

**CARTE DE RESTRICTION ET CLONAGE DE CERTAINS
FRAGMENTS DE L'ADN MITOCHONDRIAL DE LA
PALOURDE DE DUNE *SPISULA SOLIDISSIMA***

**THÈSE
PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE MONCTON
POUR L'OBTENTION
DU GRADE DE MAÎTRISE ES SCIENCES (M. Sc.)
PAR
NICOLE THÉRÈSE LIRETTE, B. Sc.**

UNIVERSITÉ DE MONCTON

1999



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-37853-5

Canada

RÉSUMÉ

La plupart des espèces animales possèdent une molécule d'ADN mitochondrial (ADNmt) de taille " typique ", soit de 16 à 18 kilopaires de bases. Par contre, la taille de l'ADNmt de certains invertébrés, et notamment de certains bivalves incluant *Spisula solidissima*, est de 20 à 42 kilopaires de bases (taille " atypique "). L'augmentation de la taille de l'ADNmt est due, en partie, à la présence de séquences répétées en tandem. Chez *Spisula solidissima*, la séquence répétée en tandem est de 2.0 kilopaires de bases.

L'objectif de cette recherche était d'établir une carte de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima*. Cette carte de restriction a été établie par l'analyse des patrons de restriction obtenus par autoradiographie des fragments de restriction radiomarqués suite aux digestions simples et doubles de l'ADNmt par les enzymes de restriction *Bam HI*, *Bst EII* et *Bgl I*. Ensuite, une partie de l'ADNmt de *Spisula solidissima* a été clonée dans le vecteur pBluescript®. La grandeur des fragments clonés était 2.9 kpb, 1.3 kpb et 0.9 kpb.

Les résultats de cette recherche permettront l'étude approfondie de la molécule d'ADNmt de taille " atypique " de *Spisula solidissima* et le séquençage éventuel de son fragment répété en tandem de 2.0 kilopaires de bases.

REMERCIEMENTS

Je vous remercie Dr. Alan Fraser, mon directeur de thèse, d'y avoir consacré tant de temps et de patience pour faire, en moi, une personne beaucoup plus confiante et sûre d'elle-même. Vous avez su garder mon intérêt en biologie moléculaire en me faisant toujours raisonner aux réponses à mes propres questions avant de les répondre. Au laboratoire, vous m'avez démontré l'importance du travail sérieux et précis qu'est la science. Je me rappellerai toujours de la phrase que vous me disiez souvent lorsque tout allait mal "En recherche, les bas sont bas, mais les hauts sont vraiment hauts". Et je suis sûr que vous vous rappellerez toujours de ma réponse à cette phrase "Alan, je vais « shopper »"!

Je vous remercie Dr. Rodney Ouellette, vos connaissances en biologie moléculaire et dans le clonage de l'ADN étaient indispensables à cette recherche. De plus, je vous remercie pour nous avoir fourni les plasmides et les bactéries pour le clonage, ainsi que le temps que vous avez pris pour m'expliquer les étapes du clonage et de me les "reexpliquer".

Je veux aussi remercier certaines personnes qui m'ont aidé durant mon séjour au laboratoire: Thomas Landry, du Ministère des Pêches et Océans, pour nous avoir fourni les individus provenant de l'Île du Prince Edward, Dr. Céline Gagnon et Dr. Didier Gauthier pour leur aide lorsque Dr. Fraser n'était pas aux alentours, les techniciens au département, Michel Guay et René Marquette ainsi que mes collègues de laboratoires.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents, mes grands-parents et Marc pour tout l'encouragement que vous m'avez donné. Votre support était, et sera, toujours apprécié.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux.....	iii
Liste des abréviations.....	iv
1.0 Introduction	
1.1 La biologie de <i>Spisula solidissima</i>	
1.1.1 Classification et habitat.....	1
1.1.2 Anatomie.....	1
1.2 La mitochondrie.....	3
1.3 L'ADNmt animal	
1.3.1 Structure et taille.....	3
1.3.2 Caractéristiques de l'ADNmt de taille « atypique »	
1.3.2.1 Les causes de l'augmentation de la taille.....	7
1.3.2.2 Le polymorphisme de taille et l'hétéroplasmie.....	9
1.3.3 L'ADNmt de taille «atypique » de quelques espèces de bivalves.....	10
1.4 L'objectif de cette recherche.....	11
2.0 Matériel et méthode	
2.1 Échantillonnage de palourdes de dune.....	14
2.2 Choix du tissu.....	14
2.3 Préparation de l'ADNmt	
2.3.1 Isolation et purification des mitochondries.....	15
2.3.2 Lyse des mitochondries.....	17

2.3.3	Purification et précipitation de l'ADNmt.....	17
2.3.4	Conservation des échantillons de l'ADNmt.....	18
2.4	Analyse de l'ADNmt	
2.4.1	Digestion de l'ADNmt aux endonucléases de restriction	
2.4.1.1	Digestion simple.....	19
2.4.1.2	Digestion double.....	20
2.4.2	Radiomarquage des fragments de restriction au ³⁵ S.....	20
2.4.3	Analyse des fragments de restriction	
2.4.3.1	Analyse des fragments de restriction non radiomarqués	
2.4.3.1.1	Préparation du gel d'agarose et électrophorèse.....	21
2.4.3.1.2	Coloration du gel au bromure d'éthidium et photographie.....	22
2.4.3.2	Analyse des fragments radiomarqués	
2.4.3.2.1	Préparation du gel d'agarose et électrophorèse.....	23
2.4.3.2.2	Séchage du gel d'agarose et autoradiographie.....	23
2.4.4	Détermination de la taille des fragments de restriction de l'ADNmt.....	24
2.5	Clonage des fragments de restriction <i>Bam HI</i>	
2.5.1	Choix des bactéries et du plasmide.....	25
2.5.2	Culture et conservation des bactéries.....	26
2.5.3	Préparation des cellules d' <i>Escherichia coli</i> compétentes.....	27
2.5.4	Digestion de l'ADNmt et du plasmide par l'enzyme de restriction <i>Bam HI</i>	28
2.5.5	Ligation des fragments de restriction <i>Bam HI</i> et des plasmides linéarisés.....	29

2.5.6	Transformation des cellules compétentes avec le mélange de ligation et sélection des cellules recombinantes.....	30
2.5.7	Minipréparation et analyse des plasmides recombinés.....	30

3.0 Résultats

3.1	L'isolation et l'analyse de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	
3.1.1	Choix du tissu.....	32
3.1.2	Quantification d'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	32
3.1.3	Choix des enzymes de restriction.....	36
3.2	L'étude du patron de restriction <i>Bst EII</i> de l'ADNmt pour deux populations de <i>Spisula solidissima</i> et la détermination de la variabilité de cet ADNmt.....	37
3.3	Carte de restriction de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	
3.3.1	Établissement d'une carte de restriction.....	41
3.3.2	Incertitudes dans la carte de restriction établie.....	48
3.4	Clonage de certains fragments de restriction <i>Bam HI</i>	48

4.0 Discussion

4.1	L'isolation et l'analyse de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	52
4.2	La variabilité de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i> des deux populations étudiées.....	53
4.3	La carte de restriction de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	55
4.4	Le clonage de certains fragments de restriction <i>Bam HI</i> de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	57
4.5	Perspectives et conclusion.....	60

Références	63
-------------------------	----

Annexes

A	Calcul de longueur des fragments de restriction.....	68
B	Génotype de la souche <i>Escherichia coli</i> DH5 α	69
C	Carte de restriction du pBluescript® SK fl.....	70
D	Données brutes de l'analyse de l'ADNmt des individus de la population de Cap Pelé (C) et de la population de l'Île du Prince Edward (I) digéré avec l'endonucléase de restriction <i>Bst</i> <i>EII</i>	71

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Anatomie de la palourde de dune <i>Spisula solidissima</i>	2
Figure 1.2: Schéma d'une mitochondrie.....	4
Figure 1.3: Schéma de l'ADNmt animal « typique ».....	6
Figure 3.1: Patron de digestion <i>Bst EII</i> “ normal ” de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	35
Figure 3.2: Patron de restriction <i>Bst EII</i> “ anormal ” de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	40
Figure 3.3: Patrons de restriction des digestions simples de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	42
Figure 3.4: Patrons de restriction des digestions doubles de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	43
Figure 3.5: Carte de restriction de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	45
Figure 3.6: Patron de restriction d'une digestion double <i>Bgl I/Bst EII</i> démontrant le fragment de restriction à 4.2 kpb.....	47
Figure 3.7: Incertitudes dans la carte de restriction de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	49
Figure 3.8: Les plasmides recombinés coupés avec l'enzyme de restriction <i>Bam HI</i>	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Exemples d'espèces animales ayant de l'ADNmt de taille " atypique ".....	8
Tableau 3.1: Isolation et analyse enzymatique par l'endonucléase de restriction <i>Bst EII</i> de l'ADNmt à partir de différents tissus de <i>Spisula solidissima</i>	33
Tableau 3.2: Longueurs des fragments de restriction <i>Bst EII</i> et taille total de l'ADNmt de <i>Spisula solidissima</i>	38
Tableau 3.3: Longueurs des fragments de restriction des digestions simples <i>Bst EII</i> , <i>Bgl I</i> et <i>Bam HI</i> et des digestions doubles <i>Bam HI/Bgl I</i> , <i>Bam HI/Bst EII</i> et <i>Bgl I/Bst EII</i>	44

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α [³⁵S]dATP = α -P[³⁵S] désoxyadénosine triphosphate
 ADN = acide désoxyribonucléique
 ADNmt = ADN mitochondrial
amp^r = gène de résistance à l'ampiciline
Ava I = endonucléase de restriction provenant de *Anabaena variabilis*
Ava II = endonucléase de restriction provenant de *Anabaena variabilis*
 β -gal = β -galactosidase
 β -gal⁻ = β -galactosidase non-fonctionnel
 β -gal⁺ = β -galactosidase fonctionnel
Bam HI = endonucléase de restriction provenant de *Bacillus amyloliquefaciens* H
Bcl I = endonucléase de restriction provenant de *Bacillus caldolylicus*
Bgl I = endonucléase de restriction provenant de *Bacillus globigii*
Bgl II = endonucléase de restriction provenant de *Bacillus globigii*
Bst EII = endonucléase de restriction provenant de *Bacillus stearothermophilus* ET
 CaCl₂ = chlorure de calcium
 Ci = Curie
 cm = centimètre
 dAMP = désoxyadénosine monophosphate
 dATP = désoxyadénosine triphosphate
 dCTP = désoxycytidine triphosphate
 dGTP = désoxyguanosine triphosphate
 dNTP = désoxyribonucléosides triphosphates
 DTT = dithiothreitol
 dTTP = désoxythymidine triphosphate
Eco RI = endonucléase de restriction provenant de *Escherichia coli* RY13
Eco RV = endonucléase de restriction provenant de *Escherichia coli* J62 pLG74
 g = gramme
Hae II = endonucléase de restriction provenant de *Haemophilus aegyptius*
Hind III = endonucléase de restriction provenant de *Haemophilus influenzae* RD
 IPTG = isopropylthio- β -D-galactoside
 kpb = kilopaire de base
Kpn I = endonucléase de restriction provenant de *Klebsiella pneumoniae* OK8
lacZ = gène encodant l'enzyme β -galactosidase
 M = molaire
 mARNmt = acide ribonucléique messenger mitochondrial
 MgCl₂ = chlorure de magnésium
 ml = millilitre

mm = millimètre

mM = millimolaire

mmol = millimole

Na₂EDTA = disodium ethylenediaminetetraacetate·2H₂O

NaCl = chlorure de sodium

NaOH = hydroxyde de sodium

°C = degré Celsius

p/v = poids par volume

PIPES = piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)

po = pouces

Pst I = endonucléase de restriction provenant de *Providencia stuartii*

rARNmt = acide ribonucléique ribosomal mitochondrial

Sal I = endonucléase de restriction provenant de *Streptomyces albus* G

SDS = sulfate dodécyl de sodium

Sin I = endonucléase de restriction provenant de *Salmonella infantis*

Sma I = endonucléase de restriction provenant de *Serratia marcescens*

tARNmt = acide ribonucléique de transfert mitochondrial

Tris = tris(hydroxyméthyl)aminométhane

μCi = microCurie

μl = microlitre

μm = micromètre

UV = ultra-violet

V = volt

v/v = volume par volume

Xba I = endonucléase de restriction provenant de *Xanthomonas badrii*

xg = nombre de fois la force gravitationnelle

X-Gal = 5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside

Xho I = endonucléase de restriction provenant de *Xanthomonas holcicola*

1.0 INTRODUCTION

1.1 La biologie de *Spisula solidissima*

1.1.1 Classification et habitat

Spisula solidissima (Dillwyn, 1817) est un bivalve (Lamellibranche) classifié dans la famille des Mactridae (Lamarck, 1809). Son nom commun est la palourde de dune « bar clam » ou le mactre de l'Atlantique. On les retrouve enfoncées dans les bancs de sable dans l'eau peu profonde de l'océan Atlantique sur la côte est du Canada et les États-Unis où la température et la salinité sont optimales à leur croissance (Goldberg, 1989).

1.1.2. Anatomie

La coquille de *Spisula solidissima* est plutôt ovale et de couleur crème ou beige (brun pâle). Cette coquille est faite de deux parties, les valves, bougeant autour d'une charnière (figure 1.1). Les valves sont maintenues en position ouverte par un ligament élastique et leur fermeture est assurée par deux muscles adducteurs très bien développés. Le pied fouisseur est aussi très bien développé. Ce pied joue un rôle dans le creusement du sable et de la boue. Le manteau s'enroule vers l'arrière pour former un double siphon. L'un des canaux du siphon sert à l'entrée d'eau et de particules alimentaires dans la cavité et l'autre sert à l'évacuation des déchets.

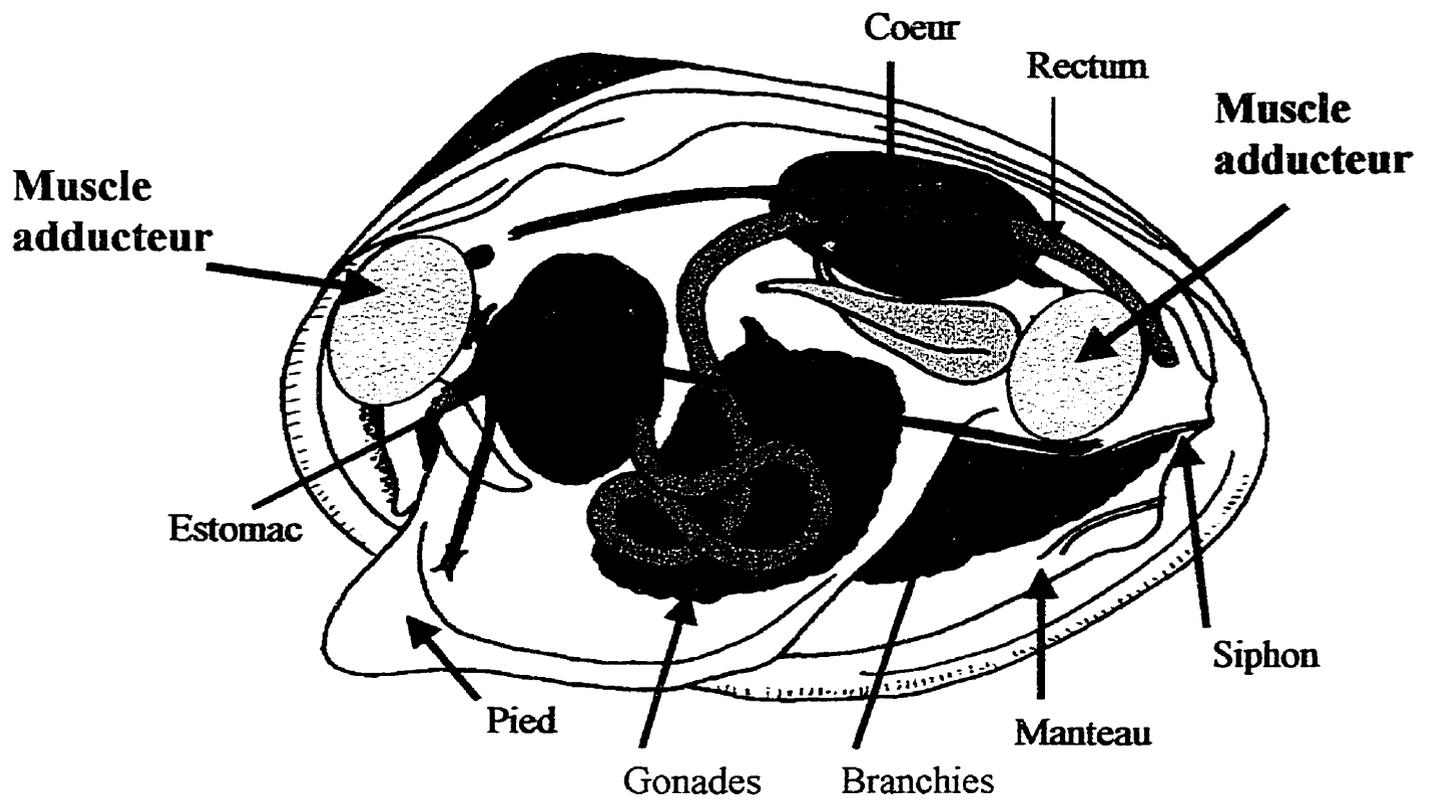


Figure 1.1: Anatomie de la palourde de dune *Spisula solidissima*. Modifié d'après Morin, A. et Houseman, J. (1998).

1.2 La mitochondrie

Toutes les cellules eucaryotes (sauf les plus primitives) contiennent des mitochondries. Les mitochondries sont parmi les plus grands organites cellulaires et elles occupent environ 25% du volume cellulaire (revue dans Kleinsmith et Kish, 1995). Ces organites ont une forme en bâtonnet ayant des dimensions ressemblant à celles d'une cellule procaryote, soit de 1 à 3 μm de longueur et de 0.1 à 0.5 μm de largeur (figure 1.2) (revue dans Kleinsmith et Kish, 1995). Les stades finaux de la dégradation des lipides et des sucres ainsi que les réactions du cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative se déroulent à l'intérieur des mitochondries. La fonction principale de ces organites est la production d'ATP dans les cellules aérobiques. La mitochondrie possède son propre génome : l'ADN mitochondrial.

1.3 L'ADNmt animal

1.3.1 Structure et taille

Chaque mitochondrie possède de 5 à 10 molécules (copies) d'ADNmt dans la matrice mitochondriale (revue dans Kleinsmith et Kish, 1995). L'ADNmt animal est une molécule d'ADN bicaténaire circulaire, sauf pour de rares exceptions où l'ADNmt est une molécule linéaire (Bendich, 1993 et Wolstenholme, 1992). La plupart des ADNmt ont une taille variant entre 15.7 kpb et 19.5 kpb; c'est la taille « typique » (Brown, 1983).

