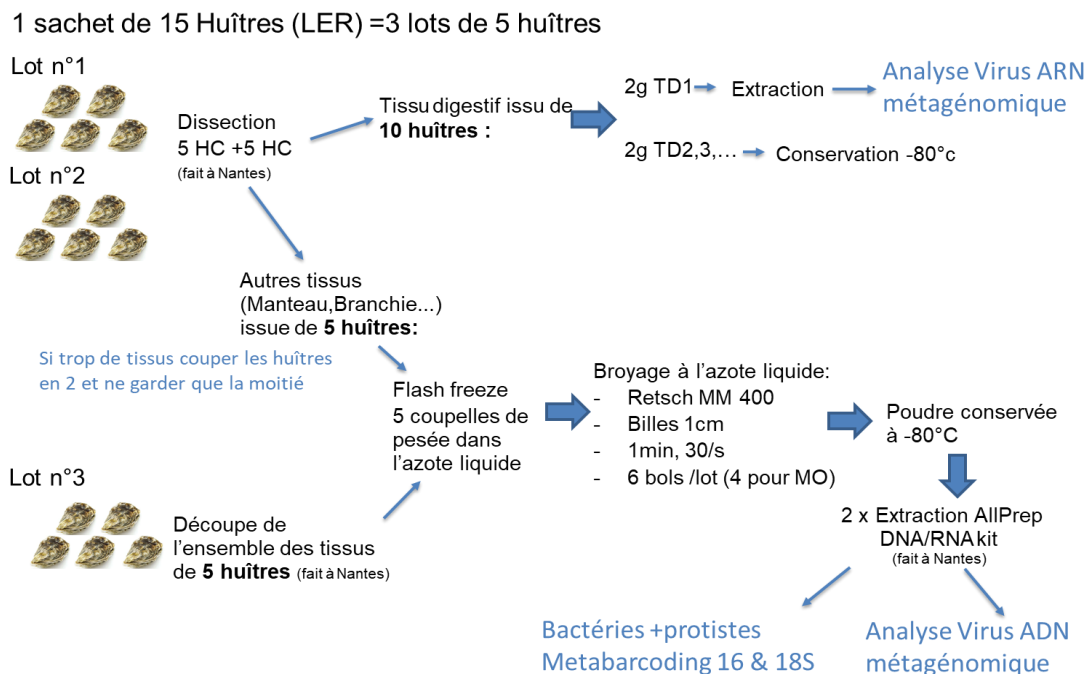


## Protocole d'extraction de l'ADNe et de l'ARNe à partir d'échantillons d'huîtres

### • Dissection des huîtres creuses (3 lots de 5 animaux) :

- 1<sup>er</sup> lot : les tissus digestifs (TD) sont enlevés avec une pince et un scalpel et conservés pour être analysés avec ceux du 2<sup>ème</sup> lot. Les autres tissus (branchies, manteau...) sont découpés et répartis dans 5 coupelles de pesée (env.7g). Cette matrice sert à l'analyse de virus ADN animaux (osHV1).
- 2<sup>ème</sup> lot : les tissus digestifs (TD) sont récupérés par dissection et mélangés avec ceux du 1<sup>er</sup> lot, répartis en tube de 2g et conservés à -80°C (environ 3 tubes selon la taille des TD). Les autres tissus ne sont pas conservés. Cette matrice sert à la métagénomique de virus ARN.
- 3<sup>ème</sup> lot : l'ensemble des tissus des 5 huîtres est répartie dans 5 coupelles de pesée (env.7g). Ce lot est destiné aux analyses de diversité de bactéries et protistes (métabarcoding)



### • Broyage à l'azote liquide :

Des gants adaptés sont obligatoires pour la manipulation

- Les coupelles de pesée ainsi que les bols, les billes, les spatules et les tubes sont placés dans un bac adapté et recouvert d'azote liquide
- Les tissus sont placés dans un bol avec une bille (diamètre 1 cm)
- Le broyage est réalisé dans le broyeur pendant 1m, à 30 oscillation/s (Retsch MM 400)
- Les broyats obtenus à partir des tissus sans TD ou des animaux entiers, sont récupérés dans des tubes de 50mL et placés immédiatