrue de l'ADN plasmidique superenroulé [6]. La bande A2 du groupe rouge est très faible, expliquée par un endommagement du gel lors du dépôt, ce qui a dilué l'échantillon. Néanmoins, deux bandes faibles sont visibles : l'une près de 3 000 pb (plasmide linéarisé) et l'autre près de 500 pb (insertion excisée), ce qui est cohérent avec une digestion réussie. La bande PCR

présente une forte intensité à 500 pb, ce qui correspond à la taille attendue de l'amplicon. D'autres bandes plus faibles, situées au-dessus et en dessous de cette région, pourraient correspondre respectivement à des amorces résiduelles (fragments plus petits) et à des complexes d'ADN liés à la polymérase (fragments plus grands).

D. Synthèse des résultats

Les données issues de la spectrophotométrie indiquent une concentration élevée d'ADN, accompagnée d'une légère contamination. Les résultats de l'électrophorèse sont cohérents avec une digestion correcte de l'ADN recombinant ainsi qu'une amplification efficace de l'amplicon. Après la mise en culture, la compétence des bactéries a été estimée à 56 000 colonies/ μ g. L'ensemble de ces résultats est conforme aux attentes d'un protocole réussi. Il peut donc être conclu que ce protocole de clonage moléculaire de l'ADN codant pour la vitellogénine est efficace.

Des résultats inattendus sont fréquents dans ce domaine et peuvent résulter de divers facteurs : erreurs de manipulation (comme percer un gel), protocole erroné (utilisation involontaire d'un mauvais plasmide), ou remise en question d'une théorie existante (par exemple, la découverte qu'un gène peut coder plusieurs protéines [7]). Une compréhension approfondie du protocole, la présence d'un témoin, ainsi que la reproductibilité des résultats (au moins trois fois) permettent de limiter ces imprévus.

Pour vérifier que l'ADN cloné correspond bien à la vitellogénine, un séquençage du plasmide peut être réalisé afin de confirmer sa séquence exacte. Une alternative plus économique consiste à effectuer une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps spécifique de la vitellogénine, suivie d'une analyse par Western blot afin de confirmer le poids moléculaire attendu de la protéine.

Pour les expériences visant à détecter la présence de perturbateurs endocriniens œstrogéniques via les niveaux de vitellogénine, des bactéries exprimant la vitellogénine clonée peuvent être utilisées comme

témoin positif afin de garantir la fiabilité des résultats.

IV. Bibliographie

[1] Helen E. Nice et al. Long-term and transgenerational effects of nonylphenol exposure at a key stage in the development of *Crassostrea gigas*. Possible endocrine disruption? Volume 256, 2003, pg 293-300, ISSN: 1616-1599

[2] Tran TK, MacFarlane GR, Kong RY, O'Connor WA, Yu RM. Mechanistic insights into induction of vitellogenin gene expression by estrogens in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. *Aquat Toxicol.* 2016 May;174:146-58. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.02.023. Epub 2016 Mar 2. PMID: 26963518.

[3] Alessandro Bertero, Stephanie Brown, Ludovic Vallier, Chapter 2 - Methods of Cloning, Editor(s): Morteza Jalali, Francesca Y.L. Saldanha, Mehdi Jalali, Basic Science Methods for Clinical Researchers, Academic Press 2017, Pages 19-39, ISBN 9780128030776, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00002-3>.

[4] Liang, Y., Fang, Z. Molecular cloning and mRNA expression of the vitellogenin and nuclear receptor gene induced by 17 β -estradiol in the mud carp, *Cirrhinus molitorella*. *Ecotoxicology* 21, 719–729 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0831-x>

[5] Meiqin Wu, Osamu Nishimiya, Misato Nakamori, Kiyoshi Soyano, Takashi Todo, Akihiko Hara, and Naoshi Hiramatsu "Molecular Cloning and Characterization of the Expression Profiles of Vitellogenin Transcripts in the Dojo Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in Response to 17 α -Ethinylestradiol and 17 β -Estradiol Administration," *Zoological Science* 31(4), 202-212, (1 April 2014). <https://doi.org/10.2108/zs130223>

[6] Hightower RC, Santi DV. Migration properties of circular DNAs using orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 1989 May-Jun;10(5-6):283-90. doi: 10.1002/elps.1150100503. PMID: 2670543.