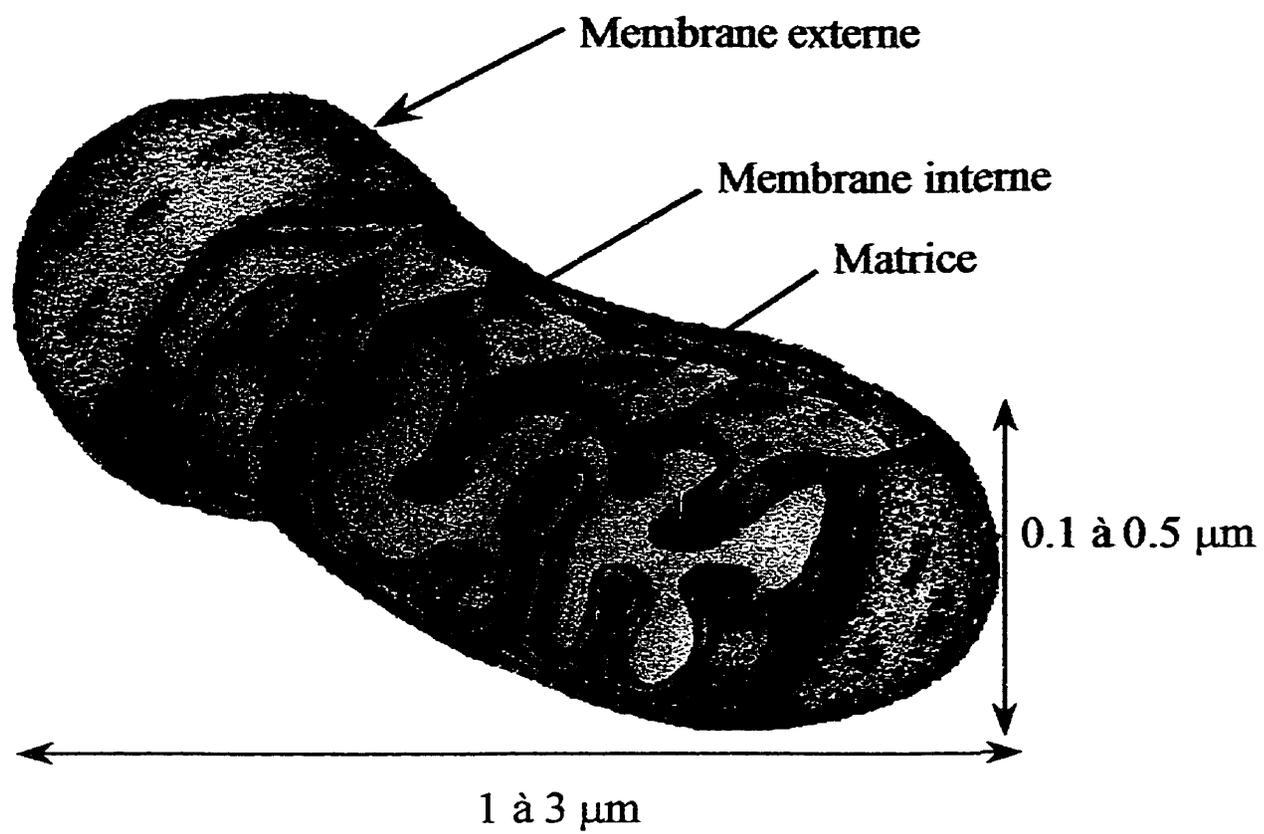


Figure 1.2 : Schéma d'une mitochondrie. Modifié d'après Crotty, S (1996).

D'autres ADNmt possèdent des tailles supérieures à 19.5 kpb; une taille « atypique » (Rand, 1993).

Les deux brins de l'ADNmt, brin H et brin L (figure 1.3) contiennent les informations génétiques (gènes) qui encodent i) les deux rARNmt inclus dans les ribosomes mitochondriaux, ii) 13 mARNmt codant pour 13 protéines mitochondriales (trois sous-unités du complexe de la cytochrome *c* oxydase, deux sous-unités de l'ATPase F_0 , sept sous-unités du complexe de la NADH-CoQ réductase ainsi que la cytochrome *b*) et iii) les 22 tARNmt nécessaires pour la traduction des mARNmt (Anderson *et al.*, 1981 et Wolstenholme, 1992). Toutes les protéines nécessaires au fonctionnement de la mitochondrie qui ne sont pas encodées par l'ADNmt sont encodées par l'ADN nucléaire de la cellule et elles sont importées via cytoplasme au besoin (revue dans Kleinsmith et Kish, 1995). Le contenu génétique de l'ADNmt animal est semblable d'une espèce animale à l'autre, mais l'organisation des gènes mitochondriaux est très variable, notamment entre les vertébrés et les invertébrés (Attardi, 1985; Wolstenholme, 1992 et Rand, 1993). De plus, l'ADNmt animal est dépourvu de régions non-codantes (introns) à l'exception d'une petite région non-codante près de l'origine de réplication (O_H à la figure 1.3) nommée, chez les vertébrés, la boucle-D (Attardi, 1985). La boucle-D contient des séquences régulatrices qui jouent un rôle dans l'initiation de la réplication et dans le contrôle de la transcription (Clayton, 1982 et 1984). Chez les invertébrés, il existe aussi une région non-codante qui est appelée la région «contrôle», mais son rôle dans le contrôle de la réplication et la transcription est encore hypothétique (Rand, 1993 et Wolstenholme, 1992). Le génome mitochondrial possède son propre code génétique qui diffère légèrement du code génétique universel (Brown, 1983).

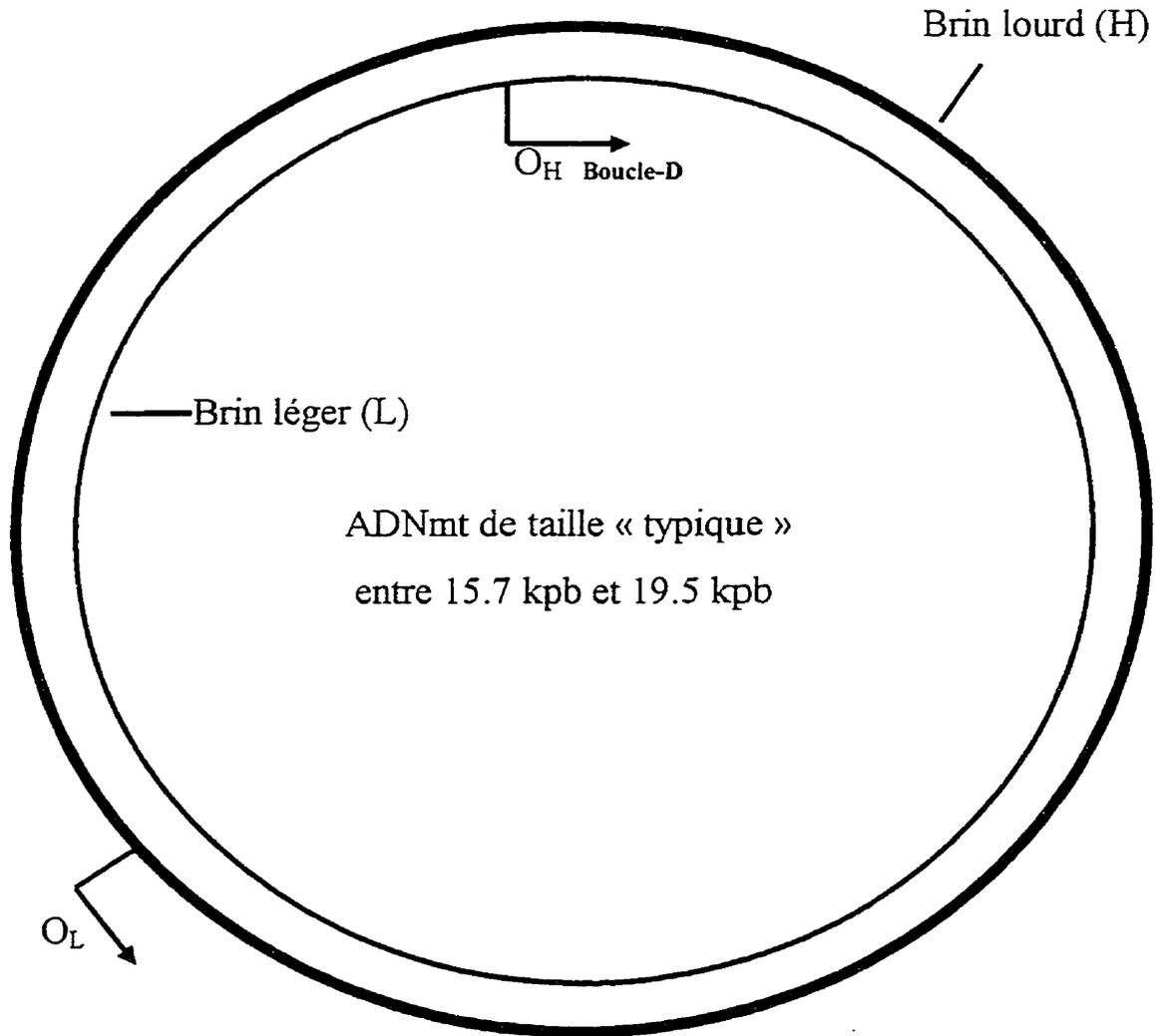


Figure 1.3: Schéma abrégé de l'ADNmt animal « typique ». Le brin lourd (H) et le brin léger (L) servent de brin codant pour les gènes mitochondriaux. L'origine de réplication du brin lourd est indiquée par O_H (boucle-D) et l'origine de réplication du brin léger est indiquée par O_L . Les directions de réplication du brin lourd et du brin léger sont indiquées par les flèches (Brown, 1983).

1.3.2 Caractéristiques de l'ADNmt de taille « atypique »

1.3.2.1 Les causes de l'augmentation de la taille

Depuis une vingtaine d'années, plusieurs exemples d'espèces animales ayant des ADNmt de taille « atypique » ont été découverts (tableau 1.1). L'augmentation de la taille de l'ADNmt est causée par une addition ou une duplication de nucléotides ou la présence de séquences répétées en tandem (Rand, 1993). Les mécanismes exactes causant ces additions, duplication ou la présence de séquences répétées en tandem sont encore inconnus (Gjetvaj, 1992 et Rand, 1993).

Chez certaines espèces, particulièrement *P. strobi* (Boyce *et al.* 1989), *G. aculeatus* (Gach et Reimchen, 1989) ainsi que chez plusieurs vertébrés, cette augmentation de la taille a surtout lieu à un endroit distinct de l'ADNmt, la région non-codante ou la boucle-D (Clayton, 1984 et Ghivizzani *et al.*, 1993). Elle peut aussi avoir lieu dans les régions codantes de l'ADNmt (Zevering *et al.*, 1991). On ne connaît pas la raison exacte pour l'augmentation de la taille de l'ADNmt chez certaines espèces et pas d'autres. Une des hypothèses pour l'augmentation de la taille de la région non-codante suggère qu'une amplification de cette région pourrait produire un site de liaison plus efficace pour l'ADN polymérase. Ceci augmenterait le taux de répllication de l'ADNmt. Cette augmentation du taux de répllication serait avantageux pour les espèces qui ont une demande métabolique d'énergie plus élevée (Rand, 1993).

Tableau 1.1: Exemples d'espèces animales ayant de l'ADNmt de taille « atypique ».

<u>Espèce</u>	<u>Taille ADNmt</u>	<u>Cause de l'augmentation de taille</u>	<u>Référence</u>
<i>Pecten maximus</i>	19.9 à 26.3 kpb	séquence répétée en tandem (SRT) de 1.6 kpb*	Rigaa <i>et al.</i> , 1993
<i>Crassadoma Giganta</i>	22.8 à 24.8 kpb	SRT de 1.0 kpb	Gjetvaj <i>et al.</i> , 1992
<i>Placopecten Magellanicus</i>	31.0 à 41.0 kpb	SRT de 1.4 kpb♦	Snyder <i>et al.</i> , 1987
<i>Spisula Solidissima</i>	36.0 à 42.0 kpb	SRT de 2.0 kpb•	Arsenault, 1989
<i>Pissodes Strobi</i>	28.0 à 36.0 kpb	SRT de 0.8 et de 2.0 kpb	Boyce <i>et al.</i> , 1989
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	16.6 à 21.6 kpb	duplication 1.1 kpb et duplication 5.0 kpb	Gach et Reimchen, 1989
<i>Cnemidophorus cozumela</i>	17.0 à 25.0 kpb	duplication 5.0 à 8.0 kpb	Moritz et Brown, 1987

* deux à cinq copies du fragment répété de 1.6 kpb

♦ deux à huit copies du fragment répété de 1.4 kpb

• six à neuf copies du fragment répété de 2.0 kpb

1.3.2.2 Le polymorphisme de taille et l'hétéroplasmie

La variation de taille (polymorphisme de taille) de l'ADNmt d'un individu à l'autre au sein d'une population chez une espèce animale ayant un ADNmt de taille « atypique » est beaucoup plus commune que la variation de taille de l'ADNmt d'un individu à l'autre au sein d'une population chez une espèce animale ayant un ADNmt de taille « typique » (Avisé et Lansman, 1983; Ouellette, 1989 et Rand, 1993). Ce polymorphisme de taille est souvent dû au nombre de copies de la séquence répétée en tandem variant d'une molécule d'ADNmt à l'autre au sein d'une même population et même à l'intérieur d'un individu, c'est-à-dire l'hétéroplasmie (Rand, 1993). Un individu hétéroplasmique possède plus qu'une forme d'ADNmt à l'intérieur de ses cellules.

Dans une recherche menée par R. Ouellette, le taux d'hétéroplasmie pour *Placoepecten magellanicus* qui a un ADNmt atypique de 31.0 à 41.0 kpb (tableau 1.1) a été évalué entre 9.5% et 58.1 %. Cet hétéroplasmie est dû à la présence de 2 à 5 différents types d'ADNmt à l'intérieur d'un individu. Ces ADNmt diffèrent les uns des autres par la présence d'un nombre variable de fragments répétitifs de 1.2 kpb. De plus, les résultats de cette recherche suggèrent que le taux d'hétéroplasmie ou le nombre de copies du fragment répétitif pour *P. magellanicus* varie en fonction des périodes saisonnières. Ceci suggère qu'il y aurait des mécanismes d'adaptation de l'animal par rapport à des facteurs extérieurs tel que les saisons qui affecteraient le nombre de copies du fragment répétitif dans l'ADNmt (Ouellette, 1989).

1.3.3 L'ADNmt de taille « atypique » de quelques espèces de bivalves

Certaines espèces de bivalves possèdent des ADNmt de taille « atypique » (tableau 1.1). Dans le cas de *Placopecten magellanicus*, l'augmentation de la taille de l'ADNmt est due, au moins en partie, par la présence d'une séquence répétée en tandem de 1.4 kpb qui est présente de 2 à 8 fois (Snyder *et al.*, 1987). Chez *Pecten maximus*, la séquence répétée en tandem de 1.6 kpb présente de 2 à 5 fois cause l'augmentation de la taille de l'ADNmt de ce bivalve (Rigaa *et al.*, 1993). Chez *Spisula solidissima*, l'augmentation de la taille de l'ADNmt est due à une séquence répétée en tandem de 2.0 kpb qui est présente de 6 à 9 fois (Arsenault, 1989).

Les fragments répétés en tandem de *Placopecten magellanicus* et de *Pecten maximus* ont été clonés et séquencés (LaRoche *et al.*, 1990 et Rigaa *et al.*, 1995). Les deux séquences, celle de *P. magellanicus* et celle de *P. maximus*, ne démontrent aucune homologie au niveau de la séquence primaire, mais démontrent des structures secondaires comparables, notamment des régions riches en A et T (adénine et thymine), des régions riches en G (guanine) et des structures tige-boucle. De telles structures secondaires ont été démontrées comme importantes dans le contrôle de la réplication et de la transcription des ADNmt (Cornuet *et al.*, 1991; Stanton *et al.*, 1994; Wolstenholme 1992; Monforte *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1994) et se trouvent souvent dans la région qu'on nomme la boucle-D chez les vertébrés (Marshall *et al.*, 1997; Fumagalli *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1995; Dufresne *et al.*, 1996 et Ishida *et al.*, 1994) et dans la région « contrôle » chez les invertébrés (Zhang *et al.*, 1995).

Il n'existe pas de preuve directe de l'implication des séquences répétées en tandem dans le mécanisme de contrôle de la réplication ou de la transcription chez l'ADNmt atypique (LaRoche *et al.*, 1990; Rand, 1993 et Rigaa, 1995). Toutefois, le fait que ces séquences sont produites et conservées d'une génération à l'autre semble suggérer que leur présence offre un avantage pour le génome mitochondrial, par exemple en optimisant l'efficacité de la réplication et de la transcription du génome mitochondrial (Arsenault, 1989; Moritz et Brown, 1986 et Rand, 1993). Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait analyser plusieurs séquences de fragments répétées en tandem de différentes espèces d'invertébrés pour voir s'il y existe des structures secondaires comparables à celles qui sont présentes dans les fragments répétitifs de *P. magellanicus* et de *P. maximus*. Le nombre d'invertébrés ayant des séquences répétées en tandem est petit. *Spisula solidissima* possède un fragment répétitif qui pourrait être analysé et comparé aux fragments répétitifs de *P. magellanicus* et de *P. maximus* mais, jusqu'à présent, aucune étude de ce fragment répété en tandem n'a été entreprise. Donc on ne sait pas si ce fragment comporte les structures secondaires en question.

1.4 L'objectif de cette recherche

Suivant l'étude intensive faite par J. Arsenault (1989) de l'ADNmt de diverses espèces de mollusques du Nouveau-Brunswick et la découverte que l'ADNmt de *Spisula solidissima* a des caractères inhabituels (une taille atypique et une séquence répétée en tandem) semblables à ceux de *Placopecten magellanicus*, nous avons entrepris l'étude approfondie de l'ADNmt de *Spisula solidissima* en se concentrant

sur le fragment répétitif de 2.0 kpb. C'est la première fois, à notre connaissance, que l'on isole et caractérise l'ADNmt de cette espèce autre que le travail préliminaire de Arsenault (1989).

Un des buts de cette recherche a été d'établir la carte de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima*. J. Arsenault (1989) a tracé une carte de restriction préliminaire et très hypothétique de cet ADNmt. Le premier objectif de cette thèse a été l'établissement, pour la première fois, d'une carte de restriction de l'ADNmt de cet organisme pouvant servir comme carte routière détaillée pour l'étude approfondie de l'ADNmt de *S. solidissima* et de sa séquence répétée en tandem .

Les recherches fait par R. Ouellette (1989) ont démontré que le degré d'hétéroplasmie chez *Placopecten magellanicus* peut varier selon des conditions extérieures et que cette variation pourrait être une adaptation par l'organisme à ces mêmes conditions. La présente étude démontre les patrons de restriction de deux différentes populations de l'espèce *Spisula solidissima* provenant de localités géographiques différentes ayant des conditions environnementales (les courants d'eau (Ouellette, 1989)) différentes. Le but de cette partie de la recherche est de voir si les patrons de restriction de l'ADNmt de *S. solidissima* varient selon la localité géographique d'où l'animal provient. De plus, le degré de variation des patrons de restrictions individuels au sein d'animaux d'une même population doit être déterminée. Nous ne pourrons pas comparer nos données à celles de la littérature parce qu'on n'y trouve pas d'étude de population de *Spisula solidissima*. Cependant, en raison du grand nombre d'individus analysés, nous pouvons déterminer le pourcentage d'individus analysés ayant un patron de restriction semblable. Ceci permettra d'établir la fiabilité de la carte de restriction éventuelle.

Après avoir établie une carte de restriction fiable pour l'ADNmt de *Spisula solidissima*, nous avons entrepris pour la première fois le clonage de l'ADNmt de cet organisme. Le but de cette partie de la recherche consiste à mettre sur pied un protocole de clonage qui permet le clonage de l'ADNmt dans le but d'obtenir un clone du fragment répétitif de l'ADNmt de *S. solidissima*.

Les résultats de cette étude seront utilisables pour le séquençage éventuel du fragment répété en tandem de l'ADNmt de *Spisula solidissima*. La carte de restriction de l'ADNmt de cet animal sera indispensable pour l'étude approfondie de cette molécule d'ADNmt et les clones obtenues pourront servir à l'analyse détaillée de la séquence de l'ADNmt de *S. solidissima* et pourront servir d'amorce pour l'amplification par PCR du fragment répétitif et du reste de l'ADNmt de cet organisme. La séquence du fragment répété en tandem de 2.0 kpb de *S. solidissima* permettra une analyse des structures secondaires de ce fragment ainsi qu'une comparaison de ces structures secondaires avec celles de *Pecten maximus* et *Placopecten magellanicus*.

2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Échantillonnage de palourdes de dune

Toutes les palourdes de dune utilisées au cours de cette recherche proviennent; soit du détroit de Northumberland dans la région de Cap Pelé, Nouveau-Brunswick, soit de French River, Ile du Prince Edward. Les échantillons de palourdes provenant du détroit de Northumberland ont été prélevés entre 1993 et 1996 et ceux provenant de French River ont été prélevés en mai 1994. Les palourdes ont été capturées selon la méthode de la pêche commerciale (par drague), gardées dans de l'eau de mer jusqu'au laboratoire où elles ont été gardées à 4°C et analysées dans un délai d'au plus trois jours.

