

Université de Montréal

Étude du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I chez l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) et la résistance à *Aeromonas salmonicida*

Par

Richard Nassif

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de M. Sc. en Microbiologie et Immunologie

Avril, 2007

© Richard Nassif, 2007





## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I chez l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) et la résistance à *Aeromonas salmonicida*

Présenté par :

Richard Nassif

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

George Szatmari

Président-rapporteur

Pierre Belhumeur

Directeur de recherche

Louis Bernatchez

Codirecteur

Hugo Soudeyns

Membre du jury

## Table des matières

Table des matières.....	iii
Abréviations.....	vi
Remerciements.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Résumé.....	xii
Abstract.....	xiii
<b>1 Revue de la littérature.....</b>	<b>1</b>
1.1 Système immunitaire des poissons.....	1
1.1.1 Principaux organes et organisation structurale.....	1
1.1.1.1 Tissu lymphoïde associé à l'intestin.....	1
1.1.1.2 La rate.....	1
1.1.1.3 Le thymus.....	2
1.1.1.4 Le rein.....	3
1.1.2 Défense non spécifique.....	3
1.1.2.1 Défense non spécifique cellulaire : inflammation et phagocytose.....	3
1.1.2.2 Défense non spécifique humorale.....	4
1.1.3 Défense spécifique.....	6
1.1.3.1 Défense spécifique cellulaire.....	6
1.1.3.2 Défense spécifique humorale.....	7
1.1.3.3 Mémoire immunologique.....	8
1.1.3.3.1 Structure des anticorps.....	8
1.1.3.3.2 Variétés d'anticorps.....	10
1.1.4 Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).....	10
1.1.4.1 Général.....	10
1.1.4.2 Structure du CMH de classe I et de classe II.....	11
1.1.4.3 Évolution du CMH : la théorie biologique et la théorie mitochondriale ..	12
1.1.4.4 Forces qui conduisent à la diversité du CMH.....	13
1.1.4.4.1 Par le biais des pathogènes : l'avantage hétérozygote et l'avantage de l'allèle rare.....	13
1.1.4.4.2 Par le biais de la reproduction : l'hypothèse de la cible mouvante et celle de la répulsion reproductive.....	14

1.1.4.5	CMH et résistance aux infections .....	14
1.1.4.5.1	Survivre grâce à la présence d'un allèle en particulier .....	14
1.1.4.5.2	Survivre grâce à la diversité du CMH (hétérozygote) .....	15
1.1.4.5.3	Autres corrélations entre allèles du CMH et résistance .....	16
1.2	<i>Aeromonas salmonicida</i> .....	16
1.2.1	Général .....	16
1.2.2	Facteurs de virulence .....	17
1.2.2.1	La couche S et LPS .....	17
1.2.2.2	Glycerophospholipide cholestérol acyltransferase (GCAT) .....	19
1.2.2.3	Toxine ADP-ribosylante .....	19
1.2.2.4	Autres toxines .....	20
1.2.3	Furonculose .....	21
1.2.3.1	Généralités .....	21
1.2.3.2	Les trois niveaux d'infection : au niveau de la pisciculture, du bassin et du poisson. ....	21
1.2.4	Traitement de l' <i>Aeromonas salmonicida</i> .....	24
1.2.4.1	Antibiotiques .....	24
1.2.4.2	Vaccination passive et vaccination active .....	25
2	Objectifs de recherche .....	28
3	Matériel et méthodes .....	29
3.1	Maintien, infection des poissons et étude des allèles .....	29
3.1.1	Ombre de fontaine (souche Rupert), conservée à l'Université Laval .....	29
3.1.2	Extraction de l'ADN génomique .....	33
3.1.3	Amplification des introns flanquant la région de la niche peptidique du CMH de classe I .....	33
3.1.4	Amplification des exons de la région de la niche peptidique .....	36
3.1.5	Études des allèles via la technique du « Single Strand Conformational Polymorphism » .....	37
3.1.6	Extraction de l'ADN des bandes découpées sur gel et réamplification .....	38
3.1.7	Purification sur gel d'agarose, découpage des bandes et clonage .....	39
3.1.8	Minipreps .....	39
3.1.9	Séquençage des allèles du CMH classe I domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ .....	40
3.1.10	Étude des descendants .....	40
3.1.11	Analyse statistique .....	41
4	Résultats .....	43
4.1	<i>Salvelinus fontinalis</i> , souche Rupert .....	43
4.1.1	Détermination de la séquence exacte des introns de la niche peptidique .....	43
4.1.2	Technique du SSCP .....	45
4.1.3	Allèles du CMH de classe I $\alpha 2$ et $\alpha 1$ .....	46
4.1.4	Analyse statistique .....	48

5	Discussion.....	53
5.1	CMH classe II de l'omble de fontaine (souche Rupert) et la résistance face à <i>A. salmonicida</i> .....	53
5.2	CMH de classe I et la résistance de l'omble de fontaine de souche Rupert face à <i>A. salmonicida</i> .....	53
5.3	Analyse statistique .....	57
6	Conclusion .....	62
7	Références.....	63
	Annexe I.....	xiv
	Extraction de l'ADN avec le kit Millipore .....	xiv
	Annexe II .....	xvi
	Extraction de la Taq polymérase maison .....	xvi

## **Abréviations**

- CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- GCAT : Glycérophospholipide Cholestérol AcylTransférase
- LPS : Lipolysaccharide
- LARSA : Laboratoire Régional des Sciences Aquatiques
- SSCP : Single Strand Conformational Polymorphism
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- dNTP : DeoxyriboNucleotide TriPhosphate
- T<sub>4</sub>PNK : PolyNucleotide Kinase du phage T4
- ATP : Adénosine TriPhosphate
- °C : Degré Celsius
- μCi : MicroCurie
- μl : MicroLitre
- TBE : Tris-Borate-EDTA
- EDTA : EthyleneDiamine Tetraacetic Acid
- mA : MilliAmpère
- EtBr : Ethidium Bromide

## Remerciements

Dans cette partie, j'aimerais remercier les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet, tout particulièrement :

- Le D<sup>r</sup> Pierre Belhumeur, professeur titulaire au Département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, pour m'avoir permis de réaliser ce projet ainsi que pour son soutien sans faille et son grand dévouement durant mon stage de maîtrise ;
- Le D<sup>r</sup> Louis Bernatchez, professeur agrégé du Département de Biologie de l'Université Laval, pour ses conseils ;
- M. Guy Perry, stagiaire post-doctoral au laboratoire du D<sup>r</sup> Bernatchez, pour son aide au niveau des mathématiques et des statistiques ;
- M. Sébastien Croisetière ;
- Le D<sup>r</sup> Martin Clément, agent de recherche au laboratoire du D<sup>r</sup> Belhumeur, pour ses connaissances et son aide précieuse ;
- M. Robert Gélinas, propriétaire de la Pisciculture d'Arthabaska inc., pour son engagement lors de la frai, pour avoir fourni les truites mouchetées utilisées lors des tests d'infection ainsi que pour son soutien lors de la recherche sur les salmonidés ;
- M. Serge Higgins, directeur du Laboratoire régional des sciences aquatiques (LARSA), pour son aide au maintien des 23 familles de poissons durant un an et sa contribution lors de l'identification des poissons ;
- Tous les étudiants du laboratoire du D<sup>r</sup> Belhumeur pendant cette année ;

- Tous les membres du Département de Microbiologie et Immunologie de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal.

**Liste des tableaux**

Tableau I : Génotype des individus des familles de truites mouchetées utilisées pour les séries d'infections.....	30
Tableau II : Séquences des différentes amorces nucléotidiques ainsi que les régions qu'elles amplifient.....	36
Tableau III : Corrélation entre le temps de survie et les allèles du CMH de classe I après l'infection à <i>A. salmonicida</i> de la descendance des géniteurs de l'omble de fontaine déterminée par l'analyse de variance par régression linéaire. ....	52
Tableau IV : Corrélation entre le poids et les allèles du CMH de classe I après l'infection à <i>A. salmonicida</i> de la descendance des géniteurs de l'omble de fontaine déterminée par l'analyse de variance par régression linéaire. ....	52
Tableau V: Séquences des différents oligonucléotides utilisés lors de l'expérimentation et qui n'ont pas donné de résultats probants.....	55

## Liste des figures

Figure 1: Schéma représentant la structure tétramérique des anticorps des téléostéens. Tiré de Kaattari et Piganelli (1996).....	9
Figure 2: Représentation schématique de la surface d' <i>A. salmonicida</i> . Inspiré de Kay et Trust (1997).....	18
Figure 3 : Photo d'un saumon atlantique victime de <i>Aeromonas salmonicida</i> . Notez le furoncle sur son côté ( <a href="http://www.disease-watch.com/">http://www.disease-watch.com/</a> ). ....	23
Figure 4: Photo du même poisson, mais dont le furoncle a été ouvert, afin de montrer la nécrose des tissus sous-jacents ( <a href="http://www.disease-watch.com/">http://www.disease-watch.com/</a> ).....	23
Figure 5 : Régions génomiques et leurs correspondances sur la molécule de CMH de classe I et II. Tiré de Kurby (1997). ....	35
Figure 6 : Représentation schématique du CMH de classe I des régions génomiques amplifiées puis séquencées pour déterminer la séquence exacte des poissons. Le schéma n'est pas à l'échelle. Tiré de Kurby (1997).....	35
Figure 7: Séquences connues du leader et du domaine alpha1 de poissons apparentés à l'omble de fontaine ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> et <i>Salmo trutta</i> ) alignées et à partir desquelles les oligonucléotides p313 sens et p314 anti-sens ont été élaborés. Les deux séquences Satr-UBA*0301 et Satr-UBA*0701 ont été tirées de Shum <i>et al.</i> , (2001). La séquence Onmy-UBA*4701 a été tirée de Kiryu <i>et al.</i> , (2005). La séquence Onmy-UBA*101 a été tirée de Aoyagi <i>et al.</i> , (2002). ....	44
Figure 8 : Séquence partielle de l'intron 2 du CMH de classe I de l'omble de fontaine. ....	44
Figure 9 : Fin de la séquence de l'intron 2, la séquence entière de l'exon 3 et de l'intron 3, et début de la séquence de l'exon 4. ....	45
Figure 10 : Séquence de l'intron 3 flanquée des deux oligonucléotides p322 et p321. ....	45
Figure 11 : Différenciation des différents patrons des allèles A, B et C du CMH de classe I, domaine $\alpha_2$ , par la technique du SSCP radioactif.....	47
Figure 12: Différenciation des différents patrons des allèles A, B du CMH de classe I, domaine $\alpha_1$ , par la technique du PCR en conditions stringentes et migration sur gel d'agarose 1%. ....	47
Figure 13 : Séquences en acides aminés des cinq allèles du CMH classe I, domaine $\alpha_2$ .....	48
Figure 14 : Séquences en acides aminés des deux allèles du CMH classe I, domaine $\alpha_1$ .....	48
Figure 15 : Distribution des mortalités en pourcentage, suite aux tests de résistance à la bactérie <i>Aeromonas salmonicida</i> chez les 23 familles de poissons (omble de fontaine, souche Rupert), lors du premier réplicat de l'expérience. ....	50
Figure 16: Schéma de la niche peptidique vue du dessus, avec les liaisons réversibles (liaisons hydrogènes) entre le peptide et le CMH de classe I (Janeway, 2001). ....	56
Figure 17 : Représentation en trois dimensions du CMH de classe I de souris (vue du dessus). La séquence d'acides aminés de l'allèle B du CMH classe I $\alpha_2$ de nos	

poissons a été alignée avec la séquence d'acides aminés du CMH de classe I  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  publiés de la souris (Kellenberger, *et al.* 2005). Le résidu en jaune est celui qui se situe au niveau de l'unique mutation de l'allèle B chez nos poissons et où se trouve la proline. .... 56

Figure 18 : Représentation en trois dimensions du CMH de classe I de l'humain (vue de dessous). La séquence d'acides aminés de l'allèle B du CMH classe I  $\alpha 2$  de nos poissons a été alignée avec la séquence d'acides aminés du CMH de classe I  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  publiés de l'Homme (Blicher, *et al.*, 2005). Le résidu en jaune est celui qui se situe au niveau de l'unique mutation de l'allèle B chez nos poissons et où se trouve la proline. .... 57

## Résumé

L'aquaculture est une activité économique en expansion au pays. Or, de multiples infections touchent le rendement de l'industrie piscicole. La bactérie *Aeromonas salmonicida*, agent étiologique de la furonculose, est l'une des principales causes de mortalité dans les piscicultures. Le premier volet du projet de recherche a déterminé que la présence de l'allèle B du CMH de classe II  $\beta$  dans le génotype de l'omble de fontaine lui permettait de développer une résistance accrue face à la furonculose. Dans un deuxième temps, le but du présent projet a été de trouver s'il existe une corrélation entre un ou plusieurs allèles du CMH de classe I et la résistance de l'omble de fontaine face à *A. salmonicida*. Nous avons identifié cinq allèles pour le domaine  $\alpha 2$  du CMH I et deux allèles pour le domaine  $\alpha 1$  de ce CMH. Les résultats ont démontré que l'allèle B du CMH I  $\alpha 2$  des poissons est corrélé avec un taux de survie significativement plus faible.

Mots clés : *Aeromonas salmonicida*, CMH, omble de fontaine, résistance.

**Abstract**

Aquaculture is an important economic industry that has been fast-growing in the country for the past few years. Nevertheless, many infections are negatively affecting the yield of piscicultures. The bacteria *Aeromonas salmonicida* is one of the most widespread infections hitting the industry. It is responsible for furunculosis, one of the deadliest infections among fishes. The first part of this project found that the B allele of the MHC II  $\beta$  chain gave the brook charr an increased capacity to fight the bacterial infection. In this work, we have studied the correlation between MHC I alleles versus the ability of fish to resist *A. salmonicida*. We have identified five alleles related to the  $\alpha 2$  domain and two alleles related to the  $\alpha 1$  domain. Our results suggest that the B allele of the MHC I  $\alpha 2$  is statistically linked to a decreased resistance against furunculosis.

Key words: *Aeromonas salmonicida*, MHC, brook charr, resistance.

# 1 Revue de la littérature

## 1.1 Système immunitaire des poissons

### 1.1.1 Principaux organes et organisation structurelle

#### 1.1.1.1 Tissu lymphoïde associé à l'intestin

Le tissu lymphoïde associé à l'intestin et le système immunitaire mucosal sont les premières lignes de défense face aux pathogènes qui tentent de pénétrer dans l'organisme. Mises à part les variations interspécifiques de taille, l'organisation histologique des agrégats lymphoïdes associés à l'intestin chez les poissons est la même chez toutes les espèces étudiées. Elle consiste en une accumulation de lymphocytes, macrophages, cellules plasmiques et différents types de granulocytes (Georgopoulou et Vernier, 1986). Chez les téléostéens, des accumulations de tissus lymphoïdes apparaissent le long de l'intestin (Dogget et Harris, 1991), bien que chez les espèces qui présentent deux segments intestinaux, le second semble être spécialisé dans la séquestration d'antigènes (Hart *et al.*, 1988).

#### 1.1.1.2 La rate

Chez les téléostéens, ce tissu lymphoïde n'est pas très développé : de petites artères l'entourent, et il apparaît comme diffus dans le parenchyme splénique. La rate filtre le sang et séquestre les antigènes. Elle se divise en deux parties : la

pulpe blanche et la pulpe rouge. La pulpe blanche est peu développée et contient surtout des mélanomacrophages qui détruisent les érythrocytes. La majeure partie de l'organe est constituée par la pulpe rouge, qui contient les macrophages et les lymphocytes (Press et Evensen, 1999). De plus, la rate contient des cellules qui produisent des anticorps et lient les antigènes (Press *et al.*, 1994).

#### 1.1.1.3 Le thymus

Chez les téléostéens, et contrairement aux autres groupes de poissons, le thymus se retrouve près de l'épithélium des branchies, et chez les poissons adultes, il forme une continuité avec l'épithélium pharyngé. Le thymus est un organe lymphoïde divisé en deux parties : une couche externe, ou cortex, et une couche interne, ou medulla (Press et Evensen, 1999). De plus, chez les téléostéens, cet organe ne présente pas la démarcation corticomédullaire typique qu'on retrouve chez tous les autres vertébrés : selon l'espèce, deux à six régions ont été identifiées. Toutefois, leur appartenance au cortex ou à la medulla est encore controversée (Castillo *et al.*, 1990 ; Zapata et Cooper, 1990 ; Chilmonczyk, 1992). Le thymus abrite plusieurs types de cellules immunitaires : des macrophages (Zapata *et al.*, 1996), des cellules multinuclées géantes (Pulsford *et al.*, 1991), des cellules myéloïdes (Zapata et Cooper, 1990) et des mélanomacrophages (Pulsford *et al.*, 1991).

