

RECEPTION ET PREPARATION DES ECHANTILLONS DE MOLLUSQUES POUR DES ANALYSES DE PCR TEMPS REEL

Laboratoire National de Référence des maladies des mollusques marins

Unité ASIM – IFREMER – La Tremblade

Suivi des modifications

Version	Modifications	Date
V1	Création	Janvier 2025

Sommaire

1. Objet et domaine d'application	4
2. Equipements, réactifs et environnement	4
2.1. Equipements et consommables	4
2.2. Réactifs	4
2.3. Environnement.....	4
3. Réception des animaux	4
4. Préparation des échantillons	5
4.1. Animaux vivants	5
4.2. Tissus congelés	6
4.3. Tissus en éthanol	6
5. Gestion des déchets	6

1. Objet et domaine d'application

Cette instruction décrit les conditions de réception, de conservation et de préparation des échantillons de coquillages reçus pour la réalisation d'analyses par PCR temps réel.

2. Equipements, réactifs et environnement

Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits, matériels et appareils nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Ifremer recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

2.1. Equipements et consommables

- Hotte ou sorbonne
- Balance
- Scalpels ou ciseaux
- Pinces
- Tubes de 1,5 ou 2 mL
- Système de broyage (ultraturax, piston pellet ...)
- Sachet plastique (ex : mini-grip)
- Tubes à vis de 15 mL et/ou 50 mL

2.2. Réactifs

- Ethanol absolu

2.3. Environnement

Le personnel doit porter une blouse de laboratoire et des gants durant toutes les étapes et doit connaître les pratiques courantes de laboratoire. Le personnel réalisant cette méthode doit également avoir reçu une formation appropriée.

3. Réception des animaux

Les **coquillages prélevés dans le cadre de mortalité** doivent être traités dans les plus brefs délais. Dans l'attente de leur traitement, ils doivent être conservés dans une enceinte réfrigérée.

Les **coquillages vivants** peuvent être stockés temporairement dans une enceinte réfrigérée si l'analyse est réalisée 24 à 48 heures après réception. Pour une durée supérieure à 48 heures, il est préférable de congeler les échantillons ou de les fixer en éthanol absolu.

Remarque : Lors de réception de coquillage fousseurs (ex : palourde, coque...), il est conseillé de laver les chairs à l'eau de mer après ouverture des coquillages, pour éliminer au maximum sable et débris.

Il est à noter que les coquillages peuvent être réceptionnés directement congelés ou fixés en éthanol pour les analyses en biologie moléculaire.

4. Préparation des échantillons

Différents types d'échantillons peuvent être réceptionnés : animaux vivants, animaux congelés ou fixé en éthanol. De plus, selon le stade de développement ou la taille des mollusques, différents protocoles de traitement des animaux sont à mettre en œuvre.

La dissection des tissus/animaux s'effectue à l'aide de pinces et lames de scalpel et/ou ciseaux. Ces instruments sont changés ou nettoyés entre chaque individu à analyser pour éviter d'éventuelles contaminations.

L'étape de broyage des tissus ou des animaux peut être réalisée de différentes manière (ex : piston pellet, mortier, appareil de type ultraturax...), l'objectif étant d'obtenir une préparation relativement homogène.

4.1. Animaux vivants

Larves ou individus inférieurs à 6mm (pool d'individus)

Broyer environ 150mg d'animaux et prélever entre 20 et 30 mg de tissus pour la réalisation de l'extraction.

Individus compris entre 6mm et 15mm (analyses individuelles)

Pour chaque mollusque, broyer l'ensemble des tissus du mollusque et prélever entre 20 et 30 mg de tissus pour la réalisation de l'extraction.

Individus > 15mm (analyses individuelles)

Après avoir ouvert le coquillage et réalisé un examen macroscopique, décoquiller la chair en prenant soin de ne pas léser les tissus.

Prélever différents morceaux de tissus pour obtenir un total compris entre 20 et 30 mg. Placer ces tissus dans des microtubes de 1,5 mL ou 2mL par exemple et broyer les grossièrement avant d'effectuer l'étape d'extraction.

Pour chacun des individus d'un lot, il est recommandé d'effectuer l'extraction d'ADN en poolant des morceaux de **branchies, glande digestive et manteau**, afin de couvrir le plus grand nombre d'organismes pathogènes possibles

Cependant, selon les organismes pathogènes recherchés, il faut que l'extraction d'ADN se fasse **à minima** à partir des organes cibles ci-dessous :

- Bactérie *Vibrio aestuarianus* : branchies et manteau
- Virus OsHV-1 : branchies et manteau

Les tissus restants peuvent être conservés par la suite dans des tubes de 2, 15 ou 50 mL, en éthanol absolu ou au congélateur.

4.2. Tissus congelés

Décongeler les tissus de chaque échantillon.

Une fois dégelés, procéder de la même manière que pour les animaux vivants pour le prélèvement de tissus (cf. paragraphe 4.1.).

4.3. Tissus en éthanol

Presser le tissu ou le coquillage, à l'aide d'une pince, sur un papier absorbant, afin d'enlever le surplus d'éthanol.

Pour le prélèvement des tissus, procéder de la même manière que pour les animaux vivants pour le prélèvement de tissus (cf. paragraphe 4.1.).

Laisser-les ensuite évaporer sous hotte entre environ 30 minutes et 1 heure, avant d'effectuer l'étape d'extraction.

5. Gestion des déchets

Les déchets doivent être traités selon les conditions autorisées par la réglementation. Le laboratoire doit également mettre en œuvre des mesures pour garantir la non-dissémination des organismes pathogènes dans l'environnement (ex : autoclavage des restes de bivalves comme les coquilles).

FIN DU DOCUMENT