2.2 Choix du tissu

Pour déterminer quel tissu ou combinaison de tissus donne le meilleur rendement d'ADNmt, plusieurs essais d'isolation d'ADNmt ont été faits à partir de quatre types de tissus: les muscles adducteurs, le pied, le manteau et les branchies. Certaines combinaisons de ces tissus ont aussi été essayées: pied et muscles adducteurs, manteau et muscles adducteurs, branchies et muscles adducteurs ainsi que branchies, manteau et muscles adducteurs.

2.3 Préparation de l'ADNmt

2.3.1 Isolation et purification des mitochondries

L'isolation et la purification des mitochondries ont été effectuées selon la méthode de Lansman *et al.* (1981). Tout d'abord, les muscles adducteurs ont été découpés en petits morceaux avec un bistouri ou une lame de rasoir. Quatre ml de tampon isotonique A (mannitol 210 mM, saccharose 70 mM, Tris-Cl 50 mM, pH 7.5, CaCl₂ 3.0 mM et Na₂EDTA 10 mM) par gramme de tissu ont été ajoutés aux muscles découpés. La pression osmotique de la solution isotonique A est semblable à la pression osmotique à l'intérieur des mitochondries afin d'éviter l'éclatement des mitochondries. La présence d'ions Ca⁺² diminue la rupture des noyaux pendant le broyage et l'EDTA inhibe l'activité nucléasique et empêche l'agglomération des mitochondries (Lansman *et al.*, 1981). La suspension de tissu musculaire a été broyée, sur glace, avec l'aide d'un mortier et pilon (homogénéisateur du type Potter-Elvehjem), constitué d'un cylindre en Téflon, le piston, tournant à l'intérieur d'un mortier en verre de 55 ml de forme cylindrique (Thomas Scientifique, É.-U.). Le piston a été actionné par l'intermédiaire d'une perceuse électrique. Au moins 4 à 6 passes, à vitesse moyenne, de par l'espace qui sépare le mortier et le piston ont été nécessaires pour complètement homogénéiser le tissu. La distance entre les parois internes du mortier et le piston est légèrement supérieure à 230 µm afin de faire éclater les cellules musculaires (>100 µm de diamètre) sans pour autant porter atteinte à l'intégrité des mitochondries (1 à 3 µm de longueur; Kleinsmith et Kish, 1995) et des noyaux (environ 10 µm de diamètre; Kleinsmith et Kish, 1995). Les homogénats ont été incubés à 37°C en présence de 3000 à 3600 unités de la Protéase XXIII isolée à partir de la bactérie *Aspergillus oryzae* (Sigma, É.-U.) de 3 à 4

heures afin de réduire la viscosité des homogénats en hydrolysant les protéines cellulaires libérées lors de l'homogénéisation (Arsenault, 1989).

Ensuite, les homogénats ont été centrifugés dans des tubes Corex® de 30 ml à 18 000 xg pour 30 minutes à 4°C (centrifugeuse J2-MC; rotor à angle fixe JA-17, Beckman, É.-U.). Le premier culot de mitochondries a été rincé avec 5 ml de tampon isotonique A et resuspendu soigneusement (à l'aide d'une tige de verre au bout arrondi) dans 20 ml de ce même tampon. La resuspension de mitochondries qui peut aussi contenir des noyaux, des lysosomes et des peroxysomes, a été déposée à la surface d'un gradient discontinu de saccharose dans un tube Ultra-Clear® (Beckman, É.-U.). La couche inférieure du gradient est constituée de 5 ml d'une solution de saccharose 1.5 M (saccharose 1.5 M, Tris-Cl 10 mM, pH 7.5 et Na₂EDTA 5 mM), tandis que la couche supérieure du gradient est constituée de 10 ml d'une solution saccharose 1.0 M (saccharose 1.0 M, Tris-Cl 10 mM, pH 7.5 et Na₂EDTA 5 mM). Le tout a été centrifugé à 110 000 xg pour 30 minutes à 4°C (ultracentrifugeuse L8-M; rotor à godets mobiles SW28, Beckman, É.-U.). À cause de leur densité, les mitochondries traversent la solution saccharose 1.0 M, mais ne pénètrent pas la solution saccharose 1.5 M. La bande mitochondriale se retrouve, à la fin de la centrifugation, à l'interface des couches de saccharose et on peut la voir comme un nuage blanc. Cependant, les noyaux, plus denses que les mitochondries, se retrouvent au fond du tube et les peroxysomes ainsi que les lysosomes, moins denses que les mitochondries, ne pénètrent même pas la solution saccharose 1.0 M. Cette étape permet une purification des mitochondries. La bande mitochondriale a été aspirée à l'aide d'une seringue de 10 ml munie d'une aiguille en forme de crochet. Chaque aliquote de 3 ml de cette suspension mitochondriale a été diluée

avec 9 ml de la solution isotonique B (mannitol 210 mM, saccharose 70 mM, Tris-Cl 50 mM, pH 7.5 et Na₂EDTA 10 mM). Ceci réduit la densité du milieu.

Enfin, la solution de mitochondries purifiées a été centrifugée dans des tubes Corex© de 15 ml à 18 000 xg pour 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été délicatement décanté et les mitochondries ont été resuspendues dans 500 µl de tampon STE (NaCl 100 mM, Tris-Cl 50 mM, pH 8.0 et Na₂EDTA 10 mM). Cette suspension a été transférée dans un microtube de 1.5 ml.

2.3.2 Lyse des mitochondries

Le détergent anionique sulfate dodécyl de sodium (SDS) entraîne la dissolution des membranes mitochondriales. Trente µl d'une solution SDS 25% ont été ajoutés à la resuspension mitochondriale. La resuspension se clarifie tout de suite indiquant la lyse des organites.

2.3.3 Purification et précipitation de l'ADNmt

La purification de la solution d'ADNmt par extraction avec des solvants organiques a été effectuée selon la méthode décrite par Sambrook *et al.* (1989). Trois à cinq extractions ont été faites avec 500 µl (un volume) d'un mélange de phénol saturé (au Tris-Cl (10 mM dans l'eau, pH 8.0)), chloroforme, alcool isoamylique (PCI) dans un rapport 25 :24 :1. Après chaque extraction, les deux phases (organique et aqueuse) ont été séparées par centrifugation à 14 000 xg (vitesse maximale) pour 5 minutes utilisant une microcentrifugeuse (Microfuge E, Beckman, É.-U.) . La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau microtube.

L'extraction finale a été faite avec 1 volume de chloroforme afin d'enlever tous les résidus de phénol. Ensuite, toutes les traces de chloroforme ont été enlevées par évaporation à l'air pour 10 à 30 minutes.

L'ADNmt purifié a été précipité avec 2.2 volumes d'éthanol 95% (pré-refroidi à -20°C) de 24 à 48 heures à -20°C . L'ADNmt a été récupéré par centrifugation pour 25 minutes dans une microcentrifugeuse. L'éthanol 95% a été décanté et 500 μl d'éthanol 70% (pré-refroidi à -20°C) ont été ajoutés. L'ADNmt a été centrifugé pour 5 minutes dans une microcentrifugeuse. L'éthanol a été décanté avec soin pour ne pas déplacer le culot d'ADNmt. Le culot d'ADNmt a été séché, sous-vide, de 10 à 15 minutes afin d'enlever toutes les traces d'éthanol.

2.3.4 Conservation des échantillons de l'ADNmt

Le culot d'ADNmt a été resuspendu dans 20 μl de TE (Tris-Cl 10 mM, pH 8.0 et Na_2EDTA 0.5 mM). La solution d'ADNmt a été conservée à -20°C jusqu'à l'analyse.

2.4 Analyse de l'ADNmt

2.4.1 Digestion de l'ADNmt par des endonucléases de restriction

2.4.1.1 Digestion simple

Le volume réactionnel pour les digestions simples comprend i) l'ADNmt (de 1 à 4 μl de la solution d'ADNmt dans le TE (section 2.3.4)), ii) 1 μl de l'endonucléase de restriction (soit *Bam HI* (10 unités/ μl) (Promega, É.-U.), soit *Bst EII* (12 unités/ μl) (Promega, É.-U.), soit *Bgl I* (10 unités/ μl) (Promega, É.-U.)), iii) de 1 ou 2 μl (dépendant du volume final de 10 μl ou 20 μl respectivement) de tampon réactionnel 10X (Promega, É.-U.) propre à l'endonucléase de restriction en question et iv) de l'eau stérile pour compléter le volume réactionnel à soit 10 μl soit 20 μl . Le milieu réactionnel, contenu dans un microtube de 1.5 ml, a été incubé à la température d'incubation de l'enzyme (soit 37°C pour *Bam HI* et *Bgl I*, soit 60°C pour *Bst EII*) pour au moins 3 heures. Après la digestion enzymatique, les fragments de restriction ont été soumis directement au marquage radioactif (section 2.4.2) ou bien la réaction enzymatique a été arrêtée en ajoutant 2 μl de tampon d'arrêt 6X (concentration finale de bleu de bromophénol 0.04%, Na₂EDTA 5 mM et glycérol 10% v/v) (si le volume réactionnel final était de 10 μl) ou 4 μl de tampon d'arrêt 6X (si le volume réactionnel final était de 20 μl).

2.4.1.2 Digestion double

Le volume réactionnel pour les digestions doubles était constitué de i) 3 à 8 μl de la solution d'ADNmt dans du TE (section 2.3.4), ii) 1 μl d'un premier endonucléase de restriction (soit *Bam HI* (10 unités/ μl), soit *Bgl I* (10 unités/ μl)), iii) de 2 μl de tampon réactionnel 10X (tampon réactionnel D: Tris-Cl 60 mM, pH 7.9, NaCl 1.5 M, MgCl_2 60 mM et DTT (dithiothreitol) 10 mM (Promega, É.-U.)) et iv) de l'eau stérile pour compléter le volume réactionnel à 20 μl . Après une incubation de 3 heures à la température d'incubation de ce premier endonucléase de restriction, 1 μl d'un deuxième enzyme de restriction (soit *Bgl I* (10 unités/ μl), soit *Bst EII* (12 unités/ μl)) a été ajouté et le milieu réactionnel a été incubé pour 3 heures à la température d'incubation de ce deuxième enzyme. L'enzyme de restriction *Bam HI* est actif à 75 % dans le tampon réactionnel D et les enzymes de restriction *Bst EII* et *Bgl I* sont actifs à 100 % dans ce même tampon (Promega, É.-U.). Après la deuxième digestion, les fragments de restriction ont été directement sujets au marquage radioactif (section 2.4.2).

2.4.2 Radiomarquage des fragments de restriction au ^{35}S

La méthode de marquage des fragments de restriction est celle du "Klenow based 5'-filling of protuding ends" (Promega, 1997). Cette méthode permet d'introduire, à l'aide de l'activité polymérase 5' \rightarrow 3' du fragment Klenow de l'ADN polymérase d'*Escherichia coli*, du dAMP contenant le soufre-35 (^{35}S) dans des fragments de restriction ayant des extrémités cohésives en surplomb 5'.

Au mélange réactionnel (20 μ l) provenant de la digestion simple (section 2.4.1.1) ou de la digestion double (section 2.4.1.2), 1 μ l d'une solution dNTP (5 mM de dCTP, dTTP et dGTP, Pharmacia Biotech, Suède), 5 à 10 μ Ci de α [³⁵S]dATP 400 à 800 Ci/mmol (Amersham, É.-U.) et 1 unité d'ADN polymérase Klenow (Promega, É.-U., ou Boehringer Mannheim, Allemagne) ont été ajoutés. Ce mélange a été incubé à la température de la pièce (23°C à 25 °C) pour 25 minutes. La réaction a été arrêtée en ajoutant 5 μ l de tampon d'arrêt 6X (section 2.4.1.1).

2.4.3 Analyse des fragments de restriction

2.4.3.1 Analyse des fragments de restriction non radiomarqués

2.4.3.1.1 Préparation du gel d'agarose et électrophorèse

Tout d'abord, un gel d'agarose 1% (p/v) (Bio-Rad, É.-U.) dans un tampon TAE (Tris-acétate 40 mM et EDTA 1 mM) a été préparé selon la méthode décrite par Sambrook *et al.* (1989). Vingt-cinq ml de la solution d'agarose à environ 50°C ont été coulés dans un moule en plastique ayant des dimensions de 10 cm x 8 cm (mini-gel). Soixante ml ont été utilisés pour préparer un gel de dimensions de 15 cm x 15 cm (maxi-gel). Après solidification, le gel d'agarose a été submergé dans le réservoir électrophorétique (Hoefler, É.-U.) contenant du TAE.

Douze μ l ou 24 μ l du mélange réactionnel (section 2.4.1.1) ont été déposés dans des puits du gel. Un potentiel électrique de 75 V (pour un mini-gel) ou de 90 V (pour un maxi-gel) a été appliqué de 1 à 3 heures, dépendant de la vitesse de migration des fragments de restriction. La technique d'électrophorèse sur gel

d'agarose permet de séparer les fragments de restriction selon leur taille. La distance de migration d'un fragment de restriction est inversement proportionnelle au logarithme de sa longueur (nombre de paires de base). Effectivement, plus petit est le fragment de restriction, plus loin du puits il va migrer. Cette relation est linéaire à l'intérieur de certaines limites (voir 2.4.4).

2.4.3.1.2 Coloration du gel au bromure d'éthidium et photographie

Après l'électrophorèse, le gel d'agarose a été submergé dans une solution de bromure d'éthidium 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, É.-U.) dans du TAE de 30 à 45 minutes, dépendant de l'épaisseur du gel d'agarose. Ensuite, le gel d'agarose a été rincé dans un bain d'eau distillée de 5 à 15 minutes et visualisé sur un transilluminateur UV (Fotodyne, É.-U.). Le bromure d'éthidium est un composé organique qui s'intercale entre les bases azotées de l'ADN et est fluorescent sous la lumière UV. Cette fluorescence est directement proportionnelle à la quantité de bromure d'éthidium qui s'intercale entre les bases azotées de l'ADN qui, à son tour, est directement proportionnelle au nombre de paires de bases de cet ADN. Plus l'endroit du gel est fluorescent, plus il y a d'ADN à cet endroit.

Le gel a été photographié sous la lumière UV avec une caméra Crown Graphic (Graphex, É.-U.) équipée d'un filtre UV orange (Tissen séries 6 21 orange, É.-U.). Une pellicule photographique Tmax 100 (Kodak, É.-U.) a été exposée pour 4 minutes à une ouverture de focale 5.6. Par la suite, la pellicule a été submergée 4 minutes dans un révélateur Tmax (Kodak, É.-U.), 30 secondes dans un bain d'arrêt (Ilford, U.K.) et 10 minutes dans un fixateur (Kodak, É.-U.).

2.4.3.2 Analyse des fragments de restriction radiomarqués

2.4.3.2.1 Préparation du gel d'agarose et l'électrophorèse

Comme dans la section 2.4.3.1.1, un gel d'agarose 1 % dans du tampon TAE a été préparé et 75 ml de cette solution ont été coulés dans un moule en plastique pour un maxi-gel. Tout le mélange réactionnel (section 2.4.3.1) a été déposé dans les puits du gel d'agarose et un potentiel de 90 V a été appliqué pour 2 heures et demie.

2.4.3.2.2 Séchage du gel d'agarose et autoradiographie

Après l'électrophorèse, le gel d'agarose a été délicatement placé sur une plaque de verre. La plaque de verre supportant le gel d'agarose a été placée dans une hotte de 12 à 15 heures en prenant soin de régler le débit d'air. Le gel d'agarose complètement séché a été détaché de la plaque de verre et placé dans une cassette d'autoradiographie (8 x 10 po) (Fisher Biotech, É.-U.). Un film BioMax MR (8 x 10 po) (Kodak, É.-U.) a été placé directement sur le gel et l'exposition de ce film à la radioactivité a duré de 2 à 24 heures, dépendant de la quantité de radioactivité dans le gel. Par la suite, la pellicule a été submergée 5 minutes dans un révélateur (GBX Developer/Replenisher, Kodak, É.-U.), 1 minute dans l'eau courante (18 à 22°C) et de 5 à 10 minutes dans un fixateur (GBX Fixer/Replenisher, Kodak, É.-U.).

2.4.4 Détermination de la taille des fragments de restriction de l'ADNmt

Les distances de migration des fragments de restriction ont été mesurées avec un pied-à-coulisse (erreur ± 0.05 mm). Ces distances ont été comparées aux distances de migration des fragments de restriction du standard. Le standard utilisé tout au long de cette recherche est l'ADN du phage lambda digéré avec l'endonucléase de restriction *Hind III* (Promega, É.-U.). Pour déterminer la taille, en kilopaires de bases, des fragments de restriction du standard séparés par électrophorèse, des courbes de référence ont été tracées. L'axe des Y correspond au logarithme du nombre de kilopaires de bases (kpb) des fragments de restriction et l'axe des X correspond aux distances de migration en mm de ces fragments (annexe A) . Il y a une relation de linéarité entre le logarithme du nombre de kilopaires de bases (kpb) du fragment de restriction (axe des Y) et sa distance de migration (axe des X). D'après ces courbes de référence, les tailles des fragments de restriction d'ADNmt de *Spisula solidissima* ont été calculées. Mais, pour un gel d'agarose 1%, cette relation n'est linéaire que pour des fragments inférieurs à 6.5 kpb. Au delà de 6.5 kpb, la droite tend vers une asymptote à l'ordonnée et il y a par conséquent un plus grand degré d'incertitude dans la détermination des tailles des fragments de restriction supérieures à 6.5 kpb (Sambrook *et al.*, 1989).

Les tailles des fragments de restriction supérieures à 6.5 kpb ont été déterminées de la même façon que les fragments de restriction de tailles inférieures à 6.5 kpb mais avec une plus grande incertitude. L'incertitude absolue sur les valeurs des tailles des fragments de restriction a été déterminée en suivant la démarche adoptée par Arsenault (1989). Premièrement, les valeurs du logarithme du nombre de kpb correspondant à la distance de migration du fragment en question $+0.05$ mm

et -0.05 mm ont été calculées. Ensuite, les tailles correspondant à ces deux valeurs (A et B), en kpb, ont été trouvées en calculant l'antilogarithme de ces deux valeurs. L'incertitude absolue de la taille du fragment de restriction est la valeur absolue la plus élevée, résultant des différences entre la taille (en kpb) du fragment de restriction et celle des deux valeurs A et B (en kpb) obtenues.

2.5 Clonage des fragments de restriction *Bam HI*

2.5.1 Choix des bactéries et du plasmide

Plusieurs souches bactériennes et de plasmides sont maintenant disponibles pour le clonage. La souche choisie pour cette recherche est la souche d'*Escherichia coli* DH5 α . Le génotype ainsi que les marqueurs génétiques des DH5 α se trouvent en annexe A.

Le plasmide utilisé pour cette recherche est le pBluescript® SK fl (Stratagene, É.-U.). La carte de restriction de ce plasmide se trouve en annexe B. Le pBluescript® comprend seulement un site de restriction *Bam HI* dans le site de multiclonaage. Le pBluescript® possède un gène qui confère à la bactérie une résistance à l'ampicilline; le gène *amp^r*. De plus, le pBluescript® possède, dans le site de multiclonaage, une partie du gène *lac Z*; une séquence qui code pour les 146 premiers acides aminés de l'enzyme β -galactosidase (β -gal). C'est le fragment α de la β -gal. Certaines souches d'*E.coli*, incluant les DH5 α , possèdent une délétion au gène *lac Z*, mais la partie codante pour le domaine C-terminal de la β -gal est

présente. Le génotype des ces bactéries est β -gal⁻, c'est-à-dire, qu'elles ne peuvent pas produire l'enzyme β -gal actif. Lorsqu'un plasmide comme le pBluescript® est inséré dans une bactérie β -gal⁻, la partie α de la β -gal (codée par le plasmide) ainsi que la partie C-terminal de la β -gal (produite par la bactérie) sont présentes et il y a formation de l'enzyme β -gal actif et les bactéries deviennent β -gal⁺. Cependant, lorsqu'un fragment d'ADN étranger est inséré dans le site de multiclonaage du plasmide (plasmide recombiné) il n'y a pas formation de la partie α de la β -gal. Lorsque ce plasmide recombiné est inséré dans une bactérie β -gal⁻, il n'y a pas formation de la β -gal actif; les bactéries restent β -gal⁻ (Ullmann *et al.*, 1967). En présence d'un substrat chromogène, le 5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal), les bactéries β -gal⁺ métabolisent ce substrat et, par conséquent, ces colonies bactériennes deviennent bleues. Par contre, les bactéries β -gal⁻, en présence du même substrat chromogène, ne métabolisent pas ce substrat et restent blanches. C'est cette méthode de sélection dite "α-complémentation" qui a été utilisée pour sélectionner les cellules avec un insert; un fragment de restriction *Bam HI* de l'ADNmt de *Spisula solidissima*.