#### 1.1.1.4 Le rein

Chez les salmonidés, le rein est l'organe siège de l'hématopoïèse, contrairement aux vertébrés supérieurs, où ce rôle est assuré par la moelle osseuse. Le rein des téléostéens est divisé en deux parties : la partie antérieure et la partie médiane et postérieure. Le segment antérieur a perdu ses fonctions excrétrices et est décrit comme un segment lympho-myéloïde (Press et Evensen, 1999). On a observé des macrophages, des lymphocytes T et des lymphocytes B dans le rein téléostéen (Zapata *et al.*, 1996). De plus, d'après Brattgjerd et Evensen (1996), le rein téléostéen est un organe qui produit des anticorps et dont le parenchyme de la zone antérieure est capable de séquestrer des antigènes à long terme.

#### 1.1.2 Défense non spécifique

##### 1.1.2.1 Défense non spécifique cellulaire : inflammation et phagocytose

L'inflammation est la réponse cellulaire du système immunitaire face à l'entrée d'agents infectieux dans l'organisme et/ou à des dommages aux tissus. Cette réponse entraîne l'accumulation de leucocytes et de fluides au site de l'inflammation (Secombes, 1996). Chez les poissons comme chez les vertébrés supérieurs, plusieurs types de leucocytes sont engagés dans les défenses cellulaires non spécifiques : les monocytes/macrophages, des cellules cytotoxiques non spécifiques et des granulocytes, qui comptent les basophiles, les éosinophiles et les neutrophiles (Secombes, 1996). Tout comme chez les vertébrés

supérieurs, les macrophages des poissons sont des cellules présentatrices d'antigènes. Ils sécrètent aussi différents types de cytokines et sont des cellules phagocytaires. Plusieurs phénomènes entrent en jeu lors de la réponse cellulaire non spécifique. Ils seront détaillés plus tard.

La phagocytose est un mécanisme de défense primordial qui permettra par la suite d'initier la réponse spécifique. C'est un mécanisme qui fait en sorte que la cellule absorbe et digère les microorganismes. Les principales cellules phagocytaires du système immunitaire sont les macrophages et les granulocytes, surtout les neutrophiles, et parfois les éosinophiles (Secombes, 1996). Ces deux types cellulaires sont mobiles et se retrouvent dans les tissus lymphoïdes et le sang.

#### 1.1.2.2 Défense non spécifique humorale

Les poissons possèdent une multitude de substances capables d'inhiber non spécifiquement le développement des pathogènes. Elles sont en grande partie constituées de protéines et de glycoprotéines. Elles n'agissent que contre un groupement chimique en particulier, mais elles sont dites « non spécifiques » car les substances avec lesquelles elles réagissent sont présentes chez un grand nombre de microorganismes et sont capables d'inhiber la croissance d'un large spectre de microorganismes. Il existe deux grands groupes de ces substances : celles qui inhibent la croissance bactérienne et celles qui lysent les bactéries (Ellis, 1999).

Le groupe de substances inhibant la croissance bactérienne comporte plusieurs molécules. Les transferrines séquestrent le fer et réduisent sa biodisponibilité aux bactéries. On retrouve également les anti-protéases ( $\alpha 2$  macroglobuline), qui sont capables de neutraliser des toxines protéolytiques bactériennes (Salte *et al.*, 1992). Parmi ces substances inhibitrices de la croissance bactérienne, il y a les lectines qui lient des sucres et qu'on retrouve dans les œufs, le mucus et les sérums de poisson.

Le deuxième groupe de substances qui provoquent la lyse de bactéries comprend les peptides antibactériens capables de désorganiser les membranes des bactéries. On retrouve dans ce groupe certaines protéases dont l'activité enzymatique est semblable à celle de la trypsine. Une autre substance capable de provoquer la lyse des bactéries est la protéine C. Cette protéine réagit avec la phosphorylcholine, qui fait partie des structures de surface des bactéries, des parasites et des champignons. Lorsque la protéine C réagit avec la phosphorylcholine, elle active le complément et, par conséquent, les défenses menant à la phagocytose et à la lyse (Ellis, 1999). On y retrouve aussi le lysozyme, capable d'hydrolyser des structures de la couche de peptidoglycan de la paroi bactérienne. Enfin, le complément est un système de défense immunitaire composé de protéines sériques jouant un rôle primordial dans plusieurs mécanismes de défense de l'hôte. Comme les mammifères, les poissons possèdent deux voies d'activation du complément : la voie classique et la voie alternative (Yano, 1996). Le complément est entre autres activé directement par les LPS présents dans la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives (Ellis, 1999).

### 1.1.3 Défense spécifique

Le système de défense spécifique des poissons est semblable à celui qu'on retrouve chez les vertébrés supérieurs. Au cours de l'évolution, les poissons ont été parmi les premiers animaux dotés des composantes d'un système de défense spécifique complet : CMH et récepteurs des cellules T (Nakanishi *et al.*, 1999).

#### 1.1.3.1 Défense spécifique cellulaire

Comparativement aux mammifères, chez qui les composantes cellulaires du système immunitaire spécifique sont bien connues, d'autres travaux de recherche sont nécessaires pour identifier les constituants cellulaires du système immunitaire spécifique des poissons. Néanmoins, les téléostéens présentent des types de lymphocytes analogues aux lymphocytes B et T qu'on rencontre chez les mammifères (Manning et Nakanishi, 1996). Des protéines de surface caractérisent ces cellules, soit des immunoglobulines, soit le récepteur T (T Cell Receptor). De plus, des fonctions attribuées aux lymphocytes T actifs des mammifères sont présentes chez les poissons : le rejet des allogreffes (Tatner et Manning, 1983), la réponse anti-haptène des anticorps face aux antigènes thymus dépendants (Miller *et al.*, 1987), ainsi que la réponse proliférative aux produits du CMH (Miller *et al.*, 1986). De plus, selon Watts *et al.* (2001), il existe deux types de lymphocytes B (B1 et B2) et deux types de lymphocytes T (auxiliaires et cytotoxiques). Il y a également les macrophages et les granulocytes qui participent au système de

défense spécifique et qui, comme les lymphocytes B, présentent des antigènes à leur surface. Le système immunitaire peut répondre de trois manières différentes.

D'abord, il y a la réponse T-indépendante. Suite à une thymectomie, certains antigènes T indépendants (cellules mortes d'*A. salmonicida*) n'ont pas eu d'influence sur la production d'anticorps chez la truite arc-en-ciel (Manning, 1992). Ces anticorps sont produits par des lymphocytes B 1. Ils sont capables de lier une multitude d'antigènes mais avec une faible affinité (Watts *et al.*, 2001).

Puis, il y a la réponse T dépendante, où des anticorps sont produits par l'intermédiaire de lymphocytes B. Ce type de réponse est semblable à celle observée chez les mammifères, chez qui différents types cellulaires interagissent ensemble : les cellules présentatrices d'antigènes via le CMH de classe II, les lymphocytes T auxiliaires et les lymphocytes B 2 (Kaattari, 1992). Lors de cette réaction, le système immunitaire fabrique des anticorps et relâche des cytokines.

Enfin, il y a la réponse T dépendante qui mène à la lyse cellulaire, mais sans passer par des anticorps. Les antigènes sont présentés par les cellules présentatrices d'antigènes via le CMH de classe I aux cellules T cytotoxiques en présence de la cytokine interleukine-2 (Il-2) (Manning et Nakanishi, 1996).

### 1.1.3.2 Défense spécifique humorale

Tout comme chez les vertébrés supérieurs, le système immunitaire spécifique humoral des poissons a la capacité de produire des anticorps. La synthèse des anticorps dans le cadre du système de défense de l'organisme implique la

participation de plusieurs types cellulaires qui se retrouvent chez les téléostéens : les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules T et les cellules B (Kaattari, 1992). Toutefois, à la différence des vertébrés supérieurs, les téléostéens n'ont qu'une seule classe d'immunoglobuline, qui ressemble au IgM qu'on retrouve chez les mammifères. La fonction primaire des anticorps des poissons, tout comme chez les mammifères, consiste à neutraliser les toxines des agents pathogènes. Ils forment des complexes antigènes-anticorps insolubles en agglutinant et en neutralisant les agents infectieux. Enfin, ils jouent un rôle dans le phénomène d'opsonisation, qui active le complément et facilite la phagocytose (Kaattari et Piganelli, 1996).

#### 1.1.3.3 Mémoire immunologique

La mémoire immunologique permet à l'organisme de répondre de manière plus rapide et plus efficace lors d'une autre rencontre avec l'agent infectieux. Chez les poissons, on observe une augmentation des anticorps lors de la réponse secondaire. Cette augmentation est faible comparée à l'augmentation logarithmique d'IgG observée chez les mammifères. Mais elle est comparable à l'amplitude de l'augmentation d'IgM chez les vertébrés supérieurs lors de la réponse secondaire (Arkoosh et Kaatari, 1991).

##### 1.1.3.3.1 Structure des anticorps

La molécule de l'anticorps est divisée en deux : la région amino-terminale (Fab) liant l'antigène et la région effectrice carboxy-terminale (Fc). Chez les téléostéens, cette molécule est surtout un tétramère, constitué de quatre sous-unités monomériques. Chacune de ces unités contient deux chaînes lourdes de 72 kDa et deux chaînes légères de 27 kDa (Figure 1). La forme monomérique coexiste dans le sérum des poissons en ayant la forme tétramérique (Acton *et al.*, 1971 ; Clem and McClean, 1975 ; Lobb et Clem, 1981 ; Elcombe *et al.*, 1985). À l'intérieur de la forme tétramérique, les sous-unités monomériques s'associent soit de façon covalente (ponts disulfures), soit de manière non covalente.

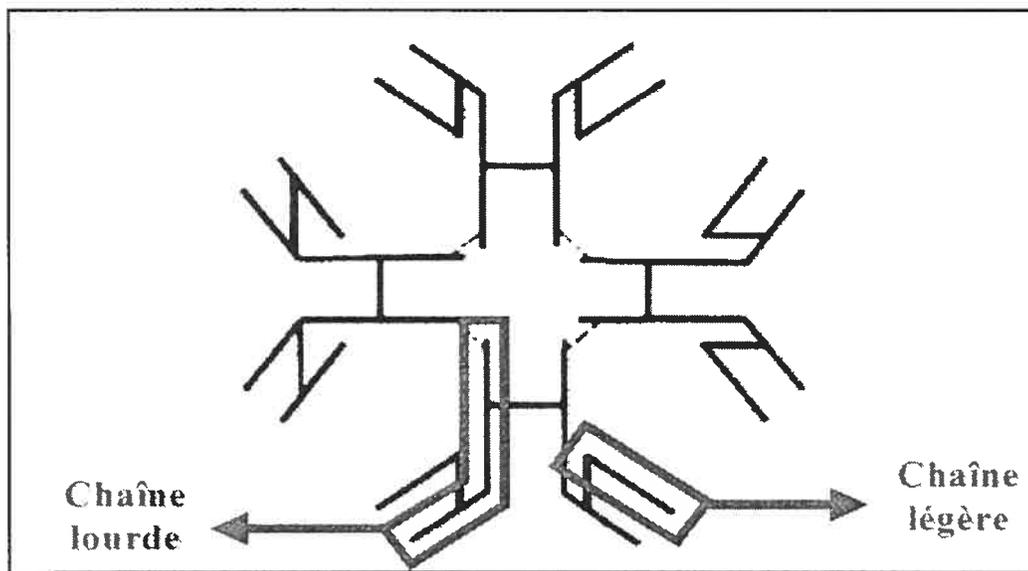


Figure 1: Schéma représentant la structure tétramérique des anticorps des téléostéens. Tiré de Kaattari et Piganelli (1996)

#### 1.1.3.3.2 Variétés d'anticorps

Pour pouvoir lier la multitude d'antigènes présents à la surface des agents infectieux, les anticorps doivent présenter une extrême variabilité. Cette variabilité est possible tout d'abord grâce aux mutations somatiques du bagage génétique. De plus, cette diversité est accentuée par un mécanisme d'épissage aléatoire des régions génomiques des cellules B codant pour des parties structurelles des anticorps et par l'association des diverses chaînes légères et lourdes (Kaattari et Piganelli, 1996). Un autre facteur contribue à la diversité des immunoglobulines : le type de liaison moléculaire (covalente et non-covalente) qui lie les sous-unités monomériques et qui permet de rendre l'anticorps plus ou moins flexible (Kaattari et Piganelli, 1996). C'est une caractéristique qui n'existe pas chez les mammifères.

#### 1.1.4 Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

##### 1.1.4.1 Général

La fonction primaire du CMH est de permettre la distinction du soi et du non-soi. C'est une famille multigénique agissant à l'interface entre le système immunitaire et les maladies infectieuses. Ces loci encodent des récepteurs présents à la surface de cellules immunitaires et non-immunitaires. Le rôle primaire de ces récepteurs est de lier des fragments de protéines dans la cellule et de les transporter vers la membrane plasmique, où le complexe est reconnu par les

cellules T, qui peuvent initier une cascade de réactions immunitaires (Ploegh et Watts, 1998).

De plus, les maladies infectieuses semblent la principale force maintenant l'extraordinaire diversité du CMH (Jeffery et Bangham, 2000). Le CMH de classe I et le CMH de classe II ont d'abord été identifiés, chez la carpe (Hashimoto *et al.*, 1990), puis chez d'autres espèces de poissons, dont les salmonidés (Grimholt *et al.*, 2003).

#### 1.1.4.2 Structure du CMH de classe I et de classe II

Les gènes du CMH encodent des glycoprotéines de surface qui lient des fragments peptidiques dérivés de protéines intracellulaires et extracellulaires. Ces gènes sont divisés en deux grandes familles : les CMH de classe I et de classe II.

Les produits des gènes du CMH de classe I sont présents sur toutes les cellules nucléées de l'organisme. Les molécules issues des gènes du CMH I sont des hétérodimères. Elles sont constituées d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta_2$ -microglobuline. La chaîne  $\alpha$  du CMH de classe I est constituée de trois domaines :  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ . Le CMH de classe I présente aux cellules T cytotoxiques (CD8+) de courts peptides, qui comptent entre 8 et 10 acides aminés provenant du cytosol.

Le CMH de classe II est, quant à lui, constitué d'une chaîne  $\alpha$  comportant deux domaines ( $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ ) et d'une chaîne  $\beta$  comportant elle aussi deux domaines ( $\beta_1$  et  $\beta_2$ ). Les deux premiers domaines forment la niche peptidique, qui lie les fragments peptidiques issus des protéines intra et extracellulaires. Le CMH II se

retrouve plus spécifiquement à la surface des macrophages, des lymphocytes B et des cellules T activées. De plus, grâce à la structure de sa niche peptidique ouverte, il présente aux cellules T auxiliaires des peptides de 13 acides aminés et plus phagocytés par les cellules présentatrices d'antigènes (Grimholt *et al.*, 2003).

#### 1.1.4.3 Évolution du CMH : la théorie biologique et la théorie mitochondriale

Selon une première théorie, basée sur des caractères morphologiques et biologiques et récemment appuyée par une échelle de temps moléculaire, les chondrichthyens sont les membres les plus anciens du groupe des vertébrés (Ohta *et al.*, 2002). Chez ces anciens vertébrés, le CMH prototypique aurait été constitué de la classe I et II, TAP, et des gènes de LMP. Plus tard, lorsque les téléostéens ont dérivé de la branche des chondrichthyens, le CMH primordial s'est disséminé dans la lignée téléostéenne : les gènes de classe II ont changé de chromosome par translocation. C'est un événement qui a dû survenir tôt, lorsque l'embranchement des téléostéens a évolué à partir des chondrichthyens, car les espèces modernes et anciennes de poissons étudiés jusqu'à ce jour ont des classes I et II non liés (Ohta *et al.*, 2000).

Selon une deuxième théorie, basée sur l'étude de l'ADN mitochondrial (Rasmussen et Arnason., 1999), les poissons cartilagineux et osseux seraient dans des groupes frères. Dans cette perspective, l'extension des régions des CMH chez les téléostéens et les vertébrés supérieurs serait probablement issue du remodelage des quatre anciens paralogues des CMH. L'hypothèse de Dixon *et al.* (2003) est

que les poissons cartilagineux et les tétrapodes ont pris la route menant à l'utilisation d'une seule région paralogue du CMH. Les téléostéens ont, quant à eux, emprunté la route menant à l'utilisation du CMH dans au moins deux régions paralogues.

#### 1.1.4.4 Forces qui conduisent à la diversité du CMH

##### 1.1.4.4.1 Par le biais des pathogènes : l'avantage hétérozygote et l'avantage de l'allèle rare

Doherty et Zinkernagel (1975) affirment que lorsqu'une population est exposée à une multitude d'agents pathogènes, les individus qui sont hétérozygotes sont favorisés, car ils sont capables de présenter à leur système immunitaire une plus grande diversité d'antigènes. Ces individus sont donc capables de mieux résister à de nombreux pathogènes que les individus homozygotes (Hughes et Nei, 1988).