[7] Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Aug;74(8):3171-5. doi: 10.1073/pnas.74.8.3171. PMID: 269380; PMCID: PMC4314

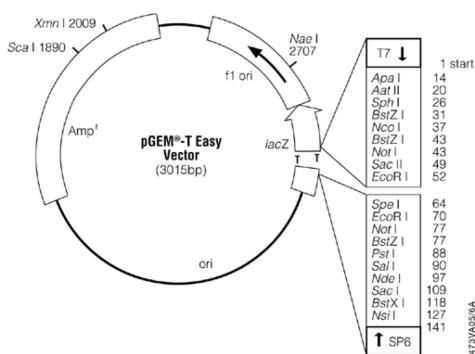
Annexe

Annexe 1 : séquence partielle de l'ADNc codant pour la vitellogénine d'huître creuse

Source : GenBank: AB084783.1, 5023 pb (La région amplifiée par PCR)

```
CGGAATACCTATGGGGAGCACGATTTATTCGGAATGAAATGAAGTCCGACGTCAGGATCCAGTTCGGTCCCGCTCGTCCGTACCTTGAAG
ATGGACAAGTTGACCTTTGCAAGATCAACGACCCCTATAGAGTCGGTGGACCCGACCCAGCAGCAGGTGCCCGCGGAGATGTTCCAGCCCTTA
CGGGGAGGGATGCCGAGCAGATGCTGACGGACCTGTCCAGACCTATCAACTTCAGGTACGTCGCGGCAACGTTAAGGATATCCACCACGAAGC
AGACGATCCGGAATGGTCCGTTAACGTGAAGAAAGGTTCTGCTCAGTATGCTGGAGATGAACCTTGAGAAGAGGAAGGAAGTACAGAAAAAGCGGC
GTGATTCGCAAGTTCTCCGTCCGACGTCCTTCTGACGAAGGTTCAATGTTTCACAGTCATGGAGCCCGACATCGTCGGGGAGTGTGAGACGCTGT
AC AGAATCAGTCCTTGGACCTCCACCAGTGCTAA
```

Annexe 2 : Les caractéristiques et propriétés du plasmide pGEM-T



Le plasmide pGEM-T Easy a une taille de 3015 paires de base. Il possède une origine de réplication, un gène de résistance à

l'ampicilline, ainsi qu'un site multiple de clonage (SMC) situé dans un gène rapporteur lacZ, codant pour la β -galactosidase.

Ce plasmide a été conçu pour le clonage des produits PCR. Il est fourni sous forme linéaire ouverte, préalablement coupé par l'enzyme *EcoRV*, qui crée des extrémités franches. Ensuite, une adénine (A) est ajoutée à l'extrémité 3' des produits PCR par la Taq polymérase, une enzyme utilisée en PCR mais qui fait des erreurs. Pour permettre une bonne hybridation, le plasmide pGEM-T est modifié pour porter une thymidine (T) en 3' à chaque extrémité.

Ce procédé, appelé TA cloning, repose sur la liaison spécifique entre l'adénine (A) du fragment PCR et la thymidine (T) du plasmide. Ce qui permet une insertion plus facilement du fragment PCR dans le plasmide, sans avoir besoin d'utiliser des enzymes de restriction supplémentaires

Annexe 3 : Les spécificités des amorces utilisées pour la PCR

	Séquence	3-4 GC dans les 5 derniers nucléotides	Pourcentage de GC	Tm
Amorce sens	5'-CGGAATACC TATGGGAG-3'	Oui	55%	56°C
Amorce anti-sens	5'-TTAGCACTG GTGGAGGTC-3'	Oui	55%	56°C

Annexe 4 : Les cultures et le calcul des compétences

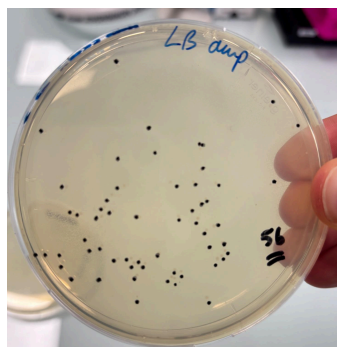


Figure 2 : Croissance bactérienne d' E.coli DH5a transformées sur gélose LB/agar et ampicilline (Boîte n°1) placée à l'étuve à 37 °C pendant 24h. Observation de 56 colonies issues de 100 µL de suspension bactérienne transformées.