2.5.2 Culture et conservation des bactéries

Les bactéries DH5 α ont été cultivées et conservées dans un milieu LB (Luria-Bertani). Ce milieu contient, par litre de solution, 10 g de tryptone (Bacto-Tryptone, Difco, É.-U.), 5 g d'extrait de levure (Bacto-Yeast, Difco, É.-U.) et 10 g de NaCl. Le pH a été ajusté à 7.0 avec du NaOH et le milieu LB a été stérilisé sur un cycle liquide (121°C, 15 livres par pouce carré) pour 20 minutes (Autoclave Eagle 3000, Amsco, É.-U.).

Les plats de pétri ont été préparés en ajoutant, avant la stérilisation, 15 g d'agar (Bacto-Agar, Difco, É.-U.) par litre de LB liquide. Le LB liquide (LB-liq) et le LB agar (LB-ag) avec ampicilline (LB-liq-amp et LB-ag-amp) ont été préparés en ajoutant de l'ampicilline (Sigma, É.-U.) à une concentration finale de 60 µg/ml, au milieu LB-liq ou au milieu LB-ag respectivement après la stérilisation et le refroidissement. Les plats de pétri avec X-Gal (Boehringer Mannheim, Allemagne) et IPTG (isopropylthio-β-D-galactosidase, Boehringer Mannheim, Allemagne), (LB-ag-amp-X) ont été préparés en étalant, à la surface de l'agar (LB-ag-amp), 40 µl d'une solution stock de X-Gal 20 mg/ml dans diméthylformamide) et 4 µl d'une solution stock IPTG (200 mg/ml).

Pour conserver les bactéries, 850 µl d'une culture bactérienne ont été ajoutés à 150 µl de glycérol dans un microtube de 1.5 ml stérile. Le tout a été gelé dans l'azote liquide et gardé dans un congélateur à -70°C.

2.5.3 Préparation des cellules d'*Escherichia coli* compétentes

La méthode utilisée pour rendre les cellules bactériennes compétentes est celle de Davis *et al.* (1994). Environ 300 ml de LB-liq ont été inoculés avec une culture bactérienne en croissance depuis 12 heures. Cette nouvelle culture a été incubée à 37°C avec agitation (250 cycles/minute) dans un bain thermostaté (Lab-Line, É.-U.). Lorsque la densité optique à 600 nm de cette culture bactérienne a atteint 0.4 ce qui correspond à une croissance en phase exponentielle, la culture a été transférée dans deux bouteilles à centrifugation de 250 ml (Nalgene, Sybron, É.-U.) stériles et pré refroidies à raison de 150 ml de culture par bouteille. La culture a été centrifugée à

5500 xg pour 10 minutes à 4 °C (centrifugeuse J2-MC, rotor à angle fixe JA-14, Beckman, É.-U.). Chaque culot de bactéries a été délicatement resuspendu dans 24 ml de solution Ca/glycérol (CaCl₂ 60 mM, PIPES [Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)] 10 mM, pH 7.0, glycérol 15% (v/v)) stérile et pré-refroidie. Une autre centrifugation à 5500 xg a été faite et chaque culot de bactéries a été suspendu dans 24 ml de solution Ca/glycérol stérile et pré-refroidie. Ces suspensions ont été gardées sur glace pour 30 minutes. Ensuite, ces suspensions ont été centrifugées à 5500 xg pour cinq minutes à 4°C. Ensuite, chaque culot de bactéries a été suspendu dans quatre ml de la solution Ca/glycérol stérile et pré-refroidie. Plusieurs aliquotes (500 µl) de cellules compétentes ont été rapidement gelées dans l'azote liquide et gardées à -70°C. Pour tester l'efficacité de transformation, 125 µl de cellules compétentes ont été dégelés et transformés avec 10 ng de plasmide suivant la méthode de transformation décrite à la section 2.5.6. Cette procédure a donné une efficacité de transformation de l'ordre de 10³ à 10⁴ colonies transformées par 125 µl de cellules.

2.5.4 Digestion de l'ADNmt et du plasmide par l'enzyme de restriction *Bam HI*

Un échantillon total de 20 µl (section 2.3.4) de l'ADNmt a été utilisé pour le clonage. Le milieu réactionnel consiste de i) 20 µl d'ADNmt dans TE, ii) 5 µl de tampon réactionnel 10X pour l'endonucléase de restriction *Bam HI* (tampon réactionnel E (Tris-Cl 60 mM, pH 7.5, NaCl 1.0 M, MgCl₂ 60 mM et DTT 10 mM) (Promega, É.-U.)), iii) 5 µl de l'endonucléase de restriction *Bam HI* (10 u/µl) (Promega, É.-U.) et iv) de l'eau stérile pour compléter le volume réactionnel à 50 µl. Le milieu réactionnel pour la digestion du pBluescript® consiste de i) 100 ng

d'ADN (plasmide), ii) 1 μ l de tampon réactionnel E 10X, iii) 1 μ l de l'endonucléase de restriction *Bam HI* et iv) de l'eau stérile pour compléter le volume réactionnel à 10 μ l. Les deux mélanges réactionnels ont été incubés à 37°C pour deux heures. Après l'incubation, le volume de chaque mélange réactionnel a été ajusté à 250 μ l avec du TE et une extraction avec 1 volume de PCI (section 2.3.3) a été faite pour inactiver l'endonucléase de restriction. L'ADNmt coupé et le plasmide linéarisé ont été précipités en ajoutant 2.2 volumes d'éthanol 95% (pré-refroidi à -20 °C) ainsi que de l'acétate de sodium (pH 5.2) à une concentration finale de 0.3 M (Sambrook *et al.*, 1989). L'ADNmt coupé et le plasmide linéarisé ont été récupérés par centrifugation (section 2.3.3) et suspendus dans 10 μ l de TE.

2.5.5 Ligation des fragments de restriction *Bam HI* et des plasmides linéarisés

En présence d'ATP, l'ADN ligase établit le lien phosphodiester entre deux nucléotides, un à l'extrémité 5' d'un fragment d'ADN et l'autre à l'extrémité 3' de l'autre fragment d'ADN. C'est-à-dire, cette enzyme rejoint deux brins d'ADN, à condition que les séquences aux extrémités de ces brins d'ADN soient complémentaires.

Dans un microtube stérile de 1.5 ml, cinq μ l de la solution d'ADNmt coupé (section 2.5.4), 1 μ l de la solution du plasmide linéarisé (section 2.5.4) et 2 μ l d'eau stérile ont été ajoutés. Ce mélange a été chauffé à 45°C pour 5 minutes et, ensuite refroidi à 0°C. Un μ l de tampon de ligation 10X (Tris-Cl 660 mM, pH 7.5, MgCl₂ 50 mM, ATP 10 mM et DTT 10 mM) et 1 μ l de T4 Ligase (1 unité/ μ l) (Boehringer

Mannheim, Allemagne) ont été ajoutés au microtube contenant l'ADNmt et le plasmide. Le tout a été incubé à 16°C pour 12 heures (Sambrook *et al.*, 1989).

2.5.6 Transformation des cellules compétentes avec le mélange de ligation et sélection des cellules recombinantes

La méthode de transformation utilisée a été celle de Davis *et al.* (1994). D'abord, les cellules compétentes (section 2.5.3) ont été dégelées sur glace. Deux µl du mélange de ligation (section 2.5.5) ont été ajoutés à 150 µl de cellules compétentes et ce mélange a été incubé sur glace pour 30 minutes et, par la suite, transféré dans un bain d'eau à 42°C pour exactement deux minutes. Le choc de température augmente l'efficacité de transformation. Un ml de LB-liq a été ajouté au tube de cellules compétentes et ce tube a été incubé à 37°C pour 45 minutes. Durant ce temps, les cellules compétentes récupèrent et les cellules transformées développent leur résistance à l'ampicilline en exprimant le gène *amp^r* porté sur le plasmide. Après incubation, les cellules, à l'aide d'une tige de verre repliée, ont été réparties à la surface d'un plat de pétri LB-ag-amp-X et incubées à 37°C de 12 à 18 heures. Les colonies qui survivent en présence d'ampicilline ayant un plasmide avec un insert (un fragment de restriction *Bam HI*) sont blanches, les autres, sans insert, sont bleues (section 2.5.1). Chaque colonie blanche a été placée dans deux ml de LB liq-amp et cultivée pour 18 heures à 37°C.

2.5.7 Minipréparation et analyse des plasmides recombinés

La minipréparation des plasmides par lyse alcaline a été effectuée selon la méthode de Sambrook *et al.* (1989). Après incubation à 37°C pour 18 heures (section 2.5.6), 1 ml de chaque culture a été transféré dans des microtubes de 1.5 ml.

Ces tubes ont été centrifugés dans une microcentrifugeuse pour quelques secondes. Le milieu de culture a été enlevé par aspiration sous vide. Le culot de bactéries a été suspendu dans 100 μ l de la solution I (glucose 50 mM, Tris-Cl 25 mM, pH 8.0 et EDTA 10 mM) stérile et pré-refroidie. Ensuite, 200 μ l de la solution II (NaOH 0.2 N et SDS 1%) fraîchement préparée ont été ajoutés au tube. Après quelques inversions, le tube a été placé sur glace de 15 à 20 minutes. Après la lyse cellulaire, 150 μ l de la solution III (acétate de potassium 5 M et acide acétique glacial 11.5% v/v) stérile et pré-refroidie ont été ajoutés au tube afin de neutraliser le NaOH. Par la suite, le mélange a été centrifugé dans une microcentrifugeuse pour 5 minutes et le surnageant a été transféré dans un nouveau microtube. Une extraction au PCI (section 2.3.3) a été faite et l'ADN a été précipité par l'ajout de 2 volumes d'éthanol 95 % (température de la pièce). Une incubation a été faite à la température de la pièce pour 10 minutes. L'ADN a été récupéré par centrifugation dans une microcentrifugeuse pour 5 minutes. Le culot d'ADN a été lavé avec 1 ml d'éthanol 70 % (à 4 °C). L'éthanol a été décanté et le culot d'ADN a été séché à l'air pour 10 minutes. L'ADN a été resuspendu dans 50 μ l de TE.

Pour analyser les inserts dans les plasmides, 1 μ l de la solution d'ADN de 50 μ l (ci-haut) a été digéré avec l'endonucléase de restriction *Bam HI* dans un volume final de 10 μ l (section 2.4.1.1). Après digestion, les fragments ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et visualisés, après coloration au bromure d'éthidium, sous la lumière UV (section 2.4.3.1).

3.0 RÉSULTATS

3.1 L'isolation et l'analyse de l'ADNmt de *Spisula solidissima*

3.1.1 Choix du tissu

Pour déterminer quel tissu ou combinaison de tissus donne le meilleur rendement d'ADNmt, plusieurs essais d'isolation d'ADNmt ont été faits à partir de quatre types de tissus: les muscles adducteurs, le pied, le manteau et les branchies. Certaines combinaisons de ces tissus ont aussi été essayées: pied et muscles adducteurs, manteau et muscles adducteurs, branchies et muscles adducteurs ainsi que branchies, manteau et muscles adducteurs. Le tableau 3.1 résume les résultats obtenus pour ces essais et il est possible de constater que les préparations d'ADNmt à partir des muscles adducteurs seuls ont donné les meilleurs résultats: une préparation d'ADNmt sans trop de déchets et qui est coupé par l'endonucléase *Bst EII*. C'est pourquoi toutes les préparations d'ADNmt dans cette recherche ont été faites à partir des muscles adducteurs seuls.

3.1.2 Quantification d'ADNmt de *Spisula solidissima*

Les préparations d'ADNmt de *Spisula solidissima* n'ont pas été quantifiées selon les méthodes quantitatives typiques telles que la spectrophotométrie UV ou la fluorescence. Les quantités d'ADNmt étaient moins que les limites de détection de ces deux méthodes (0.1 µg d'ADN/µL) (Davis *et al.*, 1994).

Tableau 3.1 : Isolation et analyse enzymatique par l'endonucléase de restriction *Bst EII* de l'ADNmt à partir de différents tissus de *Spisula solidissima*

Tissus ou combinaison de tissus utilisés	Présence de déchets (indentifié par des traînées sur le gel d'agarose)	Résultats de la digestion de l'ADNmt par l'enzyme de restriction <i>Bst EII</i> + = ADNmt a été coupé - = ADNmt n'a pas été coupé o = aucun résultat
Manteau	Moyen	-
Pied	Beaucoup	o
Muscles adducteurs	Peu	+
Branchies	Moyen	-
Pied et muscles adducteurs	Beaucoup	+
Manteau et muscles adducteurs	Moyen	+
Branchies et muscles adducteurs	Moyen	+
Branchies, manteau et muscles adducteurs	Moyen	+

La méthode utilisée pour estimer la quantité d'ADNmt dans un échantillon donné consiste à comparer l'intensité d'une bande de cet ADNmt dans un gel d'agarose (celle de 2.04 kpb à la figure 3.1) avec l'intensité d'une bande de taille semblable du phage λ digéré avec *Hind III* (celle de 2.0 kpb à la figure 3.1) dont on peut calculer le contenu en ADN. Pour déterminer la quantité d'ADN du phage dans cette bande, il faut connaître la quantité totale d'ADN du phage déposée dans le puit du gel. Dans notre cas, 1 μg total d'ADN du phage (taille totale 48.503 kpb) a été déposé. Ensuite, pour trouver la quantité d'ADN dans la bande de 2.0 kpb, il faut diviser la taille totale de l'ADN du phage (48.503 kpb) par la taille de l'ADN dans la bande choisie (2.0 kpb) et multiplier par la quantité d'ADN déposé dans le puit (1 μg) (Gibco BLR, 1995). Dans ce cas, il y a 0.05 μg (50 ng) d'ADN du phage dans la bande de 2.0 kpb. En comparant l'intensité de la bande du phage avec l'intensité de la bande de 2.04 kpb de l'ADNmt (figure 3.1), il est possible de dire que la bande d'ADNmt semble être environ dix fois moins intense que la bande du phage. Ceci donne une estimation d'environ 5 ng d'ADNmt pour cette bande de 2.04 kpb.

La bande de 2.04 kpb de l'ADNmt est celle du fragment répété qui est présent 6 fois (tableau 3.2) pour cette molécule d'ADNmt et par conséquent représente 12.24 kpb de l'ADNmt. La taille totale pour la molécule d'ADNmt est de 35.87 kpb (tableau 3.2). En faisant le calcul inverse de celui décrit ci-haut, on détermine qu'il y a 15 ng d'ADNmt qui ont été déposés dans le puit. C'est-à-dire qu'il y a environ 15 ng d'ADNmt dans cet échantillon. Il faut prendre en considération que cette valeur n'est qu'une estimation de la quantité d'ADNmt pour cet individu et que toutes les préparations d'ADNmt ne sont pas équivalentes. Par conséquent, on généralise la quantité d'ADNmt isolée à partir d'un individu comme étant de 10 à

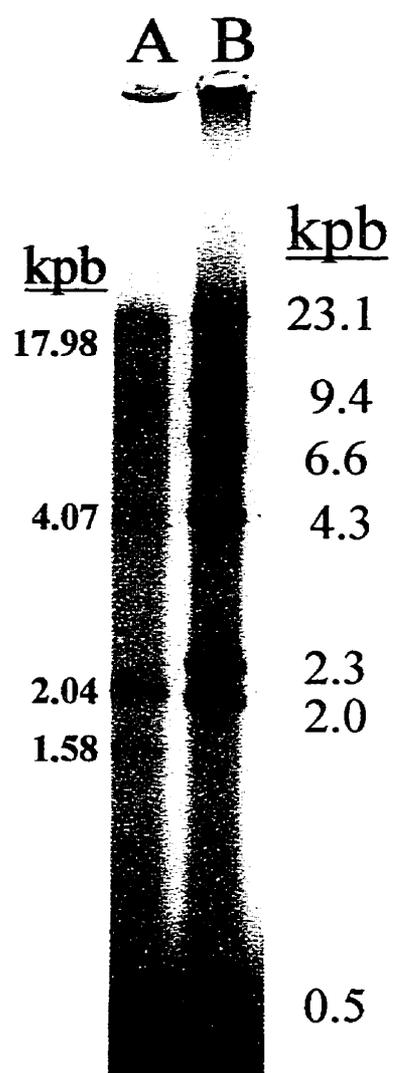


Figure 3.1 : Patron de restriction *Bst EII* « normal » de l'ADNmt de *Spisula solidissima*. La voie A représente le patron de restriction *Bst EII* et la voie B représente le marqueur (l'ADN du phage λ digéré avec l'enzyme de restriction *Hind III*).

20 ng. Même si cette quantité n'est qu'une estimation de la quantité d'ADNmt isolée par individu, elle démontre que la quantité d'ADNmt avec laquelle on travaille est très faible, ce qui rend difficile les analyses subséquentes et enlève la possibilité de travailler en répliquats. De plus, ça démontre la nécessité du clonage de cet ADNmt et sa production en plus grande quantité.

3.1.3 Choix des enzymes de restriction

Dans son étude préliminaire sur l'ADNmt de *Spisula solidissima*, J. Arsenault (1989) a digéré l'ADNmt de *S. solidissima* avec quelques endonucléases de restriction : *Ava I*, *Ava II*, *Bgl I*, *Bst EII*, *Hind III*, *Eco RI* et *Pst I*. Elle a trouvé que seulement *Bst EII* et *Bgl I* coupent l'ADNmt de l'espèce en question. Nous avons repris ces tests et nous avons vérifié plusieurs autres endonucléases de restriction. La liste complète inclut *Ava I*, *Ava II*, *Bam HI*, *Bcl I*, *Bgl I*, *Bgl II*, *Bst EII*, *EcoR I*, *EcoR V*, *Hae II*, *Hind III*, *Kpn I*, *Pst I*, *Sal I*, *Sin I*, *Sma I*, *Xba I* et *Xho I*. Le choix des endonucléases dépend de leurs séquences de reconnaissance ainsi que leurs disponibilités. Les endonucléases ayant des séquences de reconnaissance de 5 nucléotides ou plus ont été sélectionnés parce que les endonucléases ayant des séquences de reconnaissance de 4 ou moins nucléotides génèrent trop de petits fragments de restriction qui seraient difficiles à analyser. De tous les enzymes de restriction, trois ont coupé l'ADNmt de *Spisula solidissima*: *Bst EII*, *Bgl I* (appuyant les résultats d'Arsenault) et *Bam HI*.

3.2 L'étude du patron de restriction *Bst EII* de l'ADNmt pour deux populations de *Spisula solidissima* et la détermination de la variabilité de cet ADNmt

Deux populations de *Spisula solidissima* de régions géographiques différentes ont servi comme source de l'ADNmt pour cette recherche. La première population, identifiée C, a fourni 76 individus provenant du Détroit de Northumberland dans la région de Cap Pelé, Nouveau-Brunswick. La deuxième population, identifiée I, a fourni 53 individus provenant de French River, Ile du Prince Edward. Les patrons de restriction *Bst EII* de l'ADNmt de tous les individus des populations C et I se trouvent à l'annexe D.