Selon les modèles décrits par Clarke et Kirby (1966), Bodmer (1972) et Takahata et Nei, (1990), les antigènes des parasites seront sélectionnés afin d'exploiter les défauts des systèmes immunitaires basés sur le CMH et qui ont les allèles les plus communs. Selon ce modèle, les individus possédant dans leur bagage génétique les allèles immunitaires les plus répandus sont désavantagés. Donc, les individus qui ont des allèles relativement rares seront avantagés.

#### 1.1.4.4.2 Par le biais de la reproduction : l'hypothèse de la cible mouvante et celle de la répulsion reproductive

Suite à l'exposition aux germes, les individus les plus résistants aux maladies se reproduisent et engendrent une descendance, de préférence aux génotypes leur procurant une résistance optimale. La théorie s'inscrit dans l'esprit de la théorie de la reine rouge, où le prédateur et la proie évoluent ensemble pour que les deux puissent survivre. Le choix du partenaire permettrait donc la coévolution dans la course aux armements moléculaires entre parasites et hôtes (Penn et Potts, 1999).

Potts et Wakeland (1990) ont émis l'hypothèse de la répulsion reproductive, qui s'appuie sur le fait que le CMH est polymorphique, donc que les individus qui ont des gènes de CMH semblables sont probablement apparentés. Les individus ayant des gènes de CMH en commun auraient moins tendance à se reproduire ensemble. Ce phénomène permettrait d'éviter que la descendance n'hérite de gènes de mutations récessives délétères.

#### 1.1.4.5 CMH et résistance aux infections

##### 1.1.4.5.1 Survivre grâce à la présence d'un allèle en particulier

Des expériences effectuées sur l'espèce *Salmo salar* (saumon atlantique) ont démontré que la résistance des poissons face à *Aeromonas salmonicida* est associée statistiquement à la présence d'allèles spécifiques du CMH II $\beta$ . La survie des individus est dépendante d'allèles spécifiques, mais elle n'est pas dépendante de l'hétérozygotie. Pour Langefors *et al.* (2001), ces résultats appuient

l'hypothèse que le polymorphisme du CMH est maintenu grâce à une sélection induite par les agents pathogènes agissant au moyen de sélection fréquence-dépendante plutôt que par l'avantage hétérozygote.

En effet, les membres de 120 familles ont été infectés par la bactérie pathogène *Aeromonas salmonicida* (Langefors *et al.*, 2001). Suite aux analyses, les familles de poissons ont été classées en deux groupes : les familles de poissons dites à haute résistance (< 35 % de mortalité) et les familles de poissons dites à basse résistance (> 80 % de mortalité). Les résultats de l'expérience ont démontré qu'un allèle du CMH de classe II $\beta$  (allèle *e*) en particulier était présent de manière statistiquement significative chez les poissons qui étaient plus résistants à la maladie. De plus, deux autres allèles étaient présents, de préférence chez les familles de poissons dites à « haute résistance », comparativement à celles dites à « basse résistance ».

#### 1.1.4.5.2 Survivre grâce à la diversité du CMH (hétérozygote)

Des études ont démontré que la survie des individus de l'espèce *Oncorhynchus tshawytscha* face au virus de nécrose haématopoiétique (IHNV) est augmentée lorsque l'individu infecté est hétérozygote au niveau du gène de CMH de classe II (Arkush *et al.*, 2002). De plus, ils n'ont trouvé aucune preuve d'un génotype CMH spécifique associé à la résistance. Toutefois, cette observation peut être altérée par les niveaux variables de ressemblance génétique entre les

individus apparentés. D'une manière générale, les résultats confirment l'hypothèse de l'avantage de l'hétérozygote.

#### 1.1.4.5.3 Autres corrélations entre allèles du CMH et résistance

Un autre exemple de cas où il existe une corrélation entre les allèles du CMH et la résistance d'un organisme face à un agent infectieux : le saumon et la bactérie *A. salmonicida*. Lohm *et al.* (2002) ont infecté des saumons juvéniles avec la bactérie, puis ils ont suivi le taux de survie individuelle des poissons. Ils ont remarqué que trois des neuf allèles du CMH de classe II  $\beta$  étaient corrélés avec le taux de survie. Deux de ces allèles permettaient aux poissons de mieux résister à l'infection. Un autre était corrélé avec un taux de mortalité plus élevé chez les poissons infectés.

## 1.2 *Aeromonas salmonicida*

### 1.2.1 Général

*Aeromonas salmonicida* est une bactérie Gram négative identifiée initialement par Emmerich et Weibel, en 1894, suite à une épidémie de furunculose dans une pisciculture allemande de truites brunes. C'est une bactérie qui appartient à la famille des Vibrionaceae et elle fait partie du genre *Aeromonas*. *A. salmonicida* se subdivise en quatre sous-espèces : *salmonicida*, *mascoicida*, *achromogenes* et *smithia* (Holt *et al.*, 1994). La première sous-espèce est l'agent étiologique responsable de la furunculose classique. Les trois autres sous-espèces sont

responsables de la forme atypique de la maladie. Des études ont démontré qu'*A. salmonicida* est un groupe plutôt homogène, alors que les trois autres sous espèces présentent des variations. La bactérie est un des pathogènes des poissons les plus étudiés, car *A. salmonicida* a un large spectre d'hôtes. Elle est répandue géographiquement et elle cause des dommages économiques considérables aux pisciculteurs touchés.

## 1.2.2 Facteurs de virulence

### 1.2.2.1 La couche S et LPS

Seules les souches virulentes d'*A. salmonicida* possèdent la couche S à leur surface (Garduno *et al.* 2000). Les mutants isogéniques de la couche S sont sensiblement moins virulents, comparativement à la souche sauvage (Kay *et al.*, 1981). Cette couche permet à ces bactéries d'adhérer aux macrophages, d'y pénétrer et de survivre à l'intérieur des cellules. Elle aurait un rôle à jouer lors des premières étapes de l'infection car, par la suite, elle est éclipsée par l'induction d'une capsule protectrice qui recouvre la couche S (Garduno *et al.* 1993).

La couche S d'*A. salmonicida* couvre toute la bactérie et est ancrée par les chaînes O des LipoPolySaccharides (LPS) (Figure 2). De plus, le principal constituant de cette couche est une protéine A. Elle forme un arrangement bi-dimensionnel, paracrystallin tétragonal (Chu *et al.*, 1991). Cette protéine A est hydrophobe et a un poids moléculaire de 49 kDa (Cipriano, 2001).

Il est intéressant de noter que la couche S se lie spécifiquement à l'antigène O du lipopolysaccharide de la bactérie (Garduno *et al.*, 1995). Seule une partie du polysaccharide O pénètre la couche S et est exposée aux anticorps, contrairement aux mutants, incapables de synthétiser la couche S et qui exposent alors toutes leurs chaînes de polysaccharide O de longueur homogène à leur surface. De plus, la couche S protège la bactérie contre le complément et des protéases (Munn *et al.*, 1982). Elle est aussi capable de lier les IgM et les IgG du sérum, masquant ainsi les récepteurs bactériens immunogènes, ce qui permet à *A. salmonicida* d'empêcher le système immunitaire de la détecter (Kay et Trust, 1997).

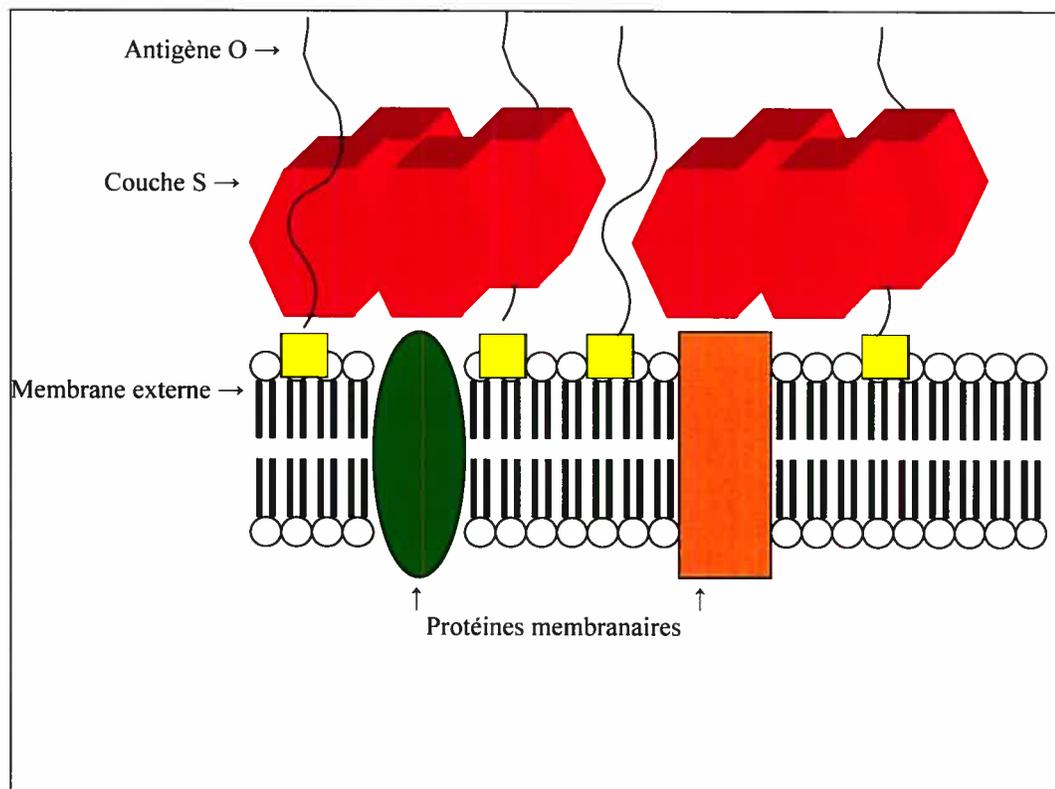


Figure 2: Représentation schématique de la surface d'*A. salmonicida*. Inspiré de Kay et Trust (1997).

#### 1.2.2.2 Glycerophospholipide cholestérol acyltransferase (GCAT)

La GCAT a la capacité d'utiliser le cholestérol comme accepteur d'acyle (Vipond, *et al.*, 1998). Associée en complexe avec le LPS, la GCAT possède des effets hémolytiques, leucocytolytiques et cytotoxiques. Cette toxine, par elle-même, n'est pas essentielle à la virulence de la bactérie, mais elle contribue, au sein de l'ensemble des mécanismes mis en place par la bactérie, à accroître son pouvoir virulent (Banerji *et al.*, 2005).

#### 1.2.2.3 Toxine ADP-ribosylante

Plusieurs pathogènes utilisent des toxines ADP-ribosylantes, afin de modifier les propriétés des protéines de la cellule hôte, de moduler leur fonction et induire la maladie. L'ADP ribosylation des protéines eucaryotiques régulatrices est un mécanisme pathogénique sous-jacent d'une famille hétérologue de toxines protéiques bactériennes. Les toxines ADP-ribosylantes se retrouvent chez les bactéries hautement pathogènes et sont la cause primaire de diverses maladies humaines graves, telles que la diphtérie, le choléra et la coqueluche (Braun *et al.*, 2002).

*A. salmonicida* ne fait pas exception à la règle et possède une toxine ADP-ribosylante. Cette toxine présente une activité enzymatique ADP-ribosyltransférase. De plus, elle n'est exprimée que quand *A. salmonicida* entre en contact avec des cellules de la lignée RTG-2 des gonades de la truite arc-en-ciel (Braun *et al.*, 2002). Suite à cette interaction, ces cellules s'arrondissent,

arrondissement qui s'accompagne d'une induction de la synthèse de la toxine. Si les bactéries et les cellules sont mises en coculture prolongée, les cellules finissent par lyser.

#### 1.2.2.4 Autres toxines

*A. salmonicida* a plusieurs autres toxines dans son arsenal. Tout d'abord, la famille des protéases, qui compte plusieurs membres, dont le principal est une protéase à sérine alcaline thermosensible d'un poids moléculaire de 70 kDa (Tajima *et al.*, 1984). Lorsque injectée seule, cette protéase possède une DL50 de 2.4 µg/g chez de jeunes poissons. Elle produit des hémorragies et liquéfie les muscles (Lee et Ellis, 1989). Quand cette protéase est combinée avec la GCAT, également produite par la bactérie (voir ci-dessus), les deux ont un effet toxique additif envers les poissons. Toutefois, cette protéase ne semble pas essentielle à la virulence bactérienne. Elle semble plutôt activer la GCAT (Vipond *et al.*, 1998).

Un deuxième type de protéase a été mis à jour par l'équipe de Price *et al.*, (1989). Le premier type, de 70 kDa, est semblable à celui décrit par Tajima *et al.*, (1984) et il est capable de digérer la gélatine et la caséine. Le second type, de 20 kDa, digère la gélatine, mais il ne digère pas la caséine. Enfin, Arnesen *et al.*, (1995) ont isolé une métalloprotéase qui agit contre la gélatine et l'azocoll, mais pas contre la caséine.

La H-lysine est une autre toxine isolée chez *A. salmonicida*. Elle est de nature inconnue, mais elle est active sur les érythrocytes (Ellis, 1997). L'équipe de

Hirono et Aoki (1993) ont identifié deux peptides hémolytiques (ASH3 et 4). Leurs séquences sont relativement homologues avec la séquence de l'aérolysine d'*Aeromonas hydrophilia* (ASH3) et de plusieurs gènes présents et communs à diverses espèces de *Vibrionaceae* (Ellis, 1997).

### 1.2.3 Furonculose

#### 1.2.3.1 Généralités

*Aeromonas salmonicida*, sous-espèce *salmonicida*, est l'agent étiologique responsable de la furunculose classique des *Salmonidae*. C'est une maladie répandue à travers le monde et elle est définie comme une bactériémie accompagnée de lésions musculaires focalisées. Néanmoins, *A. salmonicida* ne cause pas que la furunculose. D'autres maladies y sont associées, comme l'ulcère des truites, l'ulcère des poissons rouges et l'érythrodermatite de la carpe.

#### 1.2.3.2 Les trois niveaux d'infection : au niveau de la pisciculture, du bassin et du poisson

Au niveau de la pisciculture entière, les exploitants notent un très fort taux de mortalité chez les poissons. De plus, la furunculose est une maladie hautement contagieuse, qui se manifeste un peu partout dans le monde, à la fois au niveau des piscicultures des poissons d'eau salée et d'eau douce. Elle se transmet par l'intermédiaire de l'eau (bouche, branchies et peau) ainsi que par ingestion de nourriture contaminée.

De manière générale, les pisciculteurs notent que les poissons deviennent léthargiques, qu'ils cessent de se nourrir, qu'ils nagent en surface, qu'ils présentent des problèmes de détresse respiratoire et qu'ils se mettent à sauter hors de l'eau de façon erratique juste avant l'éclosion de la maladie.

Il existe trois types de furonculose, dépendamment de l'âge du poisson : chez les jeunes poissons, la maladie est suraiguë (furonculose suraiguë). Elle se caractérise par un manque de symptômes cliniques, car le temps qui sépare le début de l'infection de celui de la mort du poisson est très court. De plus, le taux de mortalité à ce stade est très élevé, avoisinant les 100 %.

Chez les poissons en croissance, la furonculose est aiguë. À ce stade de l'infection, les symptômes cliniques sont visibles : noircissement de la peau et hémorragies à la base des nageoires (Figure 3 et Figure 4). Un grand nombre de poissons finit par mourir. Enfin, chez les poissons adultes, la furonculose est chronique ou aiguë. La progression de la maladie est plus lente, et un nombre plus élevé de poissons est capable de survivre à l'infection. Elle se caractérise aussi par un noircissement de la peau, des hémorragies à la base des nageoires, une péritonite, un refus de s'alimenter et un état léthargique. Bien que le taux de mortalité soit moins élevé, les poissons en gardent des cicatrices.

Enfin, les poissons qui réussissent à survivre à un épisode d'infection sont porteurs de la bactérie et peuvent infecter les poissons environnants sans qu'eux-mêmes ne montrent de symptômes cliniques de la maladie.



Figure 3 : Photo d'un saumon atlantique victime de *Aeromonas salmonicida*. Notez le furoncle sur son côté (<http://www.disease-watch.com/>).



Figure 4: Photo du même poisson, mais dont le furoncle a été ouvert, afin de montrer la nécrose des tissus sous-jacents (<http://www.disease-watch.com/>).

## 1.2.4 Traitement de l'*Aeromonas salmonicida*

### 1.2.4.1 Antibiotiques

La furonculose des salmonidés est l'une des premières maladies des poissons à être traitée efficacement avec les drogues modernes, dont les sulfonamides et les nitrofuranes (Gutsell, 1948). D'autres substances antibiotiques jouent un rôle dans le contrôle de l'infection (Herman, 1970). La plupart de ces molécules peuvent être administrées oralement, ayant ainsi l'avantage de faciliter le travail du pisciculteur. D'autres voies d'administration plus complexes peuvent aussi être utilisées, comme l'injection.