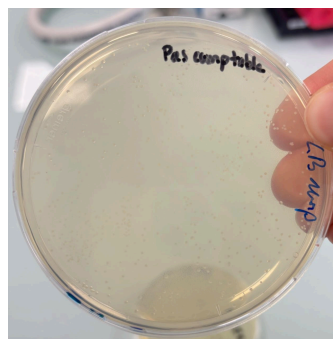


Figure 3 : Croissance bactérienne d' E.coli DH5a transformées sur gélose LB/agar et ampicilline (Boîte n°2) placée à l'étuve à 37 °C pendant 24h. Colonies non dénombrables en raison d'un nombre trop élevé, formant un tapis bactérien

Calcul de la compétence :

$$\text{Compétence bactérienne (en colonies/}\mu\text{g d'ADN)} = \frac{\text{Nombre de colonies obtenues} \times \text{Volume final } (\mu\text{L})}{\text{quantité d'ADN } (\mu\text{g}) \times \text{volume étalé } (\mu\text{L})}$$

Pour la première boîte :

- Nombre de colonies observées : 56 colonies pour 100 µL étalés
- Volume final après l'ajout de SOC : 1000 µL (1 mL)
- Quantité d'ADN plasmidique utilisée : entre 10 et 20 ng. 10 ng a été choisi pour simplifier le calcul.

$$\text{Ainsi: Compétence (colonies/}\mu\text{g)} = \frac{56 \times 1000 (\mu\text{L})}{0,01 (\mu\text{g}) \times 100 (\mu\text{L})} = \mathbf{56\ 000\ colonies / \mu g}$$

Eason Gregoire-Mazzocco¹ et Nelly Lesage¹

Faculté Sciences et Sciences de l'Ingénieur, Université Bretagne sud, Centre d'enseignement et de recherche Yves Coppens¹

Annexe 5 : Les résultats de l'électrophorèse

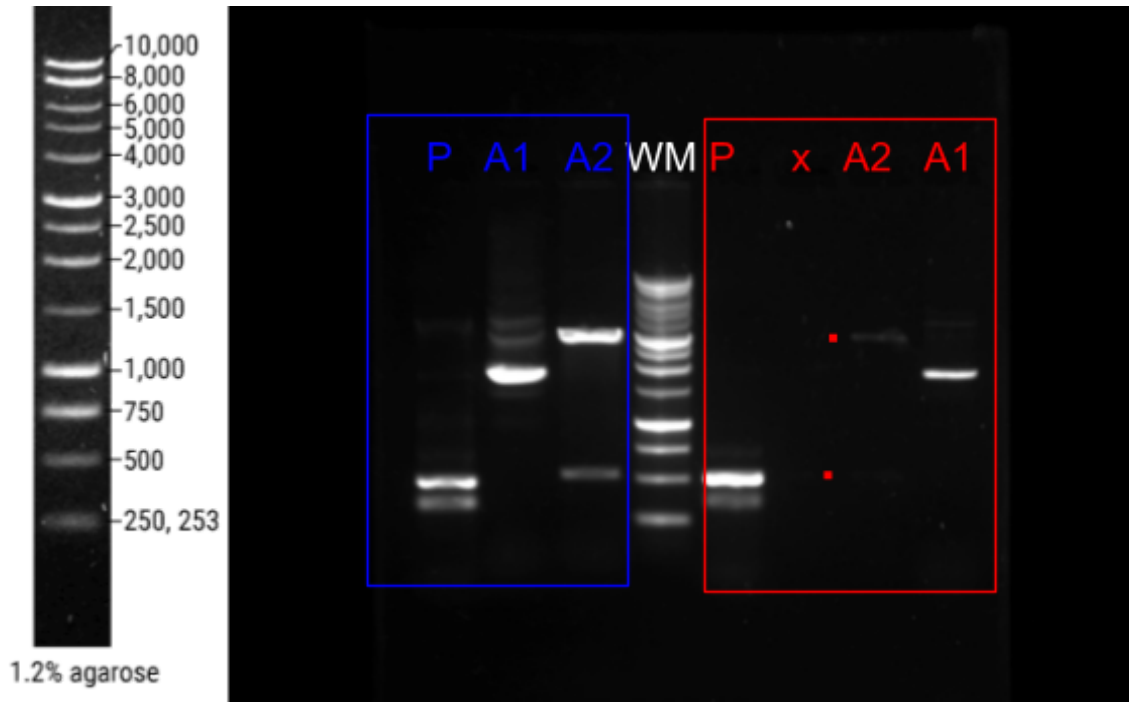


Figure 1 : Image du gel contenant les résultats de l'électrophorèse de deux groupes de l'expérience. Le groupe responsable de cet article est en rouge, l'autre groupe de référence est en bleu. WM : échelle d'ADN de 1kb de Promega™ (Tableau de référence à gauche), P : produit de la PCR, A1 : ADN non digéré, A2 : ADN digéré, x : puit percé lors du pipetage. Des points rouges sont placés dans le puits A2 pour faciliter la visualisation.

Annexe 6 : Organigramme des étapes du clonage moléculaire