La plupart des individus, provenant des deux populations, possèdent un patron de restriction unique composé de quatre bandes (figure 3.1 et tableau 3.2). Ce patron est dit « normal ». Il faut noter que la bande de 2.04 kpb est beaucoup plus intense que la bande de 4.07 kpb (figure 3.1). Théoriquement, d'après les longueurs des fragments, la bande de 2.04 kpb devrait être moins intense que la bande de 4.07 kpb. Il y a plus d'ADN présent au niveau de la bande de 2.04 kpb qu'au niveau de la bande de 4.07 kpb. Donc il y a plusieurs copies du fragment de 2.04 kpb; c'est le fragment répété en tandem démontré pour la première fois par J.Arsenault (1989). Selon les résultats de J. Arsenault (1989), le fragment répété en tandem peut être présent de six à neuf fois par molécule de l'ADNmt. La plupart des individus rencontrés dans cette recherche possèdent des molécules de l'ADNmt ayant six copies du fragment répété en tandem. Lorsqu'on additionne les fragments de restriction pour trouver la longueur totale de l'ADNmt d'un individu, on doit prendre en considération le nombre de copies du fragment de 2.04 kpb (d'après la longueur

Tableau 3.2: Longueurs des fragments de restriction *Bst EII* et taille totale de l'ADNmt de *Spisula solidissima*.

<u>Longueur en kpb</u>	<u>Incertitude absolue</u>	<u>Intensité du fragment</u>
17.98	2.02	fort
4.07	0.09	faible
2.50*	0.06	faible
2.04 [♦]	0.04	fort
1.58	0.03	faible
somme (patron « normal ») 35.87	2.38	

Taille de l'ADNmt (« normal ») = 35.87 ± 2.38 kpb

* fragment de 2.50 kpb présent dans les individus ayant un patron de restriction « anormal »

♦ le fragment répété en tandem; 6 copies

totale de l'ADNmt). Dans ce cas, il y a 6 copies du fragment répété de 2.04 kpb. En faisant la somme des longueurs des fragments de restriction *Bst EII* pour un patron de restriction « normal », on trouve une taille de l'ADNmt de *Spisula solidissima* de 35.87 ± 2.38 kpb (tableau 3.2).

Quatre individus sur 76 ou 5.3 % de la population C et sept individus sur 53 ou 13.2 % de la population I possèdent un patron de restriction *Bst EII* qui diffère du patron de restriction *Bst EII* « normal ». Ces individus possèdent un fragment de restriction additionnel de 2.50 kpb. Le patron de restriction *Bst EII* de ces individus est dit « anormal » (figure 3.2 et tableau 3.2). La variabilité dans le patron de restriction *Bst EII* nous donne une bonne indication du taux de variabilité de l'ADNmt des deux populations. Cette variabilité est assez basse et ne semble pas distinguer une population de l'autre ou la provenance d'une région géographique de l'autre. Si nous combinons tous les échantillons (76 pour C et 53 pour I), on peut déterminer une variabilité de l'ADNmt pour ces 129 individus de 8.5 %. C'est-à-dire, seulement 8.5 % des individus ont un patron de restriction *Bst EII* qui diffère du patron « normal ». Le grand nombre d'individus (91.5 %) ayant le patron de restriction de *Bst EII* « normal » assure l'importance d'établir une carte de restriction pour les individus possédant ce patron *Bst EII*.

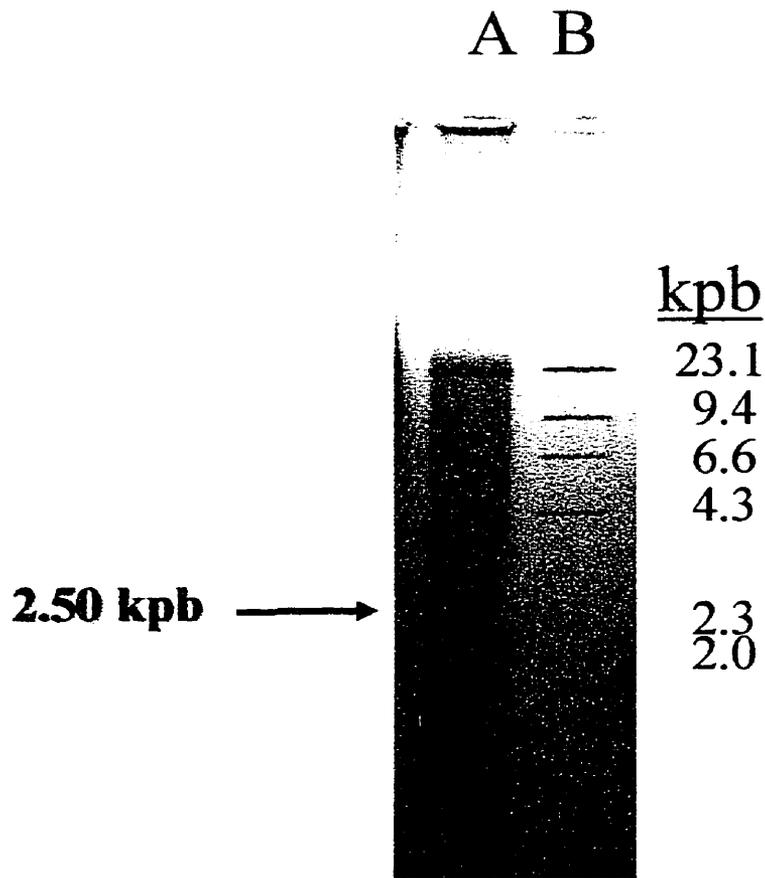


Figure 3.2 : Patron de restriction *Bst EII* « anormal » de l'ADNmt de *Spisula solidissima*. La voie A représente le patron de restriction *Bst EII* avec le fragment 2.50 kpb et la voie B représente le marqueur (l'ADN du phage λ digéré avec l'enzyme de restriction *Hind III*).

3.3 Carte de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima*

3.3.1 Établissement d'une carte de restriction

Afin d'établir la carte de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima*, trois digestions simples par les endonucléases de restriction *Bst EII*, *Bam HI* et *Bgl I*, ainsi que trois digestions doubles *Bam HI/Bst EII* (se lit *Bam HI* suivi de *Bst EII*), *Bam HI/Bgl I* et *Bst EII/Bgl I* ont été faites sur un échantillon de l'ADNmt provenant d'un individu. Les profils de restriction des trois digestions simples se trouvent à la figure 3.3 et les profils de restriction des trois digestions doubles se trouvent à la figure 3.4. Le tableau 3.3 donne les longueurs de tous les fragments de restriction provenant des digestions simples et des digestions doubles. La carte de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima* établie d'après les résultats obtenus (tableau 3.3) se trouve à la figure 3.5. Cette carte contient 18 sites de restriction et elle démontre l'emplacement relatif d'un site de restriction par rapport à un autre site de restriction. Le gros fragment de restriction *Bgl I* est de 18.03 kpb (tableau 3.3), ce qui veut dire que le fragment de restriction *Bst EII* de 2.04 kpb est répété 6 fois (6 copies en tandem) (Arsenault, 1989). La taille totale de la molécule de l'ADNmt, selon cette partie de l'étude, est de 35.80 ± 2.55 kpb (taille moyenne; tableau 3.3). Le fragment de restriction *Bam HI* de 0.9 kpb (tableau 3.3) n'est pas visible sur l'autoradiographie (figure 3.3), mais son existence a été démontrée par le clonage (section 3.3). Pour que la taille de l'ADNmt ne soit pas faussée, il a fallu ajouter un fragment de 4.20 kpb dans la digestion double *Bgl I/Bst EII*. Ce fragment de restriction n'est pas visible dans l'autoradiographie à la figure 3.4, peut être à cause la quantité d'ADN de ce fragment (l'intensité de la bande), dans ce cas ici, est

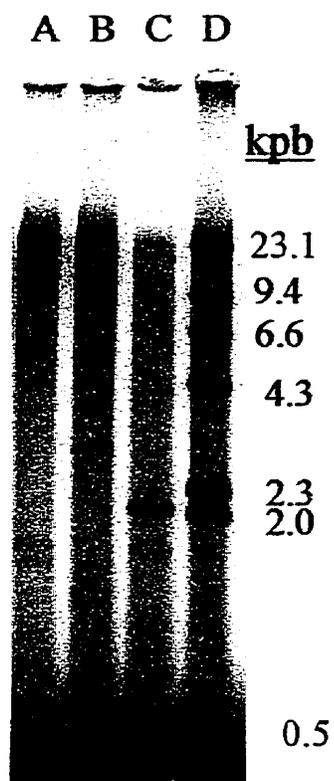


Figure 3.3: Patrons de restriction des digestions simples de l'ADNmt de *Spisula solidissima*. La voie A représente le patron de restriction *Bgl I*, la voie B représente le patron de restriction *Bam HI*, la voie C représente le patron de restriction *Bst EII* et la voie D représente le marqueur (l'ADN du phage λ digéré avec l'enzyme de restriction *Hind III*).

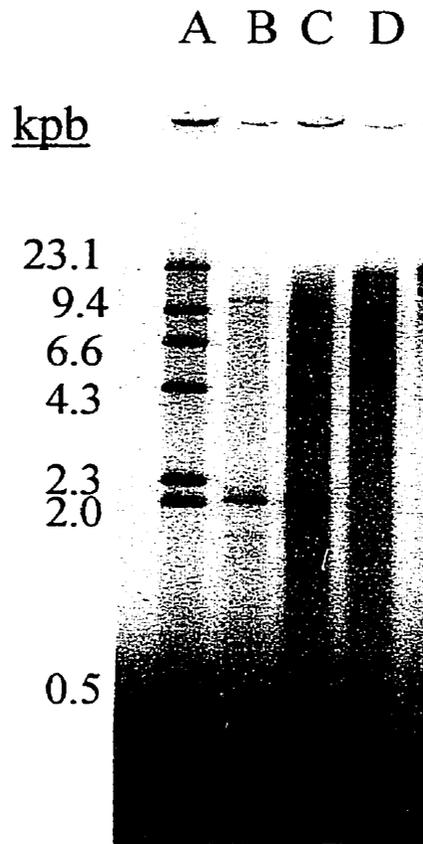


Figure 3.4: Patrons de restriction des digestions doubles de l'ADNmt de *Spisula solidissima*. La voie A représente le marqueur (l'ADN du phage λ digéré avec l'enzyme de restriction *Hind III*), la voie B représente le patron de restriction *Bgl I/Bst EII*, la voie C représente le le patron de restriction *Bam HI/Bst EII* et la voie D représente le patron de restriction *Bam HI/Bgl I*.

Tableau 3.3: Longueurs des fragments de restriction de restriction des digestions simples *Bst* I/II, *Bgl* I et *Bam* HI et des digestions doubles *Bam* HI/*Bgl* I, *Bam* HI/*Bst* EII et *Bgl* I/*Bst* EII de l'ADNmt de *Spisula solidissima*...

<u>Digestions simples</u>				<u>Digestions doubles</u>		
<u><i>Bst</i> EII</u> (kpb)	<u><i>Bam</i> HI</u> (kpb)	<u><i>Bgl</i> I</u> (kpb)	<u><i>Bam</i> HI/<i>Bgl</i> I</u> (kpb)	<u><i>Bam</i> HI/<i>Bst</i> EII</u> (kpb)	<u><i>Bgl</i> I/<i>Bst</i> EII</u> (kpb)	
17.98 ± 2.02	18.34 ± 2.03	18.03 ± 2.03	18.00 ± 2.02	12.61 ± 1.09	12.98* ± 1.09	
4.07 ± 0.09	12.62 ± 1.09	14.42 ± 1.10	9.30 ± 1.08	4.10 ± 0.09	4.20 ± 0.08	
2.04* ± 0.04	2.91 ± 0.05	1.62 ± 0.04	2.91 ± 0.05	2.04* ± 0.04	2.30 ± 0.05	
1.60 ± 0.03	1.31 ± 0.04	1.51 ± 0.04	1.61 ± 0.04	1.91 ± 0.04	2.04* ± 0.04	
	0.90 ± 0.01		1.50 ± 0.04	1.62 ± 0.04	1.61 ± 0.04 (x3)	
			1.31 ± 0.04	1.31 ± 0.03(x2)	1.51 ± 0.04	
			0.90 ± 0.01	0.90 ± 0.01		
35.89 ± 2.38	36.08 ± 3.22	35.58 ± 3.21	35.53 ± 3.28	36.00 ± 1.57	35.69** ± 1.62	
Taille de l'ADNmt en moyenne: 35.80 ± 2.55 kpb						

♦ fragment répété en tandem; 6 copies

* longueur ajustée à 10.61 ± 1.09 kpb

** taille de l'ADNmt calculée utilisant 10.61 ± 1.09 kpb (longueur ajustée)

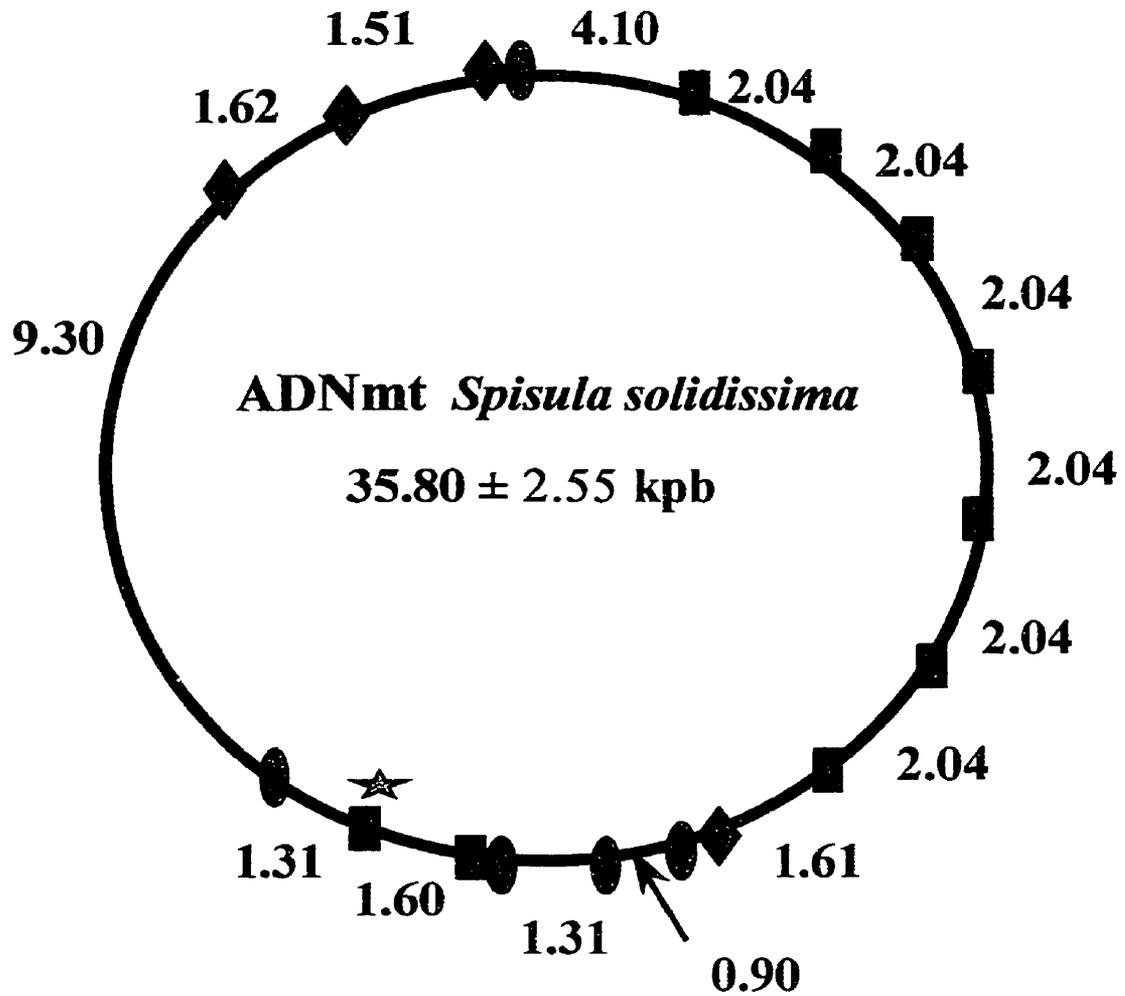


Figure 3.5 : Carte de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima*. Les sites de restriction *Bam* *HI* sont représentés par ●, les sites de restriction *Bst* *EII* sont représentés par ■ et les sites de restriction *Bgl* *I* sont représentés par ◆. Le symbole ☆ représente le site de restriction *Bst* *EII* qui n'a pas coupé lors de la digestion double *Bgl* *I*/*Bst* *EII*. Les longueurs des fragments de restriction sont indiquées en kpb.

trop faible et impossible de déceler par rapport au bruit de fond de l'autoradiographie. Mais il est présent dans plusieurs des autres autoradiographies obtenues pour des digestions doubles *Bgl I Bst EII* (exemple: figure 3.6). Il a fallu supposer qu'il existe deux fragments de restriction de 1.3 kpb différents générés par la digestion double *Bam HI/Bst EII* et trois fragments de restriction de 1.6 kpb différents générés par la digestion double *Bgl I/Bst EII*. De plus, pour faire coïncider tous les sites de restriction dans la carte de restriction établie, la taille du fragment *Bgl I/Bst EII* de 12.98 kpb a été ajustée à 10.61 kpb telle qu'indiquée à la figure 3.5 et au tableau 3.3. On suppose que le site de restriction *Bst EII* indiqué par une étoile à la figure 3.5 n'a pas coupé probablement à cause des raisons exposées à la section 3.1.3 et c'est pourquoi, la taille du fragment de restriction a été ajustée. Les petits fragments, de taille inférieure à 0.5 kpb, n'ont pas pu être détectés par la méthode utilisée. Les montants très faibles d'ADNmt par individu (section 3.1.2) empêchent la réplication des digestions enzymatiques avec la même préparation d'ADNmt mais dans des conditions expérimentales différentes.

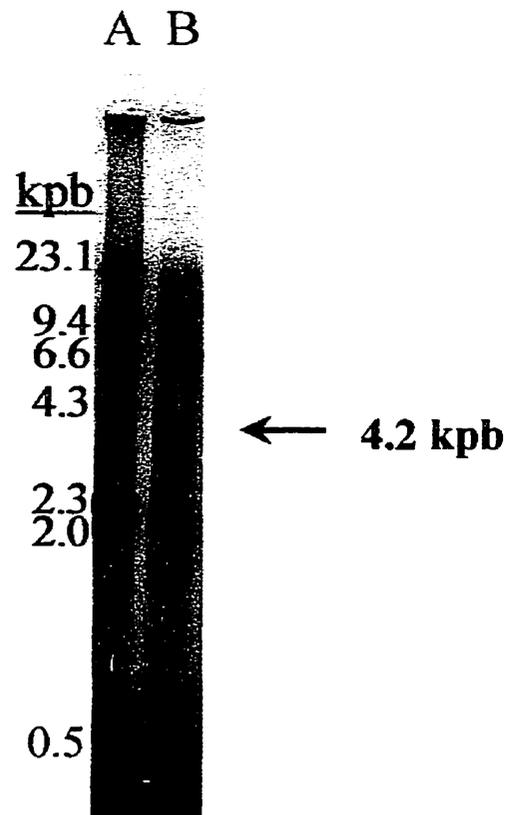


Figure 3.6 : Patron de restriction d'une digestion double *Bgl I/Bst EII* démontrant le fragment de restriction à 4.2 kpb. (voie B). La voie A représente le marqueur (ADN du phage λ digéré avec l'enzyme de restriction *Hind III*).

3.3.2 Incertitudes dans la carte de restriction établie

Il existe des incertitudes de l'emplacement quant à quelques sites de restriction sur la carte de restriction établie à la section 3.2.1. La figure 3.7 démontre ces incertitudes. La première incertitude, identifiée I-1 (pour incertitude numéro 1), implique un site de restriction *Bgl I* et un site de restriction *Bam HI*. La deuxième incertitude, I-2, implique un site de restriction *Bgl I* et un site de restriction *Bam HI*. La troisième incertitude, I-3, implique un site de restriction *Bam HI* et un site de restriction *Bst EII*. L'emplacement de ces sites de restriction, l'un par rapport à l'autre, peut être inversé sans pour autant déranger les autres sites de restriction dans la carte de restriction. La quatrième incertitude, I-4, implique deux sites *Bst EII* et la cinquième incertitude, I-5, implique deux sites de restriction *Bgl I*. Dans ces deux cas, l'ordre des sites de restriction peut être interchangée ce qui changerait la position du fragment *Bst EII* de 0.90 par rapport au fragment *Bst EII* de 1.31 (I-4) et changerait la position du fragment *Bgl I* de 1.62 par rapport au fragment *Bgl I* de 1.51 (I-5).