Cependant, l'utilisation d'antibiotiques est réduite à cause des législations, tant au niveau national qu'international. La Food and Drug Administration (FDA) permet l'utilisation de trois types de molécules : la sulfamérazine, l'oxytétracycline et la sulfonamide (Ro5-0037 ou ROMET®) (Bullock *et al.*, 1974). La plupart des sulfonamides ne sont plus utilisés, à l'exception de quelques molécules comme la sulfamérazine, dont l'utilisation a été approuvée pour traiter la furonculose chez certaines espèces de truites, moyennant certaines restrictions.

De plus, les antibiotiques peuvent avoir des effets secondaires sur les poissons : la sulfamérazine inhibe la croissance de la truite brune (Snieszko et Wood, 1955). L'oxytétracycline peut entraîner la suppression de la réponse immunitaire chez les poissons (Anderson *et al.*, 1984). Un autre défaut des antibiotiques est l'apparition de souches bactériennes résistantes (Smith *et al.*, 1994), résistance qui peut par la suite être transférée aux bactéries humaines

(Kruse et Sorum, 1994). Enfin, l'utilisation massive d'antibiotiques peut perturber l'écologie aquatique, provoquant la disparition de souches bactériennes.

#### 1.2.4.2 Vaccination passive et vaccination active

La vaccination passive, qui consiste à transférer l'immunité par les anticorps purs ou par un antisérum, procure une protection efficace et quasi immédiate des poissons contre *A. salmonicida*. Spence *et al.* (1965) ont réussi à transférer de manière efficace l'immunité de truites arc-en-ciel vaccinées avec un extrait de la bactérie *A. salmonicida* tuée à la formamine, chez le saumon coho. Par la suite, d'autres auteurs sont venus corroborer ces résultats. Cipriano et Starliper (1982) ont également rapporté qu'un transfert d'immunité de truites arc-en-ciel préalablement vaccinées protégeait les truites mouchetées contre la furunculose. Olivier *et al.*, (1983) ont réussi à immuniser des saumons cohos par injection intrapéritonéale de sérums de lapins immunisés par des cellules entières d'*A. salmonicida*. De plus, ils ont comparé le niveau d'efficacité de la vaccination passive à partir d'un sérum immun de lapin, à celui d'un sérum immun de poisson. Ils ont trouvé que le sérum immun de lapin transféré aux poissons était plus efficace que le sérum immun de poissons. Certains sérums de lapin ont même réussi à augmenter la dose létale 50 (DL50) d'approximativement 10 000 fois, comparativement au groupe témoin qui recevait une solution saline.

Marquis et Lallier (1989) ont purifié des anticorps de lapins immunisés contre *A. salmonicida*, qu'ils ont injecté intrapéritonéalement au moment de l'infection,

puis à différents temps postinfection. Ils ont noté que les poissons étaient protégés lorsque les anticorps étaient administrés au moment de l'injection, puis au temps 24 et 48 heures post infection. Ils ont toutefois remarqué que les poissons n'étaient pas protégés lorsqu'ils étaient immunisés au moment de l'infection, puis 72 ou 96 heures après l'infection. Néanmoins, cette technique pose plusieurs problèmes dont la manipulation individuelle des poissons pour un transfert d'immunité efficace (problèmes logistiques, techniques et financiers pour les piscicultures). De plus, ce type de manipulation engendre un stress chez les poissons, ce qui peut affecter leur système immunitaire et permettre l'émergence d'autres maladies. Les injections peuvent aussi entraîner des lésions internes chez les poissons.

Des vaccins fabriqués à partir d'*A. salmonicida* émulsifiée dans des adjuvants d'huile sont utilisés dans les piscicultures. Ils sont injectés intrapéritonéalement et induisent une réponse immunitaire de longue durée (Lillehaug *et al.*, 1992 ; Ellis 1997). Il existe sur le marché des vaccins à base d'adjuvants aqueux ou d'adjuvants à l'huile minérale. Ces derniers sont plus efficaces pour induire une réponse immunitaire effective et soutenue. Néanmoins, l'injection de vaccins dans une pisciculture industrielle est un processus long et coûteux, nécessitant la mise en place d'infrastructures complexes. Les essais d'immunisation par d'autres voies (orale ou immersion) ont eu plus ou moins de succès (Midtlyng, 1997). De plus, même si les injections de vaccins à base d'huile minérale sont plus efficaces, elles peuvent entraîner des effets secondaires importants. Elles peuvent par exemple provoquer des lésions aux organes internes, ce qui compromet la

croissance des poissons (Midtlyng, 1994). Enfin, la vaccination ne bloque pas de manière absolue la résurgence de la furunculose dans une pisciculture ou la transmission de la bactérie entre poissons vaccinés (Hiney et Olivier, 1999).

## 2 Objectifs de recherche

*Aeromonas salmonicida* est l'une des bactéries pathogènes les plus fréquentes et les plus meurtrières qui sévissent dans l'industrie piscicole. Or, l'aquaculture est une activité en pleine expansion, selon le ministère de l'agriculture, pêche et alimentation du Québec (MAPAQ). *A. salmonicida* cause la furunculose, principale cause de mortalité des poissons (Hiney et Olivier, 1999). Au cours de la dernière moitié du siècle dernier, différentes techniques ont été testées afin de contrôler cette infection, avec des succès mitigés, d'où l'importance d'explorer de nouvelles voies qui permettraient de mieux contenir la bactérie. Ces nouvelles approches doivent aussi tenir compte de l'impact environnemental.

Plusieurs études ont déjà démontré un lien entre la présence d'allèles du CMH chez certaines espèces animales et leur résistance accrue face aux infections, comme le VIH chez l'homme, par exemple (Carrington et O'Brien, 2003). Le premier volet de ce projet de recherche, mené en laboratoire, a donc été de trouver un lien statistique significatif entre la présence d'allèles du CMH de classe II chez les poissons et leur capacité à résister à la maladie. Dans un deuxième temps, nous avons cherché un lien statistique significatif entre la présence d'allèles du CMH de classe I et le pouvoir de résistance des poissons face à *A. salmonicida*. Ce second volet constitue l'objet de ce travail de maîtrise. Cette analyse ciblera les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du CMH de classe I, qui forment la niche peptidique du CMH I.

### **3 Matériel et méthodes**

#### 3.1 Maintien, infection des poissons et étude des allèles

##### 3.1.1 Omble de fontaine (souche Rupert), conservée à l'Université Laval

À partir de 62 ombles de fontaine (souche Rupert), 10 femelles et 15 mâles ont servi à la formation des 23 familles, qui ont donné 1 281 descendants. Ces 62 truites mouchetées étaient conservées au Laboratoire Régional des Sciences Aquatiques (LARSA), ville de Québec, Québec, Canada, plus précisément à l'Université Laval. Les géniteurs ont été croisés entre le 30 novembre et le 12 décembre 2001 par notre prédécesseur, Philippe D'Autray Tarte, (Tableau I). Le processus d'adaptation puis d'infection des poissons s'est déroulé dans des conditions contrôlées. Le pH, la température de l'eau des bassins, la filtration, l'aération ainsi que l'éclairage ont été minutieusement préparés. Pour les détails techniques concernant l'expérience d'adaptation et d'infection, prière de vous référer au mémoire de Philippe D'Autray Tarte (2004).

Tableau I : Génotype des individus des familles de truites mouchetées utilisées pour les séries d'infections.

Bassins 6 et 11						
Femelles	Mâles	CMH classe I $\alpha 2$		CMH classe I $\alpha 1$		Familles
252	88	AA	AB	AA	AA	7
217	84	AA	AB	AA	AA	11
126	196	AC	AA	AB	AA	1
38	148	AB	AA	AA	AA	21
38	247	AB	AB	AA	AA	20

Bassins 2 et 7						
Femelles	Mâles	CMH classe I $\alpha 2$		CMH classe I $\alpha 1$		Familles
252	249	AA	AB	AA	AA	8
193	162	AA	AB	AA	AA	4
217	250	AA	AB	AA	AA	13
126	196	AC	AA	AB	AA	1
231	247	AB	AB	AA	AA	19

Bassins 3 et 8						
Femelles	Mâles	CMH classe I $\alpha 2$		CMH classe I $\alpha 1$		Familles
135	235	AB	AB	AA	AA	27
217	65	AA	AC	AA	AB	12
126	162	AC	AB	AB	AA	3
94	148	AB	AA	AA	AA	24
231	114	AB	AB	AA	AA	17

Bassins 5 et 10						
Femelles	Mâles	CMH classe I $\alpha 2$		CMH classe I $\alpha 1$		Familles
135	177	AB	AB	AA	AA	26
242	84	AB	AB	AA	AA	15
126	100	AC	AB	AB	AA	2
251	177	AA	AB	AA	AA	16
38	177	AB	AB	AA	AA	22

Bassins 4 et 9						
Femelles	Mâles	CMH classe I $\alpha 2$		CMH classe I $\alpha 1$		Familles
252	196	AA	AA	AA	AA	9
193	100	AA	AA	AA	AA	5
193	138	AA	AB	AA	AA	6
126	196	AC	AA	AB	AA	1
231	51	AB	AA	AA	AA	18

### 3.1.2 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction d'ADN des poissons a été réalisée grâce à un protocole modifié d'une trousse de la compagnie Millipore servant normalement à faire des minipreps d'ADN bactérien de hauts poids moléculaire. Ce protocole modifié a été élaboré par Robert Saint-Laurent (Université Laval). Tout d'abord, approximativement 10 mg de nageoire caudale ou adipeuse a été déposé dans les puits de la plaque de 96 puits. Ensuite, un volume de 500 µl de la solution de lyse (Tris-HCl 50 mM à pH 8,0, EDTA 0,1 M à pH 8,0, SDS 1 % et protéinase K 0,1 mg/ml) a été ajouté dans chaque puits. La plaque était incubée pendant 15 heures (une nuit), à 37°C, avec agitation. Puis, les échantillons étaient transférés sur la plaque « clearing ». Le protocole du manufacturier était alors suivi de l'étape 6 jusqu'à la fin. Enfin, l'ADN purifié était resuspendu dans 50 µl du tampon 5 de la trousse. Il était conservé à -20°C (voir annexe I).

### 3.1.3 Amplification des introns flanquant la région de la niche peptidique du CMH de classe I

Cette région comprend la séquence de tête, l'intron 1, l'exon 1 (domaine  $\alpha 1$ ), l'intron 2, l'exon 2 (domaine  $\alpha 2$ ) et l'intron 3 (Figure 5 et Figure 6). En se basant sur des séquences déjà publiées, des oligonucléotides ont été synthétisés afin de l'amplifier. Grâce à trois paires d'oligonucléotides (p321-322), l'intron trois a été amplifié (p313-314) ; l'exon 2 ainsi que des parties de l'intron 1 (p319-322) et la région allant de l'intron 2 à l'intron 3 (Tableau II).

La réaction de PCR comprenait 0,2 mM de dNTP, 1X de tampon PCR (Invitrogen), 5 pmol de chaque oligonucléotide, 4 mM de  $MgCl_2$  et 2,5 U de Taq polymérase maison (Annexe II), pour un volume total de 50  $\mu$ l. Les cycles du PCR étaient : 94°C pendant trois minutes, 35 cycles comportant une phase de dénaturation à 94°C durant une minute, une phase d'hybridation à 47°C (pour les oligonucléotides, p313-314) ou 50°C (pour les oligonucléotides, p319 et p322-321 et p322) durant une minute et une phase d'extension à 72°C durant deux minutes, et un cycle d'extension finale de dix minutes à 72°C.

Ces trois régions ont alors été séquencées, et deux nouvelles paires d'oligonucléotides correspondant aux séquences de nos poissons et se situant tout juste à l'extérieur ou à l'extrémité des exons 2 et 3 ont été synthétisées.

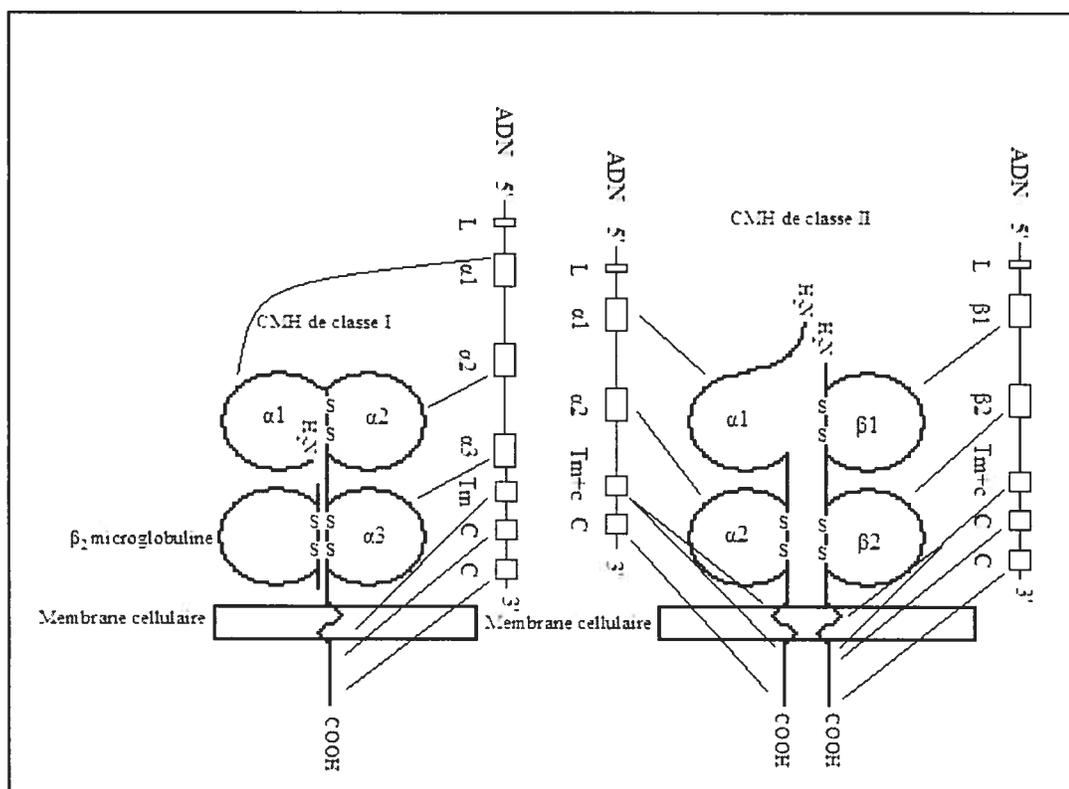


Figure 5 : Régions génomiques et leurs correspondances sur la molécule de CMH de classe I et II. Tiré de Kurby (1997).

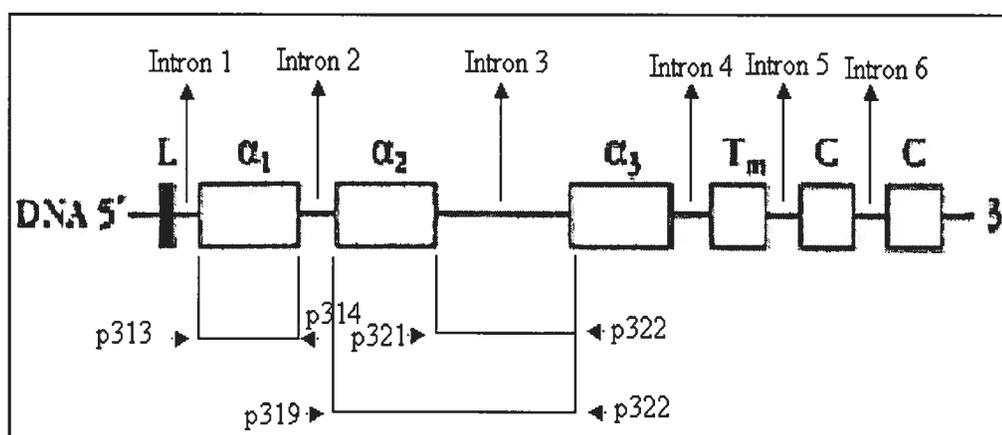


Figure 6 : Représentation schématique du CMH de classe I des régions génomiques amplifiées puis séquencées pour déterminer la séquence exacte des poissons. Le schéma n'est pas à l'échelle. Tiré de Kurby (1997).

Tableau II : Séquences des différentes amorces nucléotidiques ainsi que les régions qu'elles amplifient.

Amorces nucléotidiques	Séquences	Regions amplifiées
p313	5'TCACTCCCTGAAGTATTTCTACAC3'	De l'exon 2 à une partie de l'intron 1
p314	5'TCCACTTTGGTTAAAACGCTG3'	
p319	5'GCAGCGTTTTAACAAA(CG)TGG3'	De l'intron 2 à l'intron 3
p322	5' TAGAAACCTGTCGCGTGG 3'	
p321	5'GCATTGAGTGGCTGAAGAAG3'	L'intron 3
p322	5'TAGAAACCTGTCGCGTGG3'	
p346	5'TTTCAGGAGTCCATGTTCTCCAG3'	L'exon 3
p348	5'GACATTCTGAATGTTACCTGTCCTC3'	

#### 3.1.4 Amplification des exons de la région de la niche peptidique

Les deux paires d'oligonucléotides utilisées pour amplifier les exons de la région de la niche peptidique sont p313 et p314, qui ont été précédemment utilisées pour le domaine  $\alpha 1$ . Une nouvelle paire p346 et p348 a été utilisée pour le domaine  $\alpha 2$  (Tableau II).

Pour les gels radioactifs, des PCR radioactifs ont été effectués. Les oligonucléotides sens p313 pour le domaine  $\alpha 1$  et p346 pour le domaine  $\alpha 2$  étaient marqués au  $^{33}\text{P}$  (250  $\mu\text{Ci}$ ) de la compagnie GE Healthcare. La réaction de phosphorylation se faisait grâce à l'enzyme  $T_4\text{PNK}$  (New England Biolabs). 150 pmol d'oligonucléotide, du tampon 1X, 75 pmol d'ATP marqué au  $^{33}\text{P}$  (3 000 Ci/mmol), 75 pmol d'ATP et 80 U de  $T_4\text{PNK}$  sont mélangés, pour un volume total de 150  $\mu\text{l}$ . Le tout est incubé à 37°C pendant 30 minutes, puis placé à 65°C durant 20 minutes.

La réaction de PCR était composée de 0,2 mM de dNTP, 1X de tampon PCR de la compagnie Gibco-BRL, 5 pmol de chaque oligonucléotide, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  et

2,5 U de la Taq polymérase maison, pour un volume total de 50 µl. Les cycles du PCR étaient : 94°C pendant trois minutes, 35 cycles comportant une phase de dénaturation à 94°C durant une minute, une phase d'hybridation à 52,5° C durant une minute et une phase d'extension des amorces à 72°C durant une minute, enfin un cycle d'extension final à 72°C durant dix minutes.

### 3.1.5 Études des allèles via la technique du « Single Strand Conformational Polymorphism »

La technique du « Single Strand Conformational Polymorphism » (SSCP) permet la détection de polymorphismes par la renaturation différentielle séquence-dépendante survenant lors de la migration électrophorétique de l'ADN (Gray *et al.*, 2000).

L'identification des allèles a été effectuée en les séparant sur des gels non dénaturants contenant 10 % d'acrylamide/bisacrylamide (29:1), 5 % de glycérol et 0,5 X de tampon TBE (45 mM Tris, 45 mM acide borique, 1 mM EDTA pH 8,0). L'électrophorèse a été effectuée dans un tampon TBE 1X à 4°C dans un appareil de séquençage de la compagnie Life Technologies Inc., Modèle S2. Les échantillons à analyser étaient mélangés avec de la formamide (concentration finale : 50 %), ils étaient chauffés à 100°C durant cinq minutes et enfin laissés pour reposer sur de la glace. Un volume de 5 µl de chacun des échantillons était chargé sur le gel. La migration de l'ADN se faisait pendant 12 heures à 20 mA constant pour les géniteurs, alors qu'elle se faisait en trois heures à 100 mA pour les descendants, afin de pouvoir mieux discerner les patrons de migration. Enfin,

le gel était séché avec un séchoir à gel (BIORAD) et exposé sur un film à rayon X dans une cassette avec écran d'amplification de signal à une température de  $-80^{\circ}\text{C}$  durant environ 48 heures.

Les échantillons utilisés pour identifier les allèles de poissons par la technique du SSCP ont été préalablement amplifiés par la Taq polymérase maison. Après identification des allèles, l'ADN des poissons ayant chacun des allèles était amplifié avec la Taq haute fidélité de la compagnie Roche. Contrairement à la Taq polymérase maison, la Taq haute fidélité permettait d'obtenir des amplicons d'une très grande fidélité, mais son rendement était plus faible. Pour des raisons de sécurité, les échantillons qui devaient être séquencés ne devaient pas contenir de radioactivité. C'est pourquoi les échantillons amplifiés avec la Taq haute fidélité ont été migrés parallèlement avec leurs homologues amplifiés avec la Taq polymérase maison et radioactif, afin de pouvoir visualiser et localiser les bandes de SSCP par autoradiographie.

### 3.1.6 Extraction de l'ADN des bandes découpées sur gel et réamplification

À l'aide du film, les différentes bandes des différents allèles provenant d'échantillons amplifiés par la Taq haute fidélité de la compagnie Roche ont été découpées du gel séché. L'ADN présent dans les échantillons était récupéré par trempage durant 10 minutes dans 100  $\mu\text{l}$  d'eau et chauffé pendant 15 minutes à  $100^{\circ}\text{C}$ . Ensuite, les échantillons étaient centrifugés à 15 000 g durant deux minutes. Le surnageant était transféré dans un autre tube contenant 10  $\mu\text{l}$  de NaOAc (3 M ; pH 5,2), 5  $\mu\text{l}$  de glycogène (10 mg/ml) et 450  $\mu\text{l}$  d'éthanol à 100

%. Le tout était incubé 30 minutes sur glace sèche, puis centrifugé durant 30 minutes à 15 000 g à 4°C. Le surnageant était jeté et le culot était lavé avec de l'éthanol à 100 %. Enfin, l'ADN séché était suspendu à nouveau dans 10 µl d'eau et conservé à -20°C.

Un volume de 4 µl de cet ADN était utilisé afin d'effectuer une nouvelle amplification par PCR avec la Taq polymérase haute fidélité et selon les mêmes spécifications décrites ci-dessus.

### 3.1.7 Purification sur gel d'agarose, découpage des bandes et clonage

Les échantillons issus de la deuxième amplification par PCR avec la Taq polymérase haute fidélité ont été purifiés par migration sur gel d'agarose à 1 %. Les bandes colorées par le bromure d'éthidium (EtBr) étaient découpées, et l'ADN présent était récupéré à l'aide de la trousse de récupération de bandes Sephaglas™ Band Prep Kit (GE Healthcare). Le clonage des allèles a été effectué dans la bactérie *E. coli* DH10B, à l'aide du vecteur pT7-Blue-2 de l'ensemble Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen), suivant les directives du manufacturier.

### 3.1.8 Minipreps

Les transformants obtenus ont été repiqués et mis en bouillon avec de l'ampicilline [100 µg/ml]. L'ADN plasmidique a été extrait à l'aide de la procédure de miniprep SDS/NaOH de Birnboim et Doly (1979).

### 3.1.9 Séquençage des allèles du CMH classe I domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$

Après le clonage, deux réplicats de chacun des allèles identifiés par SSCP ont été séquencés. Le séquençage a été effectué par le séquenceur automatique à 16 capillaires (modèle ABI PRISM 3100) au service de séquençages du laboratoire d'immunogénétique du Centre de recherche du CHUM, campus Notre-Dame, à Montréal.

### 3.1.10 Étude des descendants

Pour le domaine  $\alpha 1$ , l'analyse a été effectuée par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1 %, au lieu de la méthode de SSCP. Un nouvel oligonucléotide a été synthétisé : p376 (5'GAAATCAGCTTGCTGTTTAG3'). Ce nouvel oligonucléotide se situe dans une région où se trouve une des mutations différenciant l'allèle A de l'allèle B dans le domaine  $\alpha 1$ . La paire p313-p376 utilisée lors des PCR d'analyse des descendants permet de distinguer les individus de génotype AA et AB. Dans des conditions stringentes de PCR, les individus de génotype AA ne sont pas amplifiés. Les conditions stringentes de PCR étaient : 0,2 mM de dNTP, 1X de tampon PCR (Gibco-BRL), 5 pmol de chaque oligonucléotide, 2,5 mM  $MgCl_2$  et 2,5 U de la Taq polymérase maison, pour un volume total de 50  $\mu$ l. Les cycles du PCR étaient : un cycle à 94°C pendant trois minutes, 35 cycles comportant une phase de dénaturation à 94°C durant une minute, une phase d'hybridation à 59°C durant une minute et une phase d'extension des amorces à 72°C durant deux minutes, enfin un cycle d'extension finale à 72°C durant dix minutes.

Pour le domaine  $\alpha 2$ , la paire d'oligonucléotides p346-p348 a été utilisée, afin de déterminer les génotypes des descendants. Après avoir amplifié le domaine  $\alpha 2$  par PCR, les 1 281 échantillons étaient analysés par SSCP.

### 3.1.11 Analyse statistique

L'analyse par régression linéaire a été effectuée pour identifier l'association statistique entre la présence des allèles du CMH-I, et le temps de survie, et aussi le poids des organismes indépendamment des facteurs non-génétiques. Elle a été effectuée, par le D<sup>r</sup> Guy Perry, de l'Université Laval, à l'aide du modèle statistique spécifique : la procédure mixte grâce au logiciel informatique SAS (PROC MIXED; SAS institute, 1998). Ce modèle « au hasard » a été appliqué séparément pour chaque forme d'allèle (A, B et C) du locus *Ia1*. Les allèles ne peuvent donc tous être intégrés dans un même modèle, parce que la présence d'un allèle est fonction de la présence des deux autres allèles (système « déterministique »). Par exemple, la fréquence 0.2 de l'allèle  $a_1$  et 0.5 de l'allèle  $a_2$  indiquent que la fréquence de l'allèle  $a_3$  est 0.3. La formule statistique est :  $y = u + a + b + BX + e$  où « y » représente le phénotype (poids ou survie en heures), « u » représente la moyenne, « a » la famille, « b » représente l'effet du bassin, « B » le coefficient de la régression de poids ou de temps survie sur le nombre d'allèles A ou B ou C, « X » le nombre d'allèles de la forme testée ( $a_1$ ,  $a_2$  ou  $a_3$ ) et « e » représente l'erreur des analyses. Tous les termes du modèle sont répartis « au hasard »; c'est-à-dire, qu'on suppose que leurs distributions sont choisies « au hasard » au sein d'une incidence naturelle des valeurs. L'erreur standard

$(\sigma^2 = \hat{\sigma} / \sqrt{n})$  a été calculée par PROC MIXED dans SAS (1998). Il y a 23 familles dans le modèle. Les familles présentant des problèmes d'identification sont séparées du reste et elles ont été exclues de l'analyse. Il y a 1 193 objets utilisés et 88 observations non utilisées. Les résultats ont été compilés afin de fournir une vue d'ensemble.

## 4 Résultats

### 4.1 *Salvelinus fontinalis*, souche Rupert

Cette partie comprend les résultats des différentes expériences portant sur l'omble de fontaine.

#### 4.1.1 Détermination de la séquence exacte des introns de la niche peptidique

Dans un premier temps, trois paires d'oligonucléotides ont été utilisées pour amplifier par PCR les introns de la région de la niche peptidique. Elles ont été élaborées en s'inspirant de séquences de poissons apparentés (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta*) publiées dans la littérature (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Plusieurs de ces séquences déjà connues ont été alignées, afin de déterminer les régions qui semblaient les moins polymorphes. Ces régions ont donc servi de base pour synthétiser les trois paires d'oligonucléotides (Figure 7). Le séquençage des introns permet de synthétiser d'éventuels oligonucléotides dans des régions tout juste à l'extérieur des exons ou à leurs extrémités, ceci afin de couvrir toutes les mutations possibles dans ces régions codantes (Figure 8, Figure 9 et Figure 10).



```

ATTTTGGAGAACAGATTACACCAATGTTGGTGACCCTCCTTCTCTCTTTTCAGGAG (intron 2)
TGCATGTTTTCCAGTACATTCTATGGCTGCTCTCCGGGATGAGACTGGAAAGACAGAGGGGTT
TGGACAAGCTGGGTTATAATGGGGAGAACTTCCTTGAGTACGACATGAATGATTTTCGCTTGG
AATCTCTTAAACAGCAAGCTGATTCATGCAGGTTAAGTGGAAACAGTGACTCCAGTAGACTGG
TATTCTGGAATATCTACTTCACCCAGACCTGCATTGAGTGTCTGAACAAGCAGGTGGTCAATG
GGAAGAGCATTCTGATGAGGACAG (exon 3)
GTAAACATTCAGAAATGTCACCTTTTTCTTTTGTCTTAGATTTATGCAACACTTGACATCTATC
TTTTGATTGTGAATGAATTCCAGTACAACATAATTATAGATGTGTCACCTTAGGAACATTGAGT
GGTTCTGGAACAACAGTGAATATGTCTGGTTAATGATACAGAATGCAACCATATTGTTGTGAC
GTTTCATCTATACCACCAACATCCTTTATCTTTACTGATTCTGTGTTATATACAGAAATCACCAT
CATTTATAGTATAATTTGGATAAATGTAGATGCTTTTAGTCTGCGCTCATTTAAAAATAACAC
CAATGAAATATCTGAACTCTCCCTCCAG (intron 3)
TCCCTCCATCAGTGTCTCTCGTCCAGAAGACCCCTCCTCCTCCAGTGACCTG (exon 4)
CCACGCGACAGGTTTCTA (oligo p322)

```

Figure 9 : Fin de la séquence de l'intron 2, la séquence entière de l'exon 3 et de l'intron 3, et début de la séquence de l'exon 4.

```

TAGAAACCTGTCGCGTGG(Oligo P322)
TCAAGCATGATACCGGACCAATTTTGTCTGCCGGGTGAATATCGACCTGGAACGTCACAGAA
ACCTGGTTTTGCAGAAGATTGCCAGTGCGCGACGCCCTGATTCCACAACCAAGTGACCGATGC
GATAGGCCTGCAAGGCATGAAAACCTTCAGGTATAACAACGGGGTTGAGTATTATCGACTG
CCGGGTGCGGGTACGCACCGCCTGAATATCACAGGCCGCANAGGCGATCATTTCCGGGTCA
GCGGCGTAGG
CTTCTTCAGCCACTCAATGC(OligoP321)

```

Figure 10 : Séquence de l'intron 3 flanquée des deux oligonucléotides p322 et p321.

#### 4.1.2 Technique du SSCP

Ensuite, après le séquençage de ces régions introniques, deux nouvelles paires d'oligonucléotides ont permis d'amplifier les régions exoniques des poissons par PCR. Les produits de PCR étaient alors séparés sur gel d'agarose à 1 %.

Après optimisation des conditions de PCR, les exons amplifiés étaient analysés par SSCP.

Les poissons géniteurs ont été passés au crible par SSCP, afin d'identifier les allèles présents chez ces poissons. Le SSCP permet une discrimination par migration électrophorétique différentielle séquence-dépendante (Figure 11). Grâce à différents patrons de migration, elle permet de visualiser et donc

d'identifier les allèles présents chez chacun des poissons. À l'aide des deux paires d'oligos p313-314 et p346-348, les différentes combinaisons des divers allèles chez chaque poisson ont été visualisées.

#### 4.1.3 Allèles du CMH de classe I $\alpha 2$ et $\alpha 1$

Cinq allèles du domaine  $\alpha 2$  du CMH de classe I ont été identifiés chez les géniteurs : A, B, C, D et E. Toutefois, les individus portant les allèles D et E n'ont pas eu de descendants. Donc, les 1 281 poissons issus de 23 familles portent seulement les trois allèles A, B et C (Figure 11). En ce qui concerne le domaine  $\alpha 1$ , deux allèles ont été identifiés : A et B (Figure 12). Toutes les séquences d'ADN du CMH de classe I du domaine  $\alpha 2$  (allèles A, B, C, D et E) ainsi que celles du domaine  $\alpha 1$  (allèles A et B) ont été traduites en acides aminés. Ces acides aminés ont alors été alignés, afin de localiser et de comparer les mutations entre les protéines des différents allèles (Figure 13 et Figure 14).

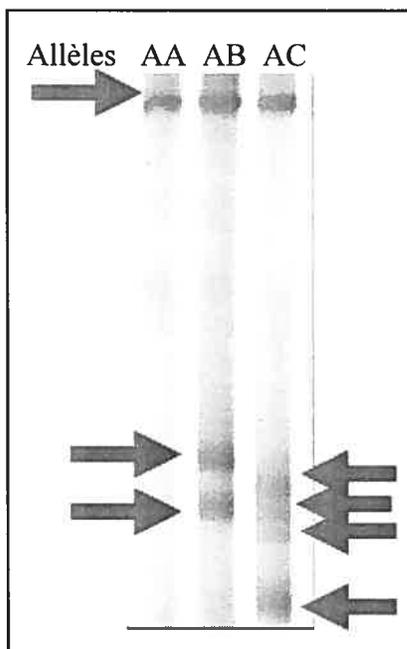


Figure 11 : Différenciation des différents patrons des allèles A, B et C du CMH de classe I, domaine  $\alpha 2$ , par la technique du SSCP radioactif.