3.4 Clonage de certains fragments de restriction *Bam HI*

L'ADNmt de *Spisula solidissima*, digéré avec l'endonucléase de restriction *Bam HI*, génère cinq fragments de restriction: 18.3 kpb, 12.6 kpb, 2.9 kpb, 1.3 kpb et 0.9 kpb (tableau 3.3). Tous les fragments de restriction *Bam HI* ont été mis en présence du vecteur, le plasmide pBluescript® de 3.0 kpb, préalablement linéarisé avec l'endonucléase de restriction *Bam HI*. Les plasmides recombinés, c'est-à-dire les plasmides ayant reçu des inserts de l'ADNmt de *Spisula solidissima* ont été

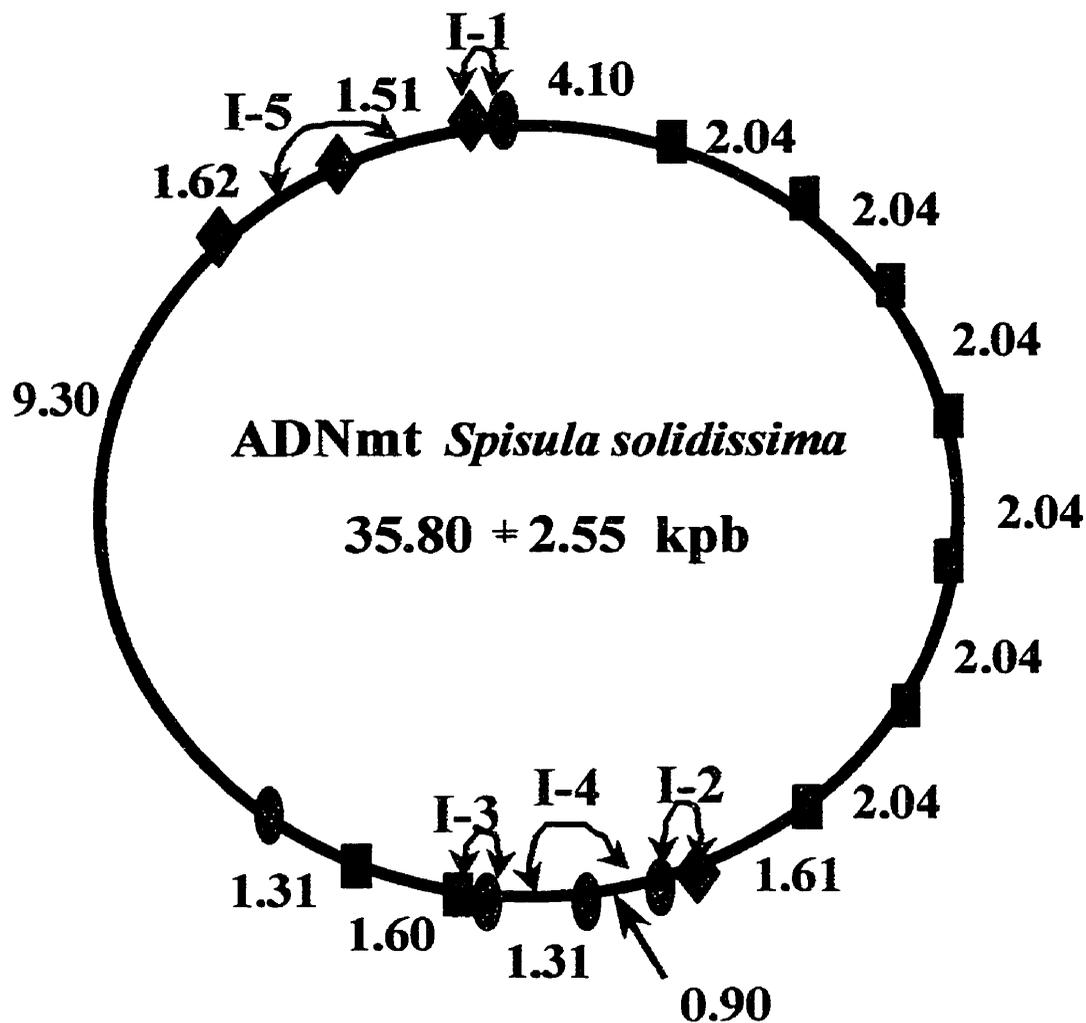


Figure 3.7 : Incertitudes des sites de restriction dans la carte de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima*. Les incertitudes sont identifiées I-1, I-2, I-3, I-4 et I-5. Les sites de restriction Bam HI sont représentés par ●, les sites de restriction Bst EII sont représentés par ■ et les sites de restriction Bgl I sont représentés par ◆. Les longueurs des fragments de restriction sont indiquées en kpb.

digérés avec l'endonucléase de restriction *Bam HI* et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose afin de séparer les inserts de l'ADNmt (fragments de restriction *Bam HI*) des plasmides. Les résultats du clonage se trouvent à la figure 3.8. D'après la photo du gel d'agarose (figure 3.8), seulement trois des cinq fragments de restriction *Bam HI* (le fragment de 0.9 kpb, le fragment de 1.3 kpb et le fragment de 2.9 kpb), ont pu être clonés dans le plasmide pBluescript®.

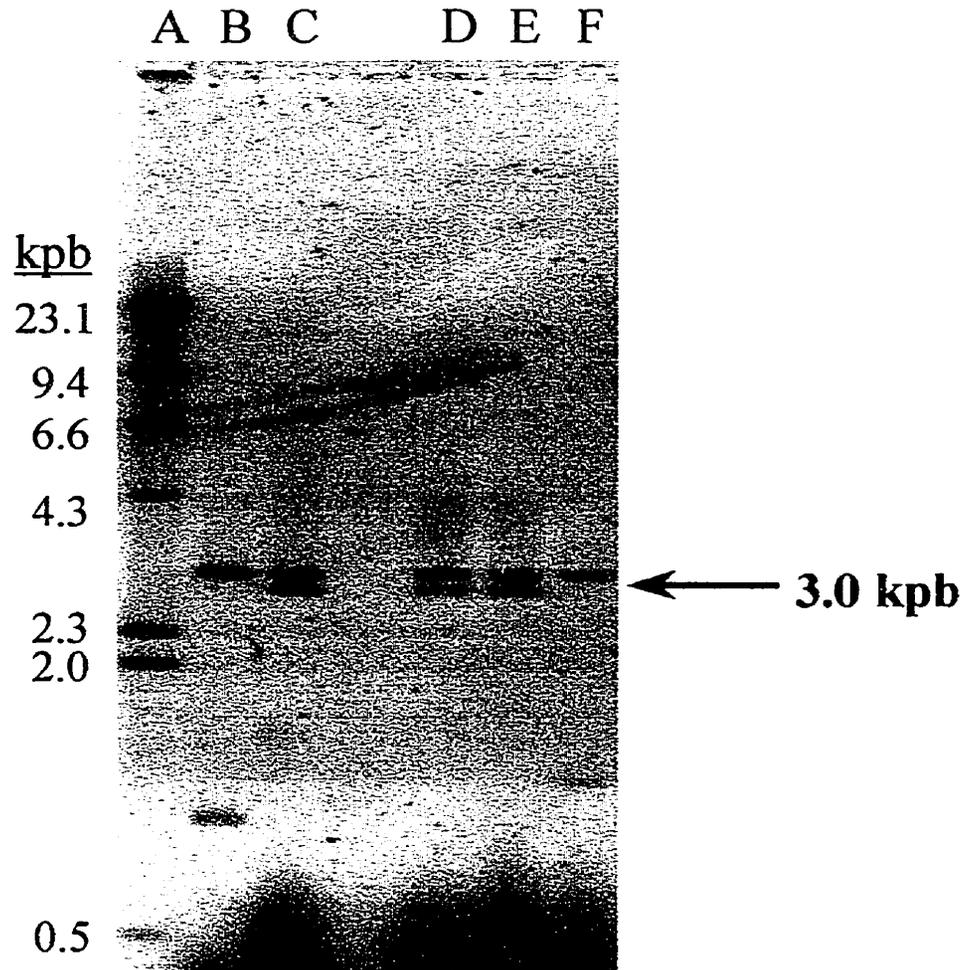


Figure 3.8 : Les plasmides recombinés coupés avec l'enzyme de restriction *Bam HI*. La voie A représente le marqueur (ADN du phage λ coupé avec *Hind III*), la voie B représente le plasmide linéarisé (3.0 kpb) et un fragment de 0.9 kpb, la voie C, D et E représentent un plasmide linéarisé et un fragment de 2.9 kpb et la voie F représente un plasmide linéarisé et un fragment de 1.3 kpb.

4.0 DISCUSSION

4.1 L'isolation et l'analyse de l'ADNmt de *Spisula solidissima*

L'objectif premier de cette recherche était de poursuivre l'étude de l'ADNmt de la palourde de dune, *Spisula solidissima*, commencée par J.Arsenault (1989). Arsenault a découvert pour la première fois l'existence du fragment répété en tandem de 2.0 kpb de l'ADNmt de *Spisula solidissima* mais, parce que le but de sa recherche était d'étudier l'ADNmt de plusieurs différentes espèces, elle n'a pas approfondie l'étude de l'ADNmt de *Spisula solidissima*. Le présent travail approfondi l'étude de cet ADN et, en plus, établit pour la première fois une carte de restriction de cette molécule d'ADNmt.

L'isolation de l'ADNmt de *Spisula solidissima* comporte plusieurs problématiques. Premièrement, des préparations d'ADNmt sans déchets ayant des molécules d'ADNmt pouvant être coupées par les endonucléases de restriction se font seulement à partir des muscles adducteurs. Les déchets qui affectent la pureté de ces préparations sont probablement des restants de tissus ou des débris cellulaires (lipides, protéines, etc.) qui ont persistés tout au long de l'isolation et la purification de l'ADNmt. Deuxièmement, la quantité d'ADNmt isolée par individu est très faible, de l'ordre de 10 à 20 ng d'ADNmt par échantillon. Ceci a causé des difficultés opérationnelles lors des digestions simples et doubles par les endonucléases de restriction dans l'établissement de la carte de restriction parce que tout l'ADNmt d'un échantillon a dû être utilisé pour l'essai. Par conséquent, ce n'était pas possible de faire un autre essai en variant des conditions de digestion ou d'électrophorèse. Enfin, l'impureté des préparations d'ADNmt est la raison la plus

probable pour l'inhabilité de plusieurs endonucléases de restriction de couper l'ADNmt de *Spisula solidissima* (section 3.1.3). La présence d'impuretés tels que des débris cellulaires, des protéines, des lipides, des polysaccharides, des sels et même des résidus des produits chimiques utilisés (l'EDTA, SDS, etc.) restants après l'isolation et la purification de l'ADNmt inhibe partiellement ou totalement l'activité des enzymes de restriction (Davis *et al.*, 1994 et Sambrook *et al.*, 1989). Les problématiques d'isolation et purification de l'ADNmt de bivalves ne sont pas uniques à ce laboratoire. Blot *et al.* (1990) ont eu plusieurs des mêmes difficultés, une quantité faible d'ADNmt par individu (<1 µg d'ADN par animal) et la présence d'impuretés (des polysaccharides) qui inhibent l'activité des endonucléases lors de leur étude sur l'ADNmt des moules.

Même si les préparations d'ADNmt de *Spisula solidissima* contenaient des impuretés et que les quantités d'ADNmt étaient faibles, une carte de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima* a été établie.

4.2 La variabilité de l'ADNmt de *Spisula solidissima* des deux populations étudiées

L'un des objectifs de cette partie de l'étude était de vérifier si les patrons de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima* variaient selon la localité géographique d'où provenait l'animal comme c'est le cas pour *Placopecten magellanicus* (Ouellette, 1989). Les localités géographiques d'où provenait les animaux se distinguaient par des conditions environnementales, soit des courants d'eau différents. L'une des populations provenait du Détroit de Northumberland et

l'autre de French River (Ile du Prince Edward). L'autre objectif de cette partie était de vérifier si on pouvait distinguer les deux populations de par leurs patrons de restriction d'ADNmt seulement. Et ceci nous a amené à déterminer le pourcentage d'individus donnés ayant un patron de restriction semblable afin de voir jusqu'à quel point l'ADNmt de *S. solidissima* varie d'une population à une autre.

La plupart des individus (95% de la population de Cap Pelé et 87% de la population de l'Ile du Prince Edward) possèdent le même patron de restriction *Bst EII*. Donc, l'étude des deux différentes populations de *Spisula solidissima* a démontré la prépondérance d'une forme unique de l'ADNmt de cette espèce. Alors la variabilité du patron de restriction *Bst EII* d'ADNmt de cet espèce est assez basse et ne nous permet pas de distinguer les individus d'une population à l'autre ou d'une région géographique à l'autre. Ceci nous amènent à dire que les conditions environnementales ne semblent pas avoir un effet sur les patrons de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima* comme elles ont montré un effet sur l'ADNmt de *Placopecten magellanicus* (Ouellette, 1989).

Certains individus, ceux qui diffèrent du patron de restriction *Bst EII* normal, démontrent l'existence d'un fragment de restriction *Bst EII* à 2.5 kpb en surplus des fragments *Bst EII* habituellement trouvés dans l'ADNmt de cette espèce. D'après les résultats obtenus, on peut supposer que la présence d'un fragment de restriction en surplus est dû soit à une substitution, une délétion ou une addition de nucléotides dans l'ADNmt et que cet événement existe chez un petit nombre d'individus seulement. De plus, l'apparition du nouveau fragment de restriction *Bst EII* est un événement équilibré chez les deux populations étudiées, c'est-à-dire qu'il n'y a pas plus d'individus ayant un fragment de restriction *Bst EII* en surplus dans une

population que dans l'autre. Aussi, parce que le fragment de restriction *Bst EII* additionnel est de la même taille dans tous les individus observés, soit de 2.5 kpb, on pourrait supposer une origine commune chez les deux populations étudiées.

Il serait intéressant d'étudier le nombre de copies du fragment répété que possède chaque individu d'une population quelconque. Les recherches rapportées par J. Arsenault en 1989 ont démontré que le patron de restriction *Bgl I* de l'ADNmt de *Spisula solidissima* donne une estimation du nombre de copies du fragment répété en tandem de 2.0 kpb. Le plus gros des fragments *Bgl I* possède les fragments répétés en tandem, alors sa taille détermine le nombre de copies du fragment répété en tandem. Une taille d'environ 18 kpb pour ce fragment *Bgl I* représente 6 copies du fragment répété en tandem. Elle a trouvé que le nombre de copies du fragment répété était généralement de 6 (Arsenault, 1989). Les résultats de cette thèse appuient les résultats de J. Arsenault et semblent démontrer que la plupart des individus testés ont six copies du fragment répété en tandem, c'est-à-dire que la plupart des individus testés ont un fragment de restriction *Bgl I* d'environ 18 kpb (voir tableaux 3.3). Il faut cependant noter que nos individus n'ont pas tous été testés.

4.3 La carte de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima*

Une carte de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima* a été établie, pour la première fois, en utilisant trois endonucléases de restriction (*Bam HI*, *Bst EII* et *Bgl I*). Il existe quelques incertitudes entourant cette carte de restriction. D'après la méthode utilisée pour marquer et séparer les fragments de restriction obtenus par les

digestions simples et les digestions doubles, il n'était pas possible d'identifier les fragments de restriction de taille inférieure à 0.5 kpb. L'identification de ces petits fragments de restriction aurait probablement éclairci quelques unes des incertitudes dans l'emplacement de certains sites de restriction. Mais, ça prenait toute une préparation d'ADNmt d'un individu (10-20 ng d'ADNmt) pour une série de digestions enzymatiques simple et double. Par conséquent, c'était impossible de reprendre les digestions aux endonucléases de restriction afin de modifier les conditions électrophorétiques pour identifier les petits fragments.

Les études récentes de l'ADNmt de *Spisula solidissima* démontrent, en examinant l'ADN cloné, qu'il y a un site de restriction *Bst EII* dans le fragment *Bam HI* de 2.9 kpb confirmant ainsi la carte. De plus, la position du site de restriction *Bam HI* par rapport au site *Bst II* (voir I-3 figure 3.7) doit être interchangée sur la carte de restriction (Belliveau, 1997).

Une autre méthode pour élucider l'emplacement incertain de certains sites de restriction serait la digestion « du type stratégique ». Par exemple, on pourrait digérer le fragment de restriction *Bam HI* de 1.3 kpb, préalablement isolé, avec l'endonucléase de restriction *Bst EII*. Si le fragment de restriction *Bam HI* de 1.3 kpb est coupé par *Bst EII*, le site de restriction *Bst EII* se trouve dans le fragment de restriction *Bam HI* de 1.3 kpb. De même, on pourrait éclaircir les autres régions incertaines dans la carte de restriction.

Il se peut que d'autres endonucléases de restriction coupent l'ADNmt de *Spisula solidissima*. Avec la multitude d'endonucléases de restriction disponibles aujourd'hui ainsi que les coûts très élevés de ces enzymes, c'était impossible de

tester tous les endonucléases. Une quinzaine d'endonucléases de restriction choisies à cause de leurs sites de reconnaissances, ont été testés. La découverte d'autres endonucléases de restriction coupant la molécule de l'ADNmt de *Spisula solidissima*, en plus de *Bam HI*, *Bgl I* et *Bst EII*, améliorerait la carte de restriction établie et faciliterait peut-être le clonage des fragments de l'ADNmt qui n'ont pas pu être clonés par la méthode utilisée dans cette recherche (section 3.4).

Pour terminer cette partie, c'est possible de voir que, même avec tous les problématiques de la méthode d'isolation et purification d'ADNmt de *Spisula solidissima*, nous avons quand même établi, pour la première fois, une carte de restriction de son ADNmt. Cette carte de restriction sera indispensable aux recherches futures sur cette molécule d'ADN. De plus, les problématiques de la méthode qui sont toujours présentes, démontrent l'importance de cloner cet ADNmt et d'en produire en quantité suffisante pour permettre l'étude approfondie du fragment répété en tandem que notre laboratoire tente d'entreprendre.

4.4 Le clonage de certains fragments de restriction *Bam HI* de l'ADNmt de *Spisula solidissima*

L'objectif de cette partie de la recherche consiste à mettre sur pied un protocole de clonage qui permettra le clonage, ou tout au moins un début de clonage, de l'ADNmt de *Spisula solidissima* et ceci pour la première fois. D'après les résultats obtenus pour le clonage de l'ADNmt de *Spisula solidissima*, trois fragments de restriction *Bam HI* (0.9 kpb, 1.3 kpb et 2.9 kpb) ont pu être clonés dans le vecteur pBluescript®. Les fragments *Bam HI* de 12.6 kpb et de 18.3 kpb n'ont pas pu être clonés. Les fragments de restriction de 12.6 kpb et 18.3 kpb

dépassent la capacité de clonage du vecteur qui est de deux à trois fois sa taille, soit de six à neuf kpb (Stratagene, 1993). Le clonage du fragment de restriction *Bam* HI de 12.6 kpb aurait été possible avec ce plasmide car il ne dépasse pas beaucoup la capacité de clonage du vecteur, mais le fragment de restriction *Bam* HI de 18.3 kpb, à cause de sa taille, n'avait qu'une très petite chance d'être cloné. Toutefois, les trois fragments de restriction *Bam* HI qui ont été clonés pourraient servir comme amorce pour l'amplification PCR (réaction en chaîne de la polymérase) de l'ADNmt de cet organisme (Davis *et al.*, 1994), permettant ainsi le séquençage du fragment répétitif.

L'efficacité de clonage des trois autres fragments de restriction *Bam* HI n'était pas élevée (une colonie recombinée (avec insert) sur 10^5 colonies non-recombinées (sans insert)) même si les cellules étaient à des niveaux de compétence acceptables selon la méthode utilisée pour rendre les cellules compétentes (section 2.5.3). L'efficacité de clonage pourrait être améliorée en ajustant la quantité de l'ADNmt (fragments de restriction *Bam* HI) par rapport à la quantité d'ADN du plasmide. D'après Sambrook *et al.* (1989), le rapport molaire d'ADN étranger à l'ADN du plasmide devrait être de deux à un pour une efficacité de clonage élevée. Puisque la quantité de l'ADNmt (estimée de 10 à 20 ng) n'a pas pu être déterminée avec précision, le rapport de l'ADN étranger à l'ADN du plasmide utilisé n'a probablement pas été respecté avec précision.