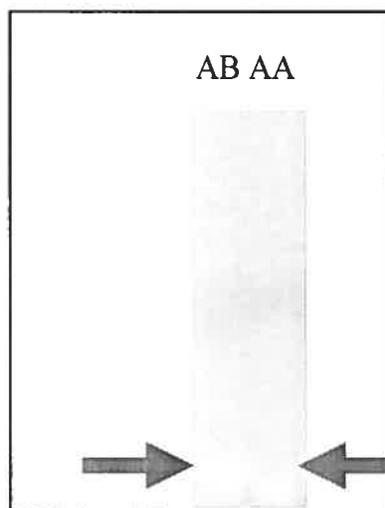


Figure 12: Différenciation des différents patrons des allèles A, B du CMH de classe I, domaine  $\alpha 1$ , par la technique du PCR en conditions stringentes et migration sur gel d'agarose 1 %.

A	YIYGCSRDETGKTEGFGQLGYNGENFLEYDMNDFAWKSLKQQADFMQVKW	50
B	.....P.....	50
C	.....AL.....D..	50
D	.....P.....	50
E	.....R.....	50
A	NSDSSRLVFWNIYFTQTCIECLNKQVVNGKSIL	83
B	.....	83
C	.H.G...D..RF.....S.	83
D	.....	83
E	.....	83

Figure 13 : Séquences en acides aminés des cinq allèles du CMH classe I, domaine  $\alpha 2$ .

A	IHSLKHFYTASSGVHNFPEFVVVGKVDDVQMVHYDSNSQKVVPKQDWMKQ	50
B	A.....S.....DIP.....EM..G.....E...R..	50
A	TDAEFWESEREKFFDSQQSFKADVHILKQRFNQSG	85
B	.....N..H.....VE....M.....	85

Figure 14 : Séquences en acides aminés des deux allèles du CMH classe I, domaine  $\alpha 1$ .

#### 4.1.4 Analyse statistique

Le test de Shapiro et Wilk (1965) a d'abord été effectué afin d'analyser nos données et déterminer si elles avaient une distribution normale. Il permet de calculer la statistique  $W$ , qui évalue si un échantillon au hasard provient d'une distribution normale. Dans le cas présent, nos données (poids et survie) n'ont pas de distribution normale ( $p < 0,001$  pour les deux traits), d'où l'utilisation du test de Box-Cox. En effet, de nombreux tests statistiques se basent sur le fait que les données sont normales. Or souvent, en réalité, les données n'ont pas de distribution normale, nécessitant alors leur transformation, afin de suivre une telle

distribution. Le test Box-Cox a donc permis de trouver une transformation qui normalise les données de survie et de poids qui pourront être utilisées dans le test statistique de régression.

Grâce à l'analyse de variance par régression linéaire au moyen du modèle statistique de la procédure mixte et à l'aide du logiciel SAS, l'analyse statistique du temps de survie en fonction du génotype et du poids a été effectuée chez la progéniture. Les poissons du premier répliat (Figure 15) offrent en moyenne un temps de survie plus court, comparativement aux poissons du deuxième répliat (données non-présentées), mais le taux de survie montre une tendance semblable dans les deux répliat.

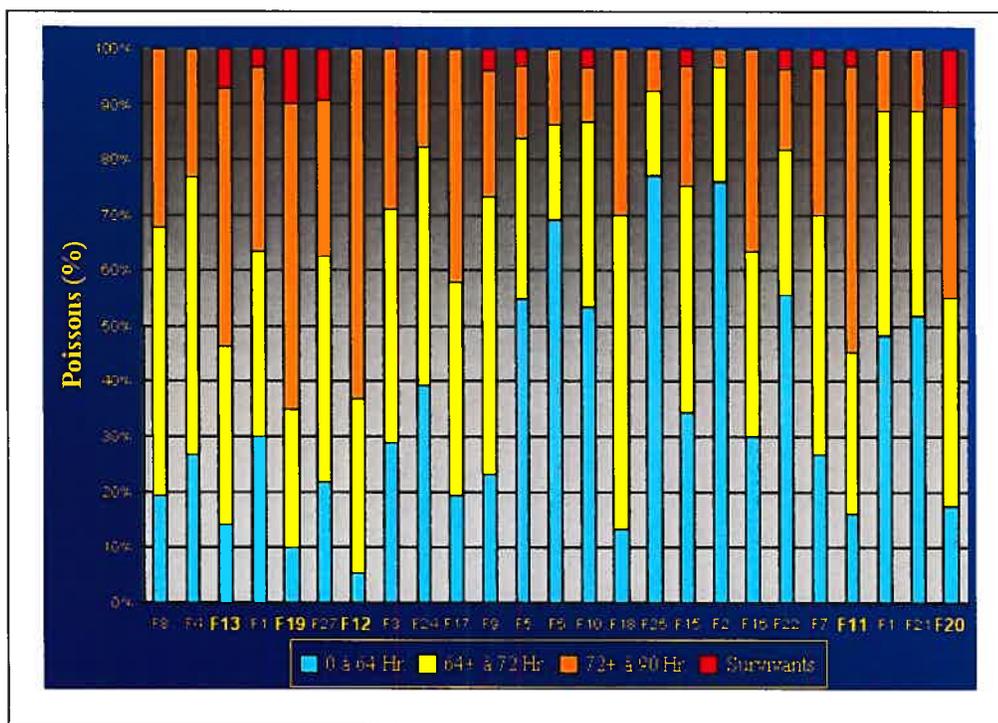


Figure 15 : Distribution des mortalités en pourcentage, suite aux tests de résistance à la bactérie *Aeromonas salmonicida* chez les 23 familles de poissons (omble de fontaine, souche Rupert), lors du premier réplicat de l'expérience.

Les Tableaux III et IV montrent la variation qui existe au sein du modèle ainsi que l'effet de l'allèle du CMH de classe I. En effet, le Tableau III présente la probabilité d'avoir un lien entre le temps de survie et l'allèle du CMH de classe I. Le Tableau IV présente la probabilité d'avoir un lien entre le poids du poisson et l'allèle du CMH de classe I. L'effet de l'allèle permet de déterminer si sa présence est un avantage ou un inconvénient pour le poisson qui le possède.

Les résultats de ces tests statistiques de régression linéaire sont présentés au Tableau III et IV. Les études ont été effectuées afin de trouver des liens éventuels entre les allèles du CMH de classe I et la survie ou le poids.

Toutefois, cette analyse permet de faire ressortir un lien statistique significatif entre l'allèle B et le taux de survie des poissons ( $p=0,0481 < 0,05$ ), la probabilité étant représentée par « p », et le nombre 0,05 représentant un taux d'erreur de 5 %. Un taux d'erreur en dessous de 0,05 signifie donc la probabilité qu'il y ait moins de 5 % de chances que l'association entre la survie et l'allèle soit due au hasard et non pas à la présence de cet allèle. Or, cette corrélation indique seulement s'il existe une relation entre l'allèle et le taux de survie, qui peut être négatif ou positif. C'est l'effet positif ou négatif de l'allèle qui démontre si sa présence dans le génotype des poissons les avantage (positif) ou les désavantage (négatif) face à *A. salmonicida*. L'effet de l'allèle B, qui présente un lien significatif avec le taux de survie, est négatif. Les deux autres allèles ne sont aucunement corrélés avec une capacité accrue des poissons à survivre à l'infection bactérienne.

Enfin, il est à noter que la variance au sein du modèle a été très faible. Les familles n'ont pas présenté de variances notables, et la structure des familles en général ne varie pas, rendant la variance réduite au sein du modèle statistique.

L'analyse statistique a pris en compte la variable du poids des poissons, afin de savoir si le poids a joué un rôle significatif dans la capacité des poissons de résister à la furonculose. Or, les résultats statistiques démontrent que le poids n'a eu aucun effet sur le taux de survie des poissons face à l'infection bactérienne ( $p > 0,05$  dans les trois cas).

Tableau III : Corrélation entre le temps de survie et les allèles du CMH de classe I après l'infection à *A. salmonicida* de la descendance des géniteurs de l'omble de fontaine déterminée par l'analyse de variance par régression linéaire.

Allèles et survie	P (Pr>F)	Proportion de variance du modèle	L'effet de l'allèle
A	0,1673	1,192E-6	0,000741
B	<b>0,0481</b>	4,999E-6	-0,00181
C	0,4945	-2,76E-6	-0,00173

Les valeurs de p en gras ( $p < 0,05$ ) sont celles où la corrélation est statistiquement significative.

Tableau IV : Corrélation entre le poids et les allèles du CMH de classe I après l'infection à *A. salmonicida* de la descendance des géniteurs de l'omble de fontaine déterminée par l'analyse de variance par régression linéaire.

Allèles et poids	p (Pr>F)	Proportion de variance du modèle	L'effet de l'allèle
A	0,3505	-0,00075	-0,00892
B	0,1583	0,007645	-0,05731
C	0,5539	-0,01506	-0,1997

Les valeurs de p en gras ( $p < 0,05$ ) sont celles où la corrélation est statistiquement significative.

## 5 Discussion

### 5.1 CMH classe II de l'omble de fontaine (souche Rupert) et la résistance face à *A. salmonicida*

Initialement, le premier volet du projet, effectué par Philippe D'Autray Tarte, a consisté à déterminer un lien statistique entre des allèles du CMH de classe II  $\beta$  de l'omble de fontaine et une résistance accrue face à la furonculose causée par la bactérie *A. salmonicida*. Six allèles (A, B, C, D, E et F) ont été identifiés dans la population de géniteurs de *Salvelinus fontinalis*, souche Rupert.

Étant donné la structure du CMH de classe II, où les domaines  $\beta$  et  $\alpha$  sont ceux qui forment la niche peptidique liant l'antigène au CMH, et que le domaine  $\alpha$  est très peu polymorphique, c'est le domaine  $\beta$  qui a été étudié.

Les résultats des tests statistiques ont permis d'établir un lien significatif entre la présence de l'allèle B chez les poissons et leur capacité accrue à résister à la bactérie *A. salmonicida*.

### 5.2 CMH de classe I et la résistance de l'omble de fontaine de souche Rupert face à *A. salmonicida*

Le principal but du présent projet de recherche était de trouver un lien statistique entre la présence d'un ou de plusieurs allèles du CMH de classe I domaine  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  chez l'omble de fontaine et la résistance à la furonculose.

La première étape, consistant à séquencer les régions génomiques de l'omble de fontaine avant d'identifier nos allèles, avait deux buts : elle permettait

d'obtenir les séquences exactes de *Salvelinus fontinalis* ; en effet, ces séquences ne sont pas disponibles dans la littérature. Elle permettait aussi de synthétiser les oligonucléotides des étapes suivantes dans des régions introniques, et ceci afin de pouvoir détecter les mutations qui pourraient se situer au tout début ou à la toute fin des exons.

Lors de l'étape d'identification des allèles chez les géniteurs, des essais ont été effectués avec divers oligonucléotides, de manière à ce qu'ils se situent dans des régions introniques, et que l'amplification et la détection d'allèles puisse se faire sur les diverses régions exoniques en entier. Toutefois, certaines paires d'oligonucléotides n'ont pas donné de résultats (Tableau V). C'est pourquoi l'analyse des allèles s'est faite avec certains oligonucléotides exoniques.

Les acides aminés impliqués dans la liaison antigène-CMH classe I se situent aux extrémités de la niche peptidique (Figure 16). Or, la proline qui a remplacé la leucine se situe dans une région avoisinant la niche peptidique (Figure 17 et Figure 18). Par conséquent, la mutation ne se situe pas au niveau des acides aminés directement impliqués dans la liaison antigène-CMH. Toutefois, il ne peut être exclu que les mutations se situant dans des régions avoisinantes n'entraînent la modification de la structure du CMH, améliorant ou réduisant ainsi sa capacité de lier les peptides.

**Tableau V: Séquences des différents oligonucléotides utilisés lors de l'expérimentation et qui n'ont pas donné de résultats probants.**

Régions	Oligonucléotides	Séquences
Leader	Sens-p317	5'CCTTCTTCATACAGCATCTGC3'
Intron 1	Sens-p333	5'CCTCTGTCTAGTCTACATGACTTTGG3'
	Sens-p334	5'CCAGTTTATTAAGAGTAGTGTGG3'
	Sens-p335	5'CTCTTTGTAAGTGCATCCTGCAG3'
	Sens-p343	5'CAACATTAACATGTACTTTTCCCCTCTAG3'
Exon 2	Antisens-p318	5'GTAGAAATACTTCAGGGAGTGAG3'
Intron 2	Sens-p337	5'GATTACACCAATGTTGGTGACCC3'
	Sens-p344	5'AGAGAAGCAGAGGAGCAGAACATG3'
	Sens-p345	5'GAGATCCCACGGCAGACTG3'
	Antisens-p284	5'GATCAGATGAGGTAAGATGAAGGAC3'
	Antisens-p336	5'CAAAACACAACATGATCAGATGTGG3'
Exon 3	Sens-p346	5'TTTCAGGAGTCCATGTTCTCCAG3'
	Sens-366	5'TCCATGTTCTCCAGTACATCTATGGC3'
	Antisens-p320	5'GAAATCCTCTCCATCATATCCA3'
	Antisens-p347	5'CCCCATTATAACCCAGCTGTCC3'
	Antisens-p348	5'GACATTTCTGAATGTTTACCTGTCC3'
	Antisens-p367	5'CTGTCCTCATCAGAATGCTTCCC3'
Intron 3	Antisens-p338	5'CTAAGAACAAAAGAAAAAGTGACATTTCTG3'

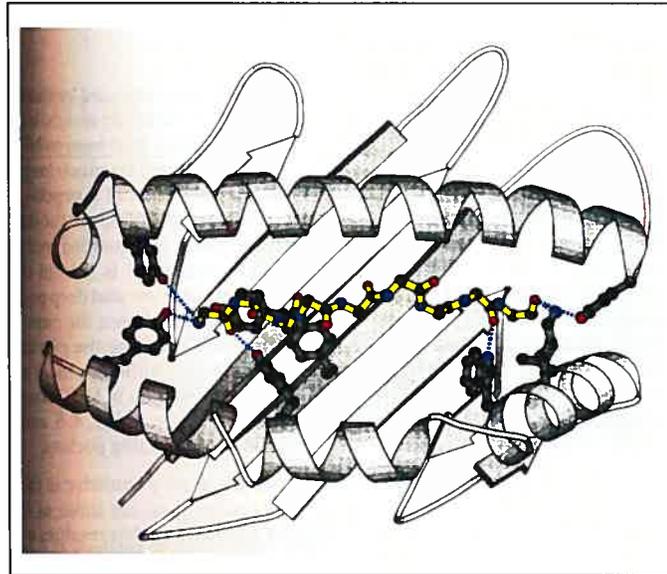


Figure 16: Schéma de la niche peptidique vue du dessus, avec les liaisons réversibles (liaisons hydrogènes) entre le peptide et le CMH de classe I (Janeway, 2001).



Figure 17 : Représentation en trois dimensions du CMH de classe I de souris (vue du dessus). La séquence d'acides aminés de l'allèle B du CMH classe I  $\alpha 2$  de nos poissons a été alignée avec la séquence d'acides aminés du CMH de classe I  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  publiés de la souris (Kellenberger, *et al.* 2005). Le résidu en jaune est celui qui se situe au niveau de l'unique mutation de l'allèle B chez nos poissons et où se trouve la proline.

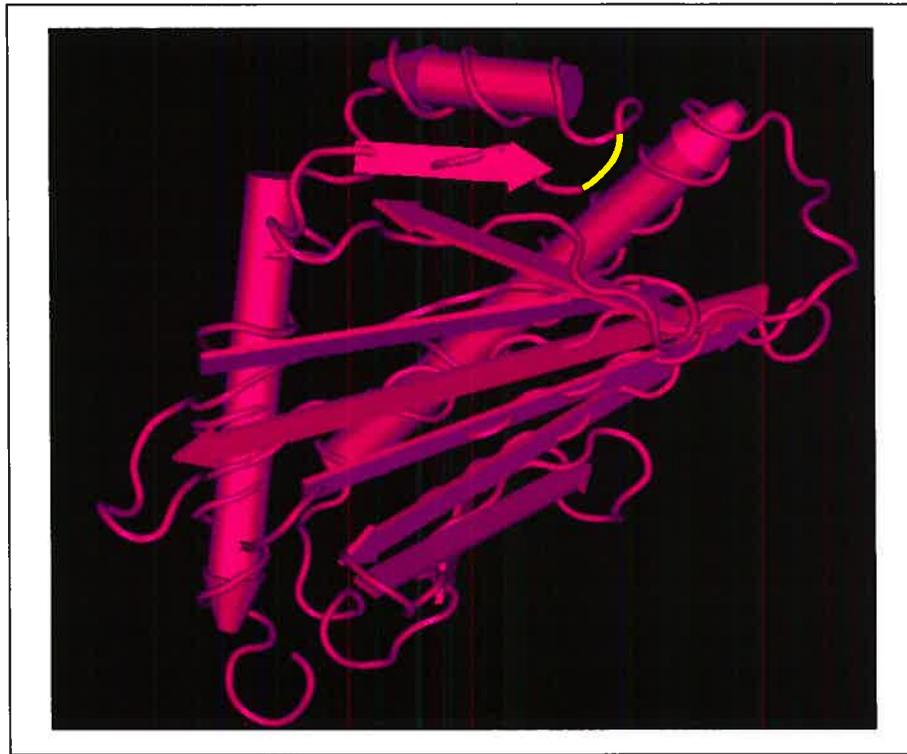


Figure 18 : Représentation en trois dimensions du CMH de classe I de l'humain (vue de dessous). La séquence d'acides aminés de l'allèle B du CMH classe I  $\alpha 2$  de nos poissons a été alignée avec la séquence d'acides aminés du CMH de classe I  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  publiés de l'Homme (Blicher, *et al.*, 2005). Le résidu en jaune est celui qui se situe au niveau de l'unique mutation de l'allèle B chez nos poissons et où se trouve la proline.

### 5.3 Analyse statistique

La régression permet de résumer la relation qui existe entre une variable aléatoire dépendante  $y$  et une ou plusieurs variables aléatoires ou contrôlées  $x_j$ , appelées variables explicatives. L'information relative au lien entre une série statistique  $y$  et une ou plusieurs séries statistiques  $x_j$  se résume en une équation et en l'estimation de quelques paramètres comme le coefficient de corrélation.

Elle permet de décrire la forme de la relation liant les variables entre elles. On parle alors de régression linéaire, où la relation est linéaire. On parle de régression polynomiale, où la relation est de  $n^{\text{e}}$  degrés. On parle aussi de régression hyperbolique, exponentielle, logistique ou autre.

Elle permet de prévoir les variations de  $y$  en fonction de celle de  $x_j$ . Elle permet donc d'estimer, avec un taux d'erreur minimal, la valeur inconnue ( $y$ ) d'un élément, sur la base de résultats obtenus sur les valeurs prédictives  $x_j$ .

Malgré le fait que diverses études utilisent les modèles de Cox et des courbes Kaplan-Meier pour analyser la susceptibilité et la résistance associées au CMH (Martin *et al.* 2002) , d'autres études choisissent des modèles linéaires simples (Jackson *et al.* 1998; Cnaani *et al.* 2003; Somorjai *et al.* 2003). Le choix du modèle statistique est donc en partie arbitraire. Les statistiques linéaires dans SAS permettent aussi d'effectuer d'autres statistiques comme la partitionnement de variance de chaque terme du modèle.

En ce qui concerne les oligonucléotides utilisés lors de l'analyse des allèles, nous avons séquencé les régions introniques, dans le but de synthétiser des oligonucléotides présents dans ces introns. Ces oligonucléotides introniques auraient permis l'amplification par PCR des régions exoniques et de toutes les mutations susceptibles de se trouver dans ces exons. Diverses paires d'oligonucléotides entièrement introniques ont été testées, afin de parvenir à amplifier les exons en entier, mais elles n'ont pas donné de résultats probants. Par conséquent, des paires d'oligonucléotides partiellement exoniques ou entièrement exoniques, mais situées aux extrémités des exons, ont été utilisées. Alors, le tout

début et la toute fin des exons sont exclus du processus de recherche du polymorphisme.

Ensuite, il est à noter que les poissons du deuxième lot de l'expérience d'infection se sont montrés plus résistants à la bactérie que ceux du premier lot infecté. Cette capacité de résistance accrue chez les individus du deuxième réplicat s'explique probablement par leur temps d'acclimatation plus long. Il existe un lien entre le taux de stress des poissons et l'apparition de la furonculose. Donc, des individus plus acclimatés à leur environnement sont moins stressés, et leur système immunitaire est plus apte à faire face à l'infection bactérienne. Toutefois, il est important de noter que bien qu'il y ait ce type de différence entre réplicats, les tendances intra-réplicats sont les mêmes entre les réplicats.

En ce qui concerne le lien statistique entre le CMH de classe I domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  et la résistance de l'omble de fontaine face à l'infection, les résultats sont présentés dans les analyses statistiques.

Les tests de régression suivant le modèle mixte calculés au moyen du logiciel SAS indiquent que la présence de l'allèle B du domaine  $\alpha 2$  chez un poisson est liée significativement à un taux de survie inférieur ( $p < 0,05$ ). Toutefois, les deux autres allèles A et C du domaine  $\alpha 2$  du CMH de classe I ne présentent aucune corrélation entre leur présence et le taux de survie ou le poids des poissons.

D'après les résultats du Tableau III, la probabilité que la relation entre l'allèle et le taux de survie soit due au hasard se situe en-dessous de 5 %, ce qui est significatif, et indique que l'allèle B et la survie des poissons sont statistiquement liés. Cette corrélation peut être négative ou positive. Or, l'effet de l'allèle B étant

négatif (-0,00181), cela suggère que la présence de cet allèle a un impact défavorable sur la résistance des individus face à la furonculose. Il n'y a pas de corrélation entre les autres allèles et la résistance ou la susceptibilité des individus à cette infection bactérienne. Ceci pourrait aussi permettre d'expliquer l'absence du génotype homozygote BB chez les descendants des familles. L'allèle B pourrait être délétère ou peut-être même inexprimé à la surface cellulaire, donc inefficace face aux infections et alors handicaper sérieusement les chances de survie du poisson.

L'absence d'homozygotes BB n'a pas d'influence sur l'estimation statistique de l'effet de l'allèle B, puisque c'est un modèle de régression sur le nombre d'allèles spécifiquement. La régression prend en compte l'intégralité du nombre d'allèles et les coefficients de régression sont liés au nombre d'allèles.

Les allèles A, C, D et E possèdent en commun une leucine, tandis que l'allèle B diffère des autres allèles par la présence d'une proline à la place de la leucine (Figure 13). Or, la proline est un acide aminé qui, de par sa structure, se trouve souvent au début d'une courbure dans la structure protéique (Krieger, *et al.*, 2005). Le CMH de classe I a tendance à lier les peptides à ses extrémités (Figure 16). Or, la substitution de la leucine par la proline se situe au niveau des résidus se trouvant juste avant l'extrémité d'une des hélices alpha impliquées dans la liaison du peptide (Figure 17 et Figure 18). Sa présence près de la niche peptidique pourrait changer la structure de la protéine. La proline pourrait induire une forte courbure à l'une des extrémités engagées dans la liaison avec le peptide et pourrait rendre la liaison CMH-peptide difficile ou même pourrait empêcher le

CMH de classe I de lier certains peptides, dont ceux de la bactérie *A. salmonicida*. Ces modifications auraient eu pour effet d'empêcher la bonne présentation de l'antigène à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, empêchant du même coup l'initiation d'une réponse immunitaire convenable.

D'après le Tableau IV, aucune corrélation n'existe entre la présence d'un des allèles du CMH de classe I et le poids des poissons ( $p < 0,05$ ).

Pour le domaine  $\alpha 1$ , les individus aux allèles différents ne sont pas significativement nombreux pour effectuer un test statistique valable.

## 6 Conclusion

Dans ce projet de recherche, l'objectif principal était de trouver un ou plusieurs allèles du CMH I domaine  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  procurant une résistance accrue à la furonculose. Cinq allèles du domaine  $\alpha 1$  ont été étudiés, et deux allèles ont été identifiés dans le domaine  $\alpha 2$ . À partir de 62 géniteurs d'ombles de fontaine, 23 familles ont été formées. Les descendants de ces poissons ont été génotypés et étudiés, afin de déterminer si un ou plusieurs allèles permettaient aux individus de mieux résister à l'infection bactérienne. Les individus ayant les différents allèles dans le domaine  $\alpha 1$  ont été trop peu nombreux pour se prêter à des tests statistiques.

Toutefois, en ce qui concerne le domaine  $\alpha 2$ , deux des allèles génotypés chez les parents ne se retrouvent pas chez les descendants. Donc, en tout, trois allèles (A, B et C) ont servi à l'étude, dont un allèle (l'allèle B) est ressorti avec un lien statistique significatif entre sa présence et une résistance diminuée des poissons face à la furonculose.

L'analyse statistique du CMH de classe I dans le but de trouver un lien éventuel entre la capacité de l'omble de fontaine à résister à une infection par *A. salmonicida* procurera un outil de plus à l'industrie piscicole pour lutter efficacement contre l'une des infections bactériennes les plus répandues. Lors de la frai, il est raisonnable de proposer aux pisciculteurs d'éviter des croisements entre poissons parents porteurs de l'allèle B, afin d'éviter que les poissons descendants ne soit plus susceptibles à la furonculose.

## 7 Références

- Acton, R. T., Weinhamer, P. F., Hall, S. J., Niedermeier, W., Shelton, E., and Bennet, J. C. (1971). "Tetrameric macroglobulins in three orders of bony fish". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**: 107-111.
- Anderson, D. P., Van Muiswinkel, W. B. and Roberson, B. S. (1984). "Effects of chemically induced immune modulation on infectious diseases of fish." *Progress in Clinical and Biological Research* **161**: 187-211.
- Aoyagi, K., Dijkstra, J.M., Xia, C., Denda, I., Ototake, M., Hashimoto, K. and Nakanishi, T. (2002). "Classical MHC class I genes composed of highly divergent sequence lineages share a single locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).". *Journal of Immunology*. **168** (1): 260-273.
- Arkoosh, M. R., and Kaatari, S. L. (1991). "Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An Immunochemical and cellular analysis of the B cell response." *Developmental and Comparative Immunology* **15** (4): 279-93.
- Arkush, K.D., Giese, A.R., Mendonca, H.L., McBride, A.M., Marty, G.D. and Hedrick, P.W. (2002). "Resistance to three pathogens in the endangered winter-run chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): effects of inbreeding and major histocompatibility complex genotypes." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **59**: 966-975.
- Arnesen, J. A., Eggset, G. and Jorgen Sen, T. O. (1995). "Partial-Purification and Characterization of Extracellular Metalloproteases from *Aeromonas salmonicida* Ssp *Salmonicida*." *Journal of Fish Diseases* **18**(4): 283-295.

Banerji, S., Bewersdorff, M., Hermes, B., Cianciotto, N. P. and Flieger, A. (2005). "Characterization of the Major Secreted Zinc Metalloprotease- Dependent Glycerophospholipid:Cholesterol Acyltransferase, PlaC, of *Legionella pneumophila*". *Infection and Immunity*. **73**(5): 2899-2909.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. " *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-1523.

Blicher, T., Kastrop, J.S., Buus, S. and Gajhede, M. (2005). "High-resolution structure of HLA-A\*1101 in complex with SARS nucleocapsid peptide." *Acta crystallographica., Sect.D* **61**:1031-1040.

Bodmer, W. (1972). "Evolutionary significance of the HLA-system." *Nature (London)* **237**: 139-145.

Brattgjerd, S. and Evensen, O. (1996). "A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in phagocytes of the head kidney in experimentally infected Atlantic salmon (*Salmo salar L*)." *Veterinary Pathology* **33**(1): 55-65.

Braun, M., Stuber, K., Schlatter, Y., Wahli, T., Kuhnert, P. and Frey, J. (2002). "Characterization of an ADP-ribosyltransferase Toxin (AexT) from *Aeromonas salmonicida* susp. *salmonicida*." *Journal of Bacteriology* **184** (7):1851-1858.

Bullock, G. L., Stuckey H. M., Collis, D., Herman, R. L. and Maestrone, G. (1974). "In vitro and in vivo efficacy of a potentiated sulfonamide in control of furunculosis in salmonids." *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **31**: 75 - 82.

Carrington, M. and O'Brien, S. J. (2003). "The influence of HLA genotype on AIDS." *Annual Review of Medicine-Selected Topics in the Clinical Sciences* **54**: 535-551.

Castillo, A., Razquin, B. E., Lopez-Fierro, P., Alvarez, F., Zapata, A. and Villena, A. J. (1990). "Enzyme- and immuno-histochemical study of the thymic stroma in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson." *Thymus* **15** (3) : 153-66

Chilmonczyk, S. (1992). "The thymus in fish : development and possible function in the immune response." *Annual Review of Fish Diseases*. **2** : 181-200.

Chu, S., Cavaignac, S., Feutrier, J., Phipps, B. M., Kostrzynska, M., Kay, W. W. and Trust T. J. (1991). "Structure of the tetragonal surface virulence assay protein and gene of *Aeromonas salmonicida*." *Journal of Biological Chemistry* **266**(23):15258-152565.

Cipriano, R.C. and Bullock G.L. (2001). "Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*." *Fish Disease Leaflet* **66**.

Cipriano, R.C. and Starliper, C.E. (1982). "Immersion and injection vaccination of salmonids against furunculosis with an avirulent strain of *Aeromonas salmonicida*." *Progressive Fish Culturist* **44**: 167-169.

Clarke, B.C. and Kirby, D.R.S. (1966). "Maintenance of histocompatibility polymorphism." *Nature* **211**: 999-1000.

Clem, L. W. and Mclean, W. E. (1975). "Phylogeny of immunoglobulin structure and function. VII. Monomeric and tetrameric immunoglobulins of the margate, a marine teleost." *Immunology* **29**: 791-799.

Cnaani, A., Hallerman, E. M, Ron, M., Weller, J. I., Indelman, M., Kashi, Y., Gall, G. A. E., Hulata, G. (2003). "Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F-2 tilapia hybrid." *Aquaculture* **223**: 117-128.

D'Autray Tarte, P. (2004). "Analyse du CMH de classe II $\beta$  chez l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) et résistance à *Aeromonas salmonicida*." M. Thesis. Université de Montréal. 101 pp.

Dixon, B., Kruiswijk, C. P. and Stet, R. J. M. (2003). "Major histocompatibility lineages and immune gene function in teleost fishes : the road not taken." *Critical Reviews in Immunology* **23** (5 and 6):441-471.

Dogget, T. A. and Harris, J. E. (1991). "Morphology of the gut-associated lymphoid tissue in *Oreochromis mossambicus* and its role in antigen absorption." *Fish and Shellfish Immunology* **1**: 213-228

Doherty, P.C. and Zinkernagel, R.M. (1975). "Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex." *Nature* **256**: 50-52.

Elcombe, B. M., Chang, R. J., Taves, C. J. and Winkelhake, J. L. (1985). "Evolution of antibody structure and effector functions: comparative hemolytic activities of monomeric and tetrameric IgM from rainbow trout, *Salmo gairdneri*." *Comparative Biochemistry and Physiology*. **80B**: 697-706.

Ellis, A. E. (1999). "Immunity to bacteria in fish." *Fish and Shellfish Immunology* **9**(4): 291-308.

Ellis, A. E. (1997). Furunculosis : protective antigens and mechanisms." In : Bernoth, E.-M., Ellis, A. E., Midtlyng, P. J., Olivier, G. and Smith, P. (eds) *Furunculosis : multidisciplinary Fish disease research. Academic Press*, London, pp. 366-381

Engelke, D. R., Krilos, A., Bruck, M. E., Ginsburg, D. (1990). "Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*." *Analytical Biochemistry*. **191**: 396-400

Garduno, R. A., Moore, A. R., Olivier, G., Lizama, A. L., Garduno, E. and Kay, W. W. (2000). "Host cell invasion and intracellular residence by *Aeromonas salmonicida*: role of the S-layer." *Canadian Journal of Microbiology*. **46**: 660-668.

Garduno , R. A. Phipps, B. M. and Kay, W. W. (1995). "Physical and functional S-layer reconstitution in *Aeromonas salmonicida*." *Journal of Bacteriology*. **177**: 2684-2694.

Garduno, R. A., Thornton, J. C. and Kay, W. W. (1993). "*Aeromonas salmonicida* grown in vivo." *Infection and immunity* **61**: 3854-3862.

Georgopoulou, U. and Vernier J. M. (1986). "Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules." *Developmental and Comparative Immunology* **10**(4): 529-37.

Gray, I. C., Campbell, D.A. and Spurr, N. K. (2000). "Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics." *Human Molecular Genetics* **9**(16): 2403-2408.

Grimholt, U., Larsen, S., Nordmo, R., Midtlyng, P., Kjoeglum, S., Storset, A., Saebo, S. and Stet René, J. M. (2003). "MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*);

facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci." *Immunogenetics* **55**(4): 210-219.

Gutsell, J. S. (1948). "The value of certain drugs, especially sulfa drugs, in the treatment of furunculosis in brook trout, *Salvelinus fontinalis*." *Transactions of the American Fisheries Society* **75**: 186 - 199.

Hashimoto, K., Nakanishi, T., Kurosawa, Y. (1990). "Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(17): 6863-6867

Hart, S., Wrathmell, A. B. Harris, J. E. and Grayson, T. H. (1988). "Gut immunology in fish: a review." *Developmental and Comparative Immunology* **17**: 241-248.