La méthode de clonage utilisée, soit celle des extrémités cohésives en surplomb identiques entre l'ADN étranger et l'ADN du plasmide (dans notre cas des bouts *Bam* HI), requiert un traitement à la phosphatase du plasmide linéarisé avant l'ajout de l'ADN étranger (les fragments *Bam* HI) afin d'augmenter l'efficacité de

clonage (Sambrook *et al.*, 1989). Le traitement à la phosphatase empêche la recircularisation du plasmide linéarisé en enlevant les groupes phosphates aux bouts 5' des extrémités cohésives en surplomb de l'ADN du plasmide. L'ADN ligase ne peut pas catalyser la formation du lien phosphodiester entre des nucléotides adjacents si le nucléotide au bout 5' ne possède pas un phosphate. Ceci empêche la recircularisation du plasmide et augmente la chance de transformation du plasmide avec l'ADN étranger qui possède des groupes phosphates aux bouts 5'. Dans notre cas, les plasmides pBluescript® linéarisés avec l'endonucléase de restriction *Bam HI* n'ont pas subi le traitement à la phosphatase et ceci a sans doute diminué l'efficacité de clonage.

D'après la carte de restriction établie à la section 3.2, le fragment répété en tandem de 2.0 kpb se trouve à l'intérieur du fragment de restriction *Bam HI* de 18.3 kpb. Ce fragment de restriction *Bam HI* n'a pas pu être cloné par la méthode de clonage utilisée. Par conséquent, on n'a pas pu cloner, cette fois, le fragment répété en tandem de *Spisula solidissima*. Le clonage du fragment répété en tandem aurait permis la production de ce fragment en grosse quantité, ce qui aurait aidé au séquençage éventuel de ce fragment afin de permettre une comparaison avec les séquences répétées en tandem chez *Placopecten magellanicus* (Snyder *et al.*, 1987) et chez *Pecten maximus* (Rigaa *et al.*, 1995).

Différentes méthodes de clonage devront être essayées afin de cloner le fragment répété. Une des méthodes est le clonage aux extrémités francs. Cette méthode implique la digestion de l'ADNmt de *Spisula solidissima* avec l'endonucléase de restriction *Bst EII* pour ainsi séparer les fragments répétés en

tandem l'un de l'autre, le rabatement des extrémités cohésives en surplomb générées par *Bst EII* et l'insertion du fragment dans un plasmide linéarisé avec un endonucléase de restriction générant des bouts francs (Sambrook *et al.*, 1989). Cette méthode, simple à expliquer, donne un rendement très bas si certaines conditions de réaction ne sont pas satisfaites. Elle nécessite une grande quantité de l'ADN étranger (ADNmt), de l'ADN du plasmide, de l'ADN ligase (cinq à dix fois plus que pour le clonage aux extrémités cohésives en surplomb identiques) et la présence d'agent condensant, soit du polyéthylène glycol (PEG 8000) ou du chlorure d'hexaminecobalt (Sambrook *et al.*, 1989).

4.5 Perspectives et conclusion

Cette recherche était une suite des travaux commencés par J. Arsenault (1989). Arsenault (1989) avait découvert que la taille atypique de l'ADNmt de *Spisula solidissima* était causée par la présence d'un fragment répété en tandem de 2.0 kpb. De plus, elle avait trouvé deux endonucléases de restriction qui pouvaient couper cet ADNmt et elle avait placé les sites de coupures de ces enzymes, obtenus par des digestions simples seulement, sur une carte de restriction hypothétique de l'ADNmt de *S. solidissima*. Notre recherche avait comme objectif d'étudier et d'approfondir nos connaissances de l'ADNmt de taille atypique de *Spisula solidissima*. Tout d'abord, nous avons examiné le taux de variabilité de cet ADNmt en étudiant les patrons de restriction de l'ADNmt provenant d'individus de régions géographiques distinctes. Ensuite, nous avons établi une carte de restriction de cet ADNmt par l'entremise des digestions simples et doubles par trois endonucléases

de restriction. Finalement, nous avons développé et évalué une méthode explorant le clonage éventuel du fragment répétitif de *Spisula solidissima*.

La carte de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima*, établie pour la première fois, sera indispensable pour le clonage et le séquençage éventuel du fragment répété en tandem de l'ADNmt de cet animal. Les clones de certains fragments de l'ADNmt de *S. solidissima*, obtenues par les premiers essais de clonage, pourront servir à l'analyse détaillée de la séquence d'ADNmt de *S. solidissima* et pourront servir d'amorce pour l'amplification PCR (réaction en chaîne de la polymérase) de l'ADNmt de cet organisme.

L'objectif ultime de la recherche sur l'ADNmt de *Spisula solidissima* est le clonage et le séquençage de son fragment répété en tandem de 2.0 kpb afin de comparer cette séquence aux autres séquences de fragments répétés en tandem de *Placopecten magellanicus* et de *Pecten maximus*. Les deux séquences, celle de *P. magellanicus* et de *P. maximus*, ne démontrent aucune homologie au niveau de la séquence primaire, mais démontrent des structures secondaires comparables, soit des régions riches en A et T, des régions riches en G et des structures tige-boucle (Rigaa *et al.*, 1995; LaRoche *et al.*, 1990 et Rigaa *et al.*, 1993). Ces genres de structures secondaires ont démontré une importance dans le contrôle de la réplication et de la transcription des ADNmt (Cornuet *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1994; Monforte *et al.*, 1993; Stanton *et al.*, 1994 et Wolstenholme, 1992) et se trouvent souvent dans la région qu'on nomme la boucle-D chez les vertébrés (Dufresne *et al.*, 1996; Fumagalli *et al.*, 1996; Ishida *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995 et Marshall *et al.*, 1997) et dans une région « contrôle » chez les invertébrés (Zhang *et al.*, 1995).

La séquence du fragment répété en tandem de *Spisula solidissima* comporte-t-elle des structures secondaires semblables à celles des fragments répétés en tandem de *P. magellanicus* et de *P. maximus*? La réponse à cette question exigera le séquençage de ce fragment répété en tandem. La carte de restriction établie dans cette recherche ainsi que les fragments de l'ADNmt clonés aideront certainement le clonage éventuel du fragment répété en tandem.

RÉFÉRENCES

- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. et Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* 290: 457-465.
- Arsenault, J. (1989) Extraction et caractérisation partielle de l'ADN mitochondrial de diverses espèces de mollusques du Nouveau-Brunswick. Thèse de Maîtrise. Université de Moncton, Moncton.
- Attardi, G. (1985) Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic Economy, *Int. Rev. Cytol.* 93: 93-145.
- Avise, J.C. et Lansman, R.A. (1983) Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals dans *Evolution of Genes and Proteins*, ed M. Nei et R.K. Koehn, Sinauer, Massachusetts, pp.147-164.
- Belliveau, M. (1997) Confirmation d'une carte de restriction de l'ADNmt de *Spisula solidissima*. Mémoire sous-graduée. Université de Moncton.
- Bendich, A.J. (1993) Reaching for the ring : The study of mitochondrial genome Structure, *Curr. Genet.* 24 : 279-290.
- Blot, M., Legendre, B. et Albert, P. (1990) Restriction fragment length polymorphism of mitochondrial DNA in subantarctic mussels, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 141 : 79-86.
- Boyce, T.M., Zwick, M.E. et Aquadro, C.F. (1989) Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy, *Genetics.* 123: 825-836.
- Brown, W. M. (1983) Evolution of animal mitochondrial DNA dans *Evolution of Genes and Proteins*, ed M. Nei et R.K. Koehn, Sinauer, Massachusetts, pp. 63-88.
- Clayton, D.A. (1984) Transcription of the mammalian mitochondrial genome, *Ann. Rev. Biochem.* 53: 573-594.

- Cornuet, J.-M., L. Garnery et M. Solignac (1991) Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA, *Genetics* 1128: 393-403.
- Crotty, S (editor). (1996) Structure and function of organelles. [En ligne]. Disponible : <http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/cb/org/mito.gif>
- Davis, L., Kuehl, M. et Battey, J. (1994) Basic methods in molecular biology, 2^{éd}, Appleton & Lange, Connecticut.
- Dufresne, C., F. Mignotte et M. Guéride (1996) The presence of tandem repeats and the initiation of replication in rabbit mitochondrial DNA, *Eur. J. Biochem.* 235: 593-600.
- Fumagalli, L., P. Taberlet, L. Favre et J. Hausser (1996) Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of Shrews, *Mol. Biol. Evol.* 13(1): 31-46.
- Gach, M.H. et Reimchen, T.E. (1989) Mitochondrial DNA patterns among endemic stickleback from the Queen Charlotte Islands: a preliminary survey, *Can. J. Zool.* 67: 1324-1328.
- Ghivizzani, S.C., Mackay, S.L.D., Madsen, C.S., Laipis, P.J. et Hauswirth, W.W. (1993) Transcribed heteroplasmic repeated sequence in the porcine mitochondrial DNA D-loop region, *J. Mol. Evol.* 37 : 36-47.
- Gjetvaj, B., Cook, D.I. et Zouros, E. (1992) Repeated sequences and large-scale size variation of mitochondrial DNA: a common feature among scallops (Bivalvia: Pectinidae), *Mol. Biol. Evol.* 9: 106-124.
- Gibco BLR (995) FAQs for Molecular Weight Standards and Nucleic Acids. [En ligne]. Disponible : http://www2.lifetech.com/catalog/techline/molecular_biology/faqs/marks.html
- Goldberg, R. (1989) Biology and Culture of the Surf Clam dans *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, volume 19. ed J.J. Manzi et Cantagna, M., Elsevier, New York, pp. 263-276.

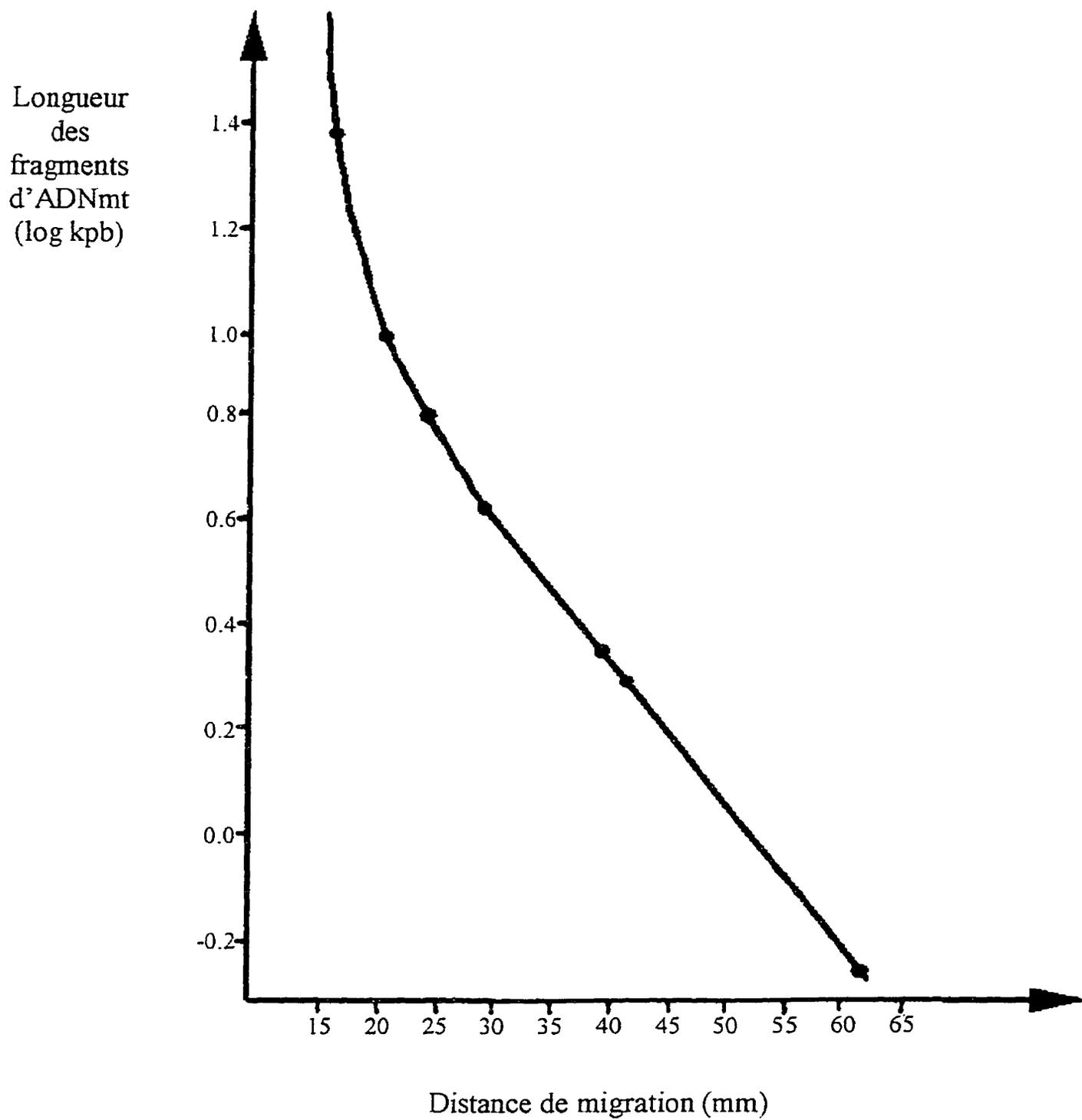
- Hoffman, R. J., Boore, J.L. et Brown, W.M. (1992) A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*, *Genetics* 131 : 397-412.
- Ishida, N., T. Hasegawa, K. Takeda, M. Sakagami, A. Onishi, S. Inumaru, M. Komatsu et H. Mukoyama. (1994) Ploymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA, *Animal genetics* 25: 215-221.
- Kleinsmith, L.J. et Kish, W.M. (1995) *Principles of Cell and Molecular Biology*, 2 éd, Harper Collins College Publishers, New York.
- Lansman, R.A., R.O. Shade, J.F. Shapira et J.C. Avise (1981) The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations, *J. Mol. Evol.* 17: 214-226.
- La Roche, J., M. Snyder, D.I. Cook, K. Fuller et E. Zouros (1990) Molecular characterization of a repeat element causing large-scale size variation in the mitochondrial DNA of the sea scallop *Placopecten magellanicus*, *Mol. Biol. Evol.* 7(1): 45-64.
- Lee, W.-J., J.Conroy, W. Huntinting Howell et T. D. Kocher (1995) Structure and evolution of telecost mitochondrial control regions, *J. Mol. Evol.* 41: 54-66.
- Lewis, D.L., C.L.Farr, A.L. Farquhar et L.S. Kaguni (1994) Sequence, organization, and evolution of the A + T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA, *Mol. Biol. Evol.* 11(3): 523-538.
- Marshall, H.D. et A.J. Baker (1997) Structural conservation and variation in the mitochondrial control region of Fringillene Finches (*Fringilla* spp.) and the Greenfinch (*Carduelis chloris*, *Mol. Biol. Evol.* 14(2): 173-184.
- Monforte, A., E. Barrio et A. Latorre (1993) Characterization of the length polymorphism in the A + T-Rich region of the *Drosophila obscura* group species, *J. Mol. Evol.* 36: 214-223.
- Morin, A. et Houseman, J. (1998) Biodidac. A bank of digital resources for teaching Biology. [En ligne]. Disponible : <http://biodidac.bio.uottawa.ca/>
- Moritz, C. et Brown, W.M. (1986) Tandem duplication of D-loop and ribosomal RNA sequences in lizard mitochondrial DNA, *Science* 233 : 1425-1427

- Moritz, C. et Brown, W.M. (1987) Tandem duplications in animal mitochondrial DNAs: variation in incidence and gene content, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7183-7187.
- Ouellette, R. (1989) Étude de la structure génétique des populations de pétoncle géant (*Placopecten magellanicus*) du sud du golfe du St-Laurent par analyse de l'ADNmt et des loci enzymatiques, Thèse de Maitrise. Université de Moncton, Moncton.
- Promega Catalogue (1997) Technical Reference. Promega Corp., É.-U., pp. 423-432.
- Promega (1997) Technical Bulletin #TB525 DNA Polymerase I Large (Klenow) fragment, Promega Corp., É.-U.
- Rand, D.M. (1993) Endotherms, Ectotherms, and mitochondrial genome-size variation, *J. Mol. Evol.* 37: 281-295.
- Rigaa, A., Y. Le Gal et D. Sellos (1993) Mapping and repeated sequence organization of mitochondrial DNA in scallop, *Pecten maximus*. *Mol. Marine Biol. Biot.* 2(4): 218-224.
- Rigaa, A., M. Monnerot et D. Sellos (1995) Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the repeated unit and flanking gene of the scallop *Pecten maximus* mitochondrial DNA: Putative replication origin features. *J. Mol. Evol.* 41: 189-195.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch et T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2^{éd.}, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Snyder, M., Fraser, A.R., LaRoche, J., Gartner-Kepkay, K.E. et Zouros, E. (1987) Atypical mitochondrial DNA from the deep-sea scallop *Placopecten magellanicus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7595-7599.
- Stanton, D.J., L.L. Daehler, C.C. Moritz et W.M. Brown (1994) Sequences with the potential to form stem-and-loop structures are associated with coding-region duplications in animal mitochondrial DNA, *Genetics* 137: 233-241.

- Stratagene, (1993) Catalogue (Annexe). Stratagene Cloning Systems, É.-U., pp. 12-14.
- Ullmann, A., F. Jacob et J. Monod (1967) Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -Galactosidase structural gene of *Escherichia coli*, J. Mol. Biol. 24: 339-343.
- Wolstenholme, D.R. (1992) Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution, Int. Rev. Cytol. 141: 173-215.
- Zevering, C.E., Moritz, C., Hiedman, A. et Sturm, R.A. (1991) Parallel origins of duplication and the formation of pseudogenes in mitochondrial DNA from parthenogenetic lizards (*Hatagonia binoei* ; Gekkonidae), J. Mol. Evol. 33 : 431-441.
- Zhang, D.-X., J.M. Szymura et G.M. Hewitt (1995) Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA, J. Mol. Evol. 40: 382-391.

ANNEXE A

Calcul de longueur (en kpb) des fragments de restriction de l'ADNmt



ANNEXE B

Génotype de la souche bactérienne *Escherichia coli* DH5 α (Sambrook *et al.*, 1992):

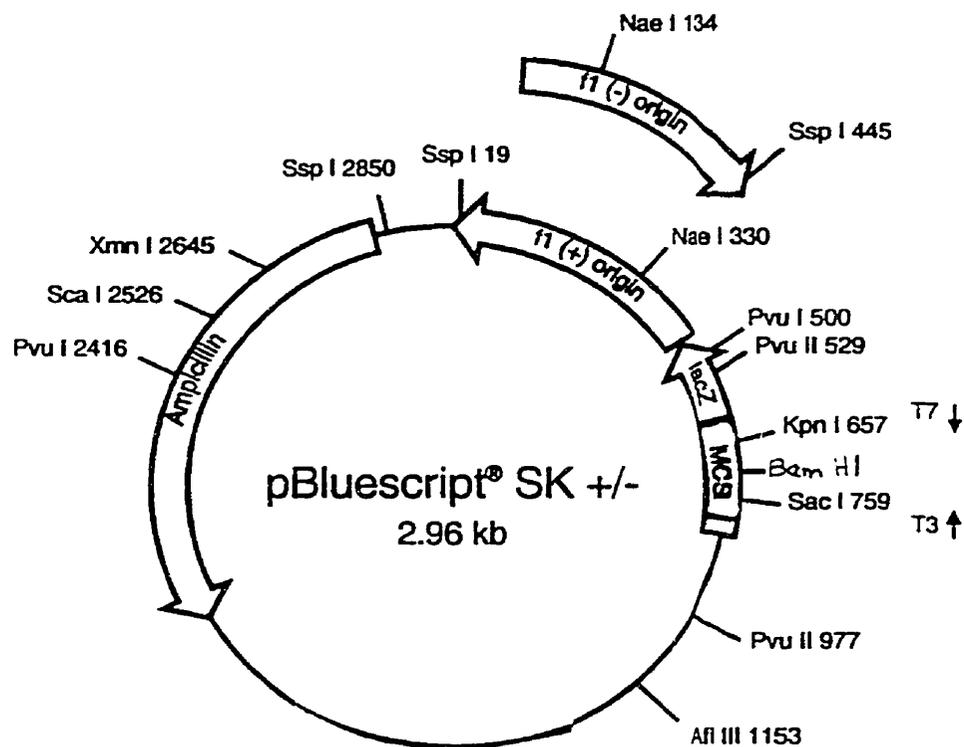
supE44 Δ lacU169(Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

Symbol	Description	Effet
<i>supE44</i>	mutation suppressive	mutation suppressive amber
<i>ΔlacU169(Φ80lacZΔM15)</i>	délétion partielle gène encodant β -galactosidase	permet la complem- entation- α
<i>hsdR17</i>	systèmes restriction et méthylation défectueux	permet clonage de l'ADN sans coupage par endonucléases de restriction endogènes
<i>recA1</i>	mutation recombinaison	empêche recombinaison entre l'ADN étranger et l'ADN de l'hôte
<i>endA1</i>	mutation endonucléase	améliore isolation des plasmides
<i>gyrA96</i>	mutation ADN gyrase	confère résistance à l'acide nalidixique ¹
<i>thi-1</i>	mutation métabolisme thiamine	exige thiamine dans milieu minimale de croissance
<i>relA1</i>	phénotype relaxé	permet synthèse des ARN sans synthèse des protéines

¹ Promega, 1997

ANNEXE C

Carte de restriction modifiée du plasmide pBluescript® SK+/- (Stratagene, 1993)



fl (+) origin et fl (-) origin = origines de répliation

lacZ = gène encodant β -galactosidase

MCS = site de multiclouage

Ampicillin = gène de résistance à l'ampicilline

ANNEXE D

Données brutes de l'analyse de l'ADNmt des individus de la population de Cap Pelé (C) et de la population de l'Ile du Prince Edward (I) digéré avec l'endonucléase de restriction *Bst EII*.

Légende

Pop = identification de la population (C= Cap Pelé et I = Ile du Prince Edward)

= numéro de l'individu et de l'échantillon

frag x

(kpb) = longueur du fragment de restriction x (en kilopairs de bases)

inc abs

du frag x = incertitude absolue sur la longueur du fragment de restriction x

int du

frag x = intensité du fragment de restriction

(FF = très fort, F= fort, M = moyen, f = faible, et ff = très faible)

sADNmt

(kpb) = \sum des fragments de restriction (sans tenir compte du fragment répété en tandem)

inc abs = incertitude absolue sur la somme des fragments de restriction

pv = pas (ou presque pas) visible sur la photo du gel d'agarose

Pop	#	frag 1 (kpb)	inc abs du frag 1	int du frag 1	frag 2 (kpb)	inc abs u frag 2	int du frag 2	frag 3 (kpb)	inc abs du frag 3	int du frag 3	frag 4 (kpb)	inc abs u frag 4	int du frag 4	frag 5 (kpb)	inc abs u frag 5	int du frag 5	s ADNmt (kpb)	inc abs de sADNmt
C	1	17.78	1.94	F	4.07	0.09	f				2.10	0.05	F	pv			23.95	2.08
C	2	17.78	1.94	F	4.17	0.10	f				2.09	0.04	F	pv			24.04	2.08
C	3	17.38	1.24	F	4.07	0.09	f				2.04	0.04	F	pv			23.49	1.37
C	4	17.38	1.24	F	4.12	0.10	f				2.09	0.04	F	pv			23.59	1.38
C	5	17.78	1.67	F	4.05	0.08	f				2.04	0.04	F	pv			23.87	1.79
C	6	18.00	2.02	F	4.07	0.09	f				2.09	0.04	F	1.55	0.02	M	25.71	2.17
C	7	17.78	1.67	F	4.17	0.10	M				2.04	0.04	F	1.58	0.03	f	25.57	1.84
C	8	17.38	1.24	F	4.07	0.09	M				2.04	0.04	F	1.55	0.02	f	25.04	1.39
C	9	17.38	1.24	f	4.07	0.09	f				2.04	0.04	f	pv			23.49	1.37
C	10	17.78	1.67	M	4.07	0.09	f				2.09	0.04	M	pv			23.94	1.80
C	11	18.00	2.02	F	4.17	0.10	F				2.12	0.05	F	1.58	0.03	f	25.87	2.20
C	12	17.78	1.94	F	4.07	0.09	F				2.12	0.05	F	1.55	0.02	f	25.52	2.10
C	13	17.38	1.24	F	4.07	0.09	M				2.09	0.04	F	1.58	0.03	f	25.12	1.40
C	14	18.00	2.02	M	4.17	0.10	f				2.12	0.05	F	1.55	0.03	f	25.84	2.20
C	15	17.78	1.94	F	4.07	0.09	M				2.10	0.05	F	pv			23.95	2.08
C	16	18.00	2.02	M	4.17	0.10	M				2.12	0.05	F	1.58	0.03	f	25.87	2.20
C	17	17.78	1.94	M	4.07	0.09	f				2.10	0.05	M	pv			23.95	2.08
C	18	17.85	1.95	M	4.17	0.10	f				2.12	0.05	M	pv			24.14	2.10
C	19	17.38	1.24	M	4.07	0.09	f				2.10	0.05	f	pv			23.55	1.38
C	20	17.38	1.24	M	4.17	0.10	f				2.12	0.05	M	pv			23.67	1.39
C	21	17.78	1.67	M	4.12	0.10	f				2.10	0.05	M	pv			24.00	1.82
C	22	18.09	2.03	F	4.07	0.09	F				2.09	0.04	F	1.58	0.03	f	25.83	2.19
C	23	17.78	1.94	F	4.17	0.10	M	2.45	0.06	f	2.10	0.05	F	1.55	0.03	f	28.05	2.18
C	24	17.98	2.02	F	4.17	0.10	M				2.09	0.04	F	pv			24.24	2.16
C	25	18.00	2.02	F	4.07	0.09	M				2.04	0.04	F	pv			24.11	2.15
C	26	16.90	1.24	F	3.98	0.08	M				2.00	0.02	F	pv			22.88	1.34
C	27	17.38	1.24	F	4.07	0.09	F				2.04	0.04	F	1.58	0.03	f	25.07	1.40
C	28	17.38	1.24	F	4.07	0.09	F	2.55	0.06	F	2.09	0.04	F	1.60	0.04	f	27.69	1.17

Pop	#	frag 1 (kpb)	inc abs du frag 1	int du frag 1	frag 2 (kpb)	inc abs u frag 2	int du frag 2	frag 3 (kpb)	inc abs du frag 3	int du frag 3	frag 4 (kpb)	inc abs u frag 4	int du frag 4	frag 5 (kpb)	inc abs u frag 5	int du frag 5	s ADNmt (kpb)	inc abs de sADNmt
C	29	17.78	1.67	F	4.17	0.10	M				2.09	0.04	F	pv			24.04	1.81
C	30	17.38	1.24	F	4.17	0.10	M				2.12	0.05	F	pv			23.67	1.39
C	31	17.38	1.24	F	4.07	0.09	M				2.04	0.04	F	1.55	0.02	f	25.04	1.39
C	32	17.38	1.24	F	4.17	0.10	M				2.09	0.04	F	pv			23.64	1.38
C	33	17.78	1.67	F	4.07	0.09	F				2.04	0.04	F	pv			23.89	1.80
C	34	18.20	3.24	F	4.07	0.09	M				2.04	0.04	F	pv			24.31	3.37
C	35	18.00	2.20	F	4.07	0.09	F				2.09	0.04	F	1.55	0.02	f	25.71	2.35
C	36	17.98	2.02	F	4.17	0.10	F				2.09	0.04	F	pv	0.03	f	24.24	2.19
C	37	17.38	1.25	M	4.07	0.09	M				2.10	0.05	F	pv			23.55	1.39
C	38	17.38	1.25	F	4.17	0.10	F				2.12	0.05	F	1.60	0.04	f	25.27	1.44
C	39	17.78	1.94	F	4.17	0.10	F				2.09	0.04	F	pv			24.04	2.08
C	40	18.20	3.25	M	4.12	0.10	M				2.04	0.04	F	1.62	0.04	f	25.98	3.43
C	41	16.99	1.23	F	4.00	0.08	M				2.04	0.04	F	pv			23.03	1.35
C	42	17.38	1.25	F	4.17	0.10	M				2.04	0.04	F	1.58	0.03	f	25.17	1.42
C	43	17.38	1.25	F	4.07	0.09	f				2.09	0.04	F	1.55	0.02	f	25.09	1.40
C	44	17.38	1.25	F	4.17	0.10	M				2.04	0.04	F	pv			23.59	1.39
C	45	17.78	1.94	M	4.17	0.10	f				2.09	0.04	M	pv			24.04	2.08
C	46	17.98	2.00	F	4.17	0.10	f				2.12	0.05	M	pv			24.27	2.15
C	47	17.38	1.25	M	4.07	0.09	f				2.04	0.03	M	pv			23.49	1.37
C	48	17.78	1.94	F	4.00	0.08	f				2.04	0.03	M	pv			23.82	2.05
C	49	17.78	1.67	F	4.17	0.10	F				2.09	0.04	F	1.55	0.02	f	25.59	1.83
C	50	17.38	1.24	F	4.17	0.10	M				2.04	0.03	F	pv			23.59	1.37
C	51	17.78	1.67	F	4.17	0.10	M				2.04	0.03	F	pv			23.99	1.80
C	52	17.78	1.67	F	4.17	0.10	F				2.09	0.04	F	pv			24.04	1.81
C	53	17.38	1.24	F	4.07	0.09	M				2.04	0.04	F	1.55	0.02	f	25.04	1.39
C	54	17.38	1.24	F	4.07	0.09	M				2.09	0.04	F	1.58	0.03	f	25.12	1.40
C	55	18.20	3.24	F	4.07	0.09	M				2.10	0.05	F	1.60	0.04	f	25.97	3.42
C	56	18.00	2.02	F	4.07	0.09	M				2.04	0.04	F	1.55	0.02	f	25.66	2.17

Pop	#	frag 1 (kpb)	inc abs du frag 1	int du frag 1	frag 2 (kpb)	inc abs u frag	int du frag 2	frag 3 (kpb)	inc abs du frag 3	int du frag 3	frag 4 (kpb)	inc abs u frag	int du frag 4	frag 5 (kpb)	inc abs u frag	int du frag 5	s ADNmt (kpb)	inc abs de sADNmt
C	57	18.20	3.24	F	4.17	0.10	M				2.04	0.04	F	1.58	0.03	f	25.99	3.41
C	58	17.78	1.67	F	4.07	0.09	M				2.09	0.04	F	1.55	0.02	f	25.49	1.82
C	59	17.78	1.67	F	4.17	0.10	M				2.04	0.04	F	1.58	0.03	f	25.57	1.84
C	60	18.00	2.02	F	4.12	0.10	M				2.04	0.04	F	1.60	0.04	f	25.76	2.20
C	61	17.78	1.67	F	4.07	0.09	M				2.09	0.04	F	pv			23.94	1.80
C	62	17.78	1.67	F	4.07	0.09	M	2.45	0.06	M	2.09	0.04	F	1.58	0.03	f	27.97	1.89
C	63	17.78	1.67	F	4.07	0.09	M				2.04	0.04	F	1.55	0.02	f	25.44	1.82
C	64	17.38	1.24	f	4.12	0.10	f				2.09	0.04	M	pv			23.59	1.38
C	65	17.38	1.24	F	4.07	0.09	f				2.04	0.04	M	pv			23.49	1.37
C	66	17.78	1.67	F	4.07	0.09	F				2.04	0.04	F	1.55	0.02	f	25.44	1.82
C	67	17.78	1.67	F	4.17	0.10	M				2.04	0.04	F	1.55	0.02	f	25.54	1.83
C	68	17.38	1.24	F	4.07	0.09	M				2.09	0.04	F	1.58	0.03	f	25.12	1.40
C	69	17.38	1.24	F	4.17	0.10	M				2.09	0.04	F	1.58	0.03	f	25.22	1.41
C	70	17.38	1.24	f	4.17	0.10	f				2.04	0.04	M	pv			23.59	1.38
C	71	17.38	1.23	M	4.07	0.09	f				2.09	0.04	M	pv			23.54	1.36
C	72	17.78	1.65	F	4.17	0.10	M				2.04	0.04	M	pv			23.99	1.79
C	73	17.78	1.65	F	4.17	0.10	M				2.04	0.04	M	pv			23.99	1.79
C	74	17.38	1.23	M	4.07	0.09	f				2.09	0.04	M	pv			23.54	1.36
C	75	17.78	1.65	F	4.17	0.10	F				2.04	0.04	F	pv			23.99	1.79
C	76	17.38	1.23	F	4.12	0.10	F	2.45	0.06	M	2.09	0.04	F	pv			26.04	1.43
I	1	18.20	3.22	F	4.07	0.09	F	2.45	0.06	f	2.04	0.03	F	1.55	0.02	f	28.31	3.42
I	2	17.78	1.65	F	4.17	0.10	F				2.09	0.04	FF	pv			24.04	1.79
I	3	16.98	1.22	F	4.17	0.10	F				2.04	0.03	FF	pv			23.19	1.35
I	4	16.98	1.22	F	4.07	0.09	F				2.09	0.04	FF	pv			23.14	1.35
I	5	17.78	1.65	F	4.17	0.10	F				2.04	0.03	FF	pv			23.99	1.78
I	6	17.38	1.23	F	4.07	0.09	f				2.04	0.03	F	pv			23.49	1.35
I	7	16.60	1.04	F	4.07	0.09	F	2.57	0.07	F	2.04	0.03	F	pv			25.28	1.23
I	8	17.37	1.23	F	4.17	0.10	F				2.09	0.04	FF	pv			23.63	1.37

Pop	#	frag 1	inc abs	int du	frag 2	inc abs	int du	frag 3	inc abs	int du	frag 4	inc abs	int du	frag 5	inc abs	int du	s ADNmt	inc abs
		(kpb)	du frag 1	frag 1	(kpb)	u frag	frag 2	(kpb)	du frag3	frag 3	(kpb)	u frag	frag 4	(kpb)	u frag	frag 5	(kpb)	de sADNmt
I	9	16.98	1.22	F	4.07	0.10	F				2.04	0.03	FF	1.58	0.03	f	24.67	1.38
I	10	17.37	1.23	F	4.17	0.10	f				2.04	0.03	F	pv			23.58	1.36
I	11	16.60	1.04	F	4.17	0.10	F				2.04	0.03	FF	1.58	0.03	f	24.39	1.20
I	12	16.98	1.22	f	4.27	0.15	f				2.04	0.03	F	pv			23.29	1.40
I	13	17.38	1.23	F	4.07	0.09	f				2.04	0.03	F	pv			23.49	1.35
I	14	17.38	1.23	F	4.17	0.10	f				2.09	0.04	F	pv			23.64	1.37
I	15	16.98	1.22	F	4.07	0.09	F	2.80	0.07	f	2.04	0.03	F	pv			25.89	1.41
I	16	16.60	1.04	F	4.17	0.10	F				2.09	0.04	FF	pv			22.86	1.18
I	17	17.38	1.23	F	4.07	0.09	F				2.04	0.03	FF	pv			23.49	1.35
I	18	17.78	1.65	F	4.17	0.10	F				2.04	0.03	FF	pv			23.99	1.78
I	19	17.38	1.23	F	4.07	0.09	F				2.09	0.04	F	pv			23.54	1.36
I	20	16.60	1.04	F	4.07	0.09	F				2.09	0.04	F	1.60	0.04	f	24.36	1.21
I	21	17.38	1.23	F	4.07	0.09	f				2.04	0.03	F	pv			23.49	1.35
I	22	17.38	1.23	F	4.17	0.10	f				2.09	0.04	F	pv			23.64	1.37
I	23	18.20	3.20	F	4.17	0.10	F				2.04	0.03	F	pv			24.41	3.33
I	24	17.78	1.65	F	4.07	0.09	f				2.04	0.03	F	pv			23.89	1.77
I	25	17.38	1.24	F	4.07	0.09	F				2.09	0.04	F	pv			23.54	1.37
I	26	17.78	1.65	F	4.17	0.10	F				2.04	0.04	F	1.58	0.03	f	25.57	1.82
I	27	18.20	3.20	F	4.07	0.09	f				2.09	0.04	F	pv			24.36	3.33
I	28	18.00	2.03	F	4.17	0.10	f				2.04	0.04	F	1.62	0.04	f	25.83	2.21
I	29	18.20	3.20	F	4.07	0.09	F				2.04	0.04	FF	1.60	0.04	f	25.91	3.37
I	30	18.20	3.20	F	4.07	0.09	F				2.04	0.04	F	1.58	0.03	f	25.89	3.36
I	31	17.78	1.65	F	4.07	0.09	F	2.45	0.06	M	2.04	0.04	F	pv			26.34	1.84
I	32	17.38	1.23	F	4.17	0.10	f				2.09	0.04	F	pv			23.64	1.37
I	33	16.60	1.05	F	4.07	0.09	F				2.12	0.05	F	pv			22.79	1.19
I	34	16.60	1.05	F	4.17	0.10	F				2.00	0.03	F	pv			22.77	1.18
I	35	18.20	3.20	F	4.07	0.09	F				2.04	0.04	F	pv			24.31	3.33
I	36	17.78	1.65	F	4.07	0.09	f				2.09	0.04	F	1.58	0.03	f	25.52	1.81

Pop	#	frag 1 (kpb)	inc abs du frag 1	int du frag 1	frag 2 (kpb)	inc abs u frag 2	int du frag 2	frag 3 (kpb)	inc abs du frag 3	int du frag 3	frag 4 (kpb)	inc abs u frag 4	int du frag 4	frag 5 (kpb)	inc abs u frag 5	int du frag 5	s ADNmt (kpb)	inc abs de sADNmt
I	37	17.78	1.65	F	4.07	0.09	F				2.04	0.04	F	pv			23.89	1.78
I	38	17.78	1.65	F	4.07	0.09	F	2.57	0.06	M	2.09	0.04	F	pv			26.51	1.84
I	39	17.78	1.65	F	4.07	0.09	F				2.09	0.04	F	1.60	0.04	f	25.54	1.82
I	40	18.00	2.05	F	4.17	0.10	M				2.09	0.04	F	pv			24.26	2.19
I	41	17.98	1.67	F	4.07	0.09	f				2.04	0.04	F	pv			24.09	1.80
I	42	17.78	1.65	F	4.17	0.10	M				2.04	0.04	F	pv			23.99	1.79
I	43	17.78	1.65	F	4.07	0.09	F	2.45	0.06	M	2.10	0.05	F	pv			26.40	1.85
I	44	17.38	1.24	F	4.10	0.10	f				2.00	0.03	F	1.58	0.03	M	25.06	1.40
I	45	17.78	1.65	F	4.17	0.10	F				2.04	0.04	F	1.55	0.02	M	25.54	1.81
I	46	16.90	1.20	F	4.07	0.09	M				2.04	0.04	F	1.58	0.03	f	24.59	1.36
I	47	16.90	1.20	F	4.07	0.09	F	2.45	0.06	M	2.04	0.04	F	1.60	0.04	f	27.06	1.43
I	48	17.08	1.21	f	4.07	0.09	F				2.04	0.04	F	pv			23.19	1.34
I	49	16.90	1.20	F	4.17	0.10	F				2.09	0.04	F	pv			23.16	1.34
I	50	16.90	1.20	F	4.07	0.09	F				2.04	0.04	F	pv			23.01	1.33
I	51	17.80	1.65	M	4.17	0.10	f				2.09	0.04	F	pv			24.06	1.79
I	52	17.78	1.65	F	4.17	0.10	F				2.09	0.04	F	pv			24.04	1.79
I	53	17.38	1.23	F	4.17	0.10	F				2.04	0.04	F	pv			23.59	1.37