Herman, R. L. (1970). "Prevention and control of fish diseases in hatcheries." S. F. Snieszko, ed. A symposium on diseases of fishes and shellfishes. *American Fisheries Society*, Special Publication **5**:3-15

Hiney, M. and Olivier G. (1999). "Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*)." In: Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. (eds) *Fish Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections*, CAB International, Oxon, UK **3**: 341-425.

Hirono, I. and T. Aoki (1993). "Cloning and Characterization of 3 Hemolysin Genes from *Aeromonas salmonicida*." *Microbial Pathogenesis* **15**(4): 269-282.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, S. T. Williams. (1994). *Bergey's Manual of determinative bacteriology, Ninth edition*. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland. 787pp.

Hughes, A.L. and Nei, M. (1988). "Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection." *Nature* **335**: 167-170.

Jackson, T. R., Ferguson, M. M., Danzmann, R. G., Fishback, A. G., Ihssen, P. E., O'Connell, M., and Crease, T. J. (1998). "Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Heredity* **80**: 143-151.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. Shlomchik, M. (2001). Immunobiology 5th edition. Garland Publishing, New York, 732 pp.

Jeffery K., J. M., and Bangham C., R. M. (2000). "Do infectious diseases drive MHC diversity?". *Microbes and Infection* **2**(11): 1335-41.

Kaattari, S.L. and Piganelli, J.D. (1996). "The specific immune system: humoral defense." In: Iwama, G. and Nakanishi, T. (eds) *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. Academic Press, London, pp. 207-254.

Kaattari, S. L. (1992). "Fish B lymphocytes: defining their form and function." *Annual Review of Fish Disease* **2**: 161-180.

Kay, W.W. and Trust, T.J. (1997). "The surface of *Aeromonas salmonicida*: what does it look like and what does it do? " In: Bernoth, E.-M., Ellis, A.E., Midtlyng, P.J., Olivier, G. and Smith, P. (eds) *Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research*, Academic Press, London, pp. 235-247.

Kay W. W., Buckley, J. T., Ishiguro, E. E., Phipps, B. M., Monette, J. P., Trust, T. (1981). "Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*." *Journal of Bacteriology* **147**(3): 1077-84.

Kellenberger, C., Roussel, A., Malissen, B. (2005). "The H-2Kk MHC Peptide-Binding Groove Anchors the Backbone of an Octameric Antigenic Peptide in an Unprecedented Mode." *Journal of Immunology*. **175**: 3819-3825.

Kiryu, I., Dijkstra, J.M., Sarder, R.I., Fujiwara, A., Yoshiura, Y. and Ototake, M. (2005) "New MHC class Ia domain lineages in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) which are shared with other fish species." *Fish and Shellfish Immunology* **18** (3): 243-254.

Krieger, F., Moglich, A., Kiefhaber, T. (2005). "Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of loop formation in polypeptide chains." *Journal of American Chemical Society*. Mar 16; **127**(10):3346-52.

Kruse, H. and Sorum, H. (1994). "Transfer of Multiple-Drug Resistance Plasmids between Bacteria of Diverse Origins in Natural Microenvironments." *Applied and Environmental Microbiology* **60**(11): 4015-4021

Kurby, J (1997). Immunology 3rd edition. W.H. Freeman and Co, New-York, 664 pp.

Langefors, A., Lohm, J., Grahn, M., Andersen, O. and von Schantz, T. (2001). "Association between major histocompatibility complex class IIB alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon." *Proceedings of the Royal Society of London B* **268**: 479-485.

Lee, K. K. and Ellis, A. E. (1989). "The Quantitative Relationship of Lethality between Extracellular Protease and Extracellular Hemolysin of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L)." *FEMS Microbiology Letters* **61**(1-2): 127-131.

Lillehaug, A., T. Lunder, and T. T. Poppe. (1992). "Field testing of adjuvanted furunculosis vaccines in Atlantic salmon, *Salmo salar* L." *Journal of Fish Diseases* **15**: 485 - 496.

Lobb, C.J. and Clem, L. W. (1981). "Phylogeny of immunoglobulin structure and function. X." Humoral immunoglobulins of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*. *Developmental and Comparative Immunology*. **5**: 271-282.

Lohm, J., Grahn, M., Langefors, A., Andersen, O., Sorset, A., Von Schantz Torbjorn. (2002). "Experimental evidence for major histocompatibility complex-allele-specific resistance to a bacterial infection." *The Royal Society* **269** (1504).

Manning, M.J. and Nakanishi, T. (1996). "The specific immune system: cellular defenses." In: Iwama, G. and Nakanishi, T. (eds) *The fish immune system: organism, pathogen, and environment*. Academic Press, London, pp. 159-205.

Manning, M.J., Grace, M.F., and Secombes C.J. (1992). "Ontogenic aspects of tolerance and immunity in carp and rainbow trout: Studies on the role of the thymus." *Developmental and Comparative Immunology Suppl* **2**: 75-82.

Marquis, H. and R. Lallier (1989). "Efficacy Studies of Passive-Immunization against *Aeromonas salmonicida* Infection in Brook Trout, *Salvelinus Fontinalis* (Mitchill)." *Journal of Fish Diseases* **12**(3): 233-240.

Martin, M. P., Gao, X., Lee, J. H., Nelson, G. W., Detels, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S, Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J, Wilson, M., O'Brien, S. J., and Carrington, M. (2002). "Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS." *Nature Genetics*. **31**(4): 429-34.

Midtlyng, P.M. (1997). "Vaccination against furunculosis." In: Bemoth, E.-M., Ellis, A.E., Midtlyng, P.J., Olivier, G. and Smith, P. (eds) *Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research*. Academic Press, London, pp. 382-404.

Midtlyng, P.J. (1994). "Growth of Atlantic salmon after intraperitoneal injection of oil-adjuvanted furunculosis vaccines." International Symposium on Aquatic Animal Health, Seattle, WA (USA), Univ. Of California, School Of Veterinary Medicine: Davis, Ca (USA), Pp. P. W-24.4; (International Symposium On Aquatic Animal Health: Program And Abstracts)

Miller, N. W., Bly, J. E., Van Ginkel, F., Ellsaesser, C. F., Clem, L. W. (1987). "Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies." *Developmental and Comparative Immunology* **11**(4): 739-47.

Miller, N. W., Deuter, A., Clem, L. W. (1986). "Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for the mixed leucocyte reaction with channel catfish." *Immunology* **59**(1): 123-8.

Munn, C. B., Ishiguro, E. E., Kay, W. W., Trust, T. J. (1982). "Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*." *Infection and Immunity* **36**(3): 1 069- 75.

Nakanishi, T., Aoyagi, K., Xia, C., Dijkstra, J. M., Ototake, M. (1999). "Specific cell-mediated immunity in fish." *Veterinary Immunology and Immunopathology* **72**(1-2): 101-109.

Ohta, Y., Mckinney, E. C., Criscitiello, M. F., Flajnik, M. F. (2002). "Proteasome, transporter associated with antigen processing, and class I genes in the nurse shark *Ginglymostoma cirratum*: evidence for a stable class I region and MHC haplotype lineages." *Journal of Immunology* **168**:771-781

Ohta, Y., Okamura, K., Mckinney, E. C., Bartl S., Hashimoto, K., Flajnik, M. F. (2000). "Primitive synteny of vertebrate major histocompatibility complex class I and class II genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 4712-4717.

Olivier, G. (1983). "Vaccination du saumon coho (*Oncorhynchus kistuch*) contre *Aeromonas salmonicida*: etude de la reponse immunitaire." PhD Thesis. Université de Montreal. 192 pp.

Penn, D.J. and Potts, W.K. (1999). "The evolution of mating preference and major histocompatibility complex genes." *The American Naturalist* **153**: 145-164.

Ploegh, H. and Watts, C. (1998). "Antigen recognition." *Current Opinion In Immunology* **10**: 57-58.

Pluthero, F. G. (1993). "Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase." *Nucleic Acids Research* **21**: 4850-4851

Potts, W.K. and Wakeland, E.K. (1990). "Evolution of diversity at the major histocompatibility complex." *Trends in Ecology & Evolution* **5**: 181-186.

Press, C. M. and O. Evensen. (1999). "The morphology of the immune system in teleost fish." *Fish and Shellfish Immunology* 9(4) : 309-318.

Press, C. M., Dannevig, B. H., Landsverk, T. (1994). "Immune and Enzyme-Histochemical Phenotypes of Lymphoid and Nonlymphoid Cells within the Spleen and Head Kidney of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L)." *Fish and Shellfish Immunology* 4(2): 79-93.

Price, N. C., Stevens L., Duncan, D., Snodgrass, M. (1989). "Proteases Secreted by Strains of *Aeromonas salmonicida*." *Journal of Fish Diseases* 12(3): 223-232.

Pulsford, A., Fange, R., Zapata A. G. (1991). "The Thymic Microenvironment of the Common Sole, Solea-Solea." *Acta Zoologica* 72(4): 209-216.

Rasmussen, A. S., Arnason, U. (1999). "Molecular studies suggest the cartilaginous fishes have a terminal position in the piscine tree." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:2177-2182

Salte, R., Norberg, K., Arnesen, J. A., Oedegaard, O. R., Eggset, G. (1992). "Serine Protease and Glycerophospholipid –Cholesterol Acyltransferase of *Aeromonas salmonicida* Work in Concert in Thrombus Formation –In vitro the Process Is Counteracted by Plasma Antithrombin and Alpha-2-Macroglobulin." *Journal of Fish Diseases* 15(3):215-227.

SAS INSTITUTE. (1998). SAS, version 8.1. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Secombes, C.J. (1996). "The nonspecific immune system: cellular defenses." In: Iwama, G. and Nakanishi, T. (eds) *The fish immune system: organism, pathogen, and environment*. Academic Press, London, pp. 63-103.

Shapiro, S. S. and Wilk, M. B. (1965). "An analysis of variance test for normality (complete samples)". *Biometrika* **52**(3 and 4): 591-611.

Shum, B.P., Guethlein, L., Flodin, L.R., Adkison, M.A., Hedrick, R.P., Nehring, R.B., Stet, R. J., Secombes, C. and Parham, P. (2001). "Modes of salmonid MHC class I and II evolution differ from the primate paradigm." *Journal of Immunology* **166**(5), 3297-3308.

Smith, P., Hiney, M.P. and Samuelson, O.B. (1994). "Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning." *Annual Review of Fish Diseases* **4**: 273-313.

Snieszko, S. F., and Wood, E. M. (1955). "The effect of some sulfonamides on the growth of brook trout, brown trout, and rainbow trout." *Transactions of the American Fisheries Society* **84**: 86-92.

Somorjai, I. M. L., Danzmann, R. G., and Ferguson, M. M. (2003). "Distribution of temperature tolerance quantitative trait loci in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and inferred homologies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Genetics* **165**: 1443-1456

Spence, K.D., Fryer, J.L., and Pilcher, K.S. (1965). "Active and passive immunization of certain salmonid fishes against *Aeromonas salmonicida*." *Canadian Journal of Microbiology* **11**: 397-405.

Tajima, K., T. Takahashi, Y. Ezura, and T. Kimura. (1984). "Enzymatic properties of the purified extracellular protease of *Aeromonas salmonicida*, Ar-4 (EFDL)." *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **50**: 145 -150.

Takahata, N. and Nei, M. (1990). "Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci." *Genetics* **124**: 967-978.

Tatner, M. F. and M. J. Manning (1983). "The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri richardson*, in relation to the stage of development of the lymphoid organs." *Developmental and Comparative Immunology* **7**(1): 69-75.

Vipond, R., Bricknell I. R., Durant, E., Bowden, T. J., Ellis, A. E., Smith, M., MacIntyre, S. (1998). "Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*." *Infection and Immunity* **66**(5): 1990-1998.

Watts, M., Munday, B. L., Burke, C. M. (2001). "Immune responses of teleost fish." *Australian Veterinary Journal* **79**(8): 570-574.

Yano, T. (1996). "The nonspecific immune system: humoral defense." In: Iwama, G. and Nakanishi, T. (eds) *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. Academic Press, London, pp. 105-157.

Zapata, A.G., Chiba, A. and Varas, A. (1996). "Cells and Tissues of the immune system of fish." In: Iwama, G. and Nakanishi, T. (eds) *The fish immune system: organism, pathogen, and environment*. Academic Press, London, pp. 1-62.

Zapata, A. G., and Cooper, E. L.. (1990). "The immune system: comparative histophysiology." John Wiley and sons, Chichester. 335 pp.

## **Annexe I**

### Extraction de l'ADN avec le kit Millipore

Le protocole d'extraction de l'ADN utilisé au laboratoire est dérivé d'un « kit » de la compagnie Millipore qui permet d'extraire l'ADN bactérien de haut poids moléculaire de minipreps. La procédure modifiée a été mise au point par M. Robert St-Laurent de l'Université Laval. D'abord, 10 mg de tissu découpé d'une nageoire de poisson est déposé dans la plaque de 96 puits. Un volume de 0,5 ml de solution de lyse (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 M d'EDTA, pH 8,0; SDS 1% et protéinase K 0,1 mg/ml) est alors additionnée à chaque puits. La plaque est incubée pendant 15 heures (une nuit) à 37°C avec agitation. Puis, les échantillons étaient transférés sur la plaque "clearing". Le protocole du manufacturier était alors suivi de l'étape 6 jusqu'à la fin. La plaque "BAC" était posée dans le manifold sur lequel la plaque "clearing" était posée. Le joints étant étanches, la pompe de mise à vide était mise en marche. La pression était ajustée à 8 pouces de Hg ce qui permettait de débarrasser les échantillons des débris cellulaires. Les échantillons purs étaient alors collectés dans la plaque "BAC". Ensuite, après avoir arrêté le système, la plaque "BAC" était posée sur le dessus du manifold et de la plaque "clearing". La pompe était alors remise en marche pour un vide de 24 pouces de Hg jusqu'à ce que les puits de la plaque soient vides. Le filtrat était jeté. Le système était arrêté. L'ajout de 200 µl de solution 4 du "kit" sous un vide de 24 pouces de Hg permettait de laver les puits. La solution de lavage était jeté et le système arrêté. Un volume de 50 µl de tampon 5 (10 mM Tris, pH 8,0) du "kit"

étaient ajoutés à chaque puits avec agitation de la plaque sur une plaque orbitale durant 10 minutes à une température de 25°C. L'ADN pur était transféré dans une plaque de conservation à -20°C.

## Annexe II

### Extraction de la Taq polymérase maison

Basé sur les expériences de Pluthero (1993) et d'Engelke *et al.*, (1990), la souche de bactérie *E. coli* qui possède le gène qui code pour la TAQ polymérase a été cultivée dans un milieu LB (5 g d'extrait de levure; 10 g de tryptone et 10 g de NaCl pour 1 litre) additionné d'ampicilline (80 µg/ml). Elle a été incubée à 37°C avec agitation durant 11 heures pour obtenir une DO finale de 0,8 à une longueur d'onde de 600 nm. Après la phase de croissance, de l'IPTG était additionné pour une concentration finale de 0,5 mM. Le tout était alors incubé à 37°C avec agitation durant 12 heures. La suspension d'*E. coli* était centrifugée à 12 000 g durant 5 minutes. Le culot est récolté et lavé avec 100 ml de tampon A (Tris-HCl 50 mM; glucose 50 mM; EDTA 1 mM, pH 7,9) puis centrifugé pendant 5 minutes à 12 000 g. Le culot était resuspendu par une le tampon A additionné d'une solution de lysozyme à une concentration finale de 4 mg/ml. Le tout est agité puis incubé à une température de 21°C durant 15 minutes. Un volume de 50 ml d'un tampon B (KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; EDTA 1mM; 0,5 % Tween 20, pH 7,9) est alors ajouté au mélange et incubé à 75°C pendant 1 heure. Le lysat était alors centrifugé durant 10 minutes à 12 000 g à une température de 4°C. Le surnageant était récolté en mesurant précisément sont volume. Du (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> était ensuite additionné au surnageant pour une concentration finale de 300 mg/ml. Le tout est agité puis laissé reposer durant 15 minutes. Le mélange est ensuite centrifugé à 12 000 g à une température de 4°C durant 15 minutes. Les phases

solides étaient alors récupérées et conservées sur glace. Ces phases étaient resolubilisées avec 20 ml de tampon A pour chaque 100 ml de surnageant (avant ajout de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). La solution était dialysée à 4°C dans des sacs qui permettent le passage de molécules de 14 kDa ou moins, à 2 reprises durant 12 heures contre 1 litre de tampon C (Tris-HCl 50 mM; KCl 50 mM; Na-EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM et 50 % glycérol). La solution qui restait était aliquotée. Le nombre d'unité de TAQ polymérase était estimé par comparaison avec l'activité d'une série de dilutions de TAQ commerciale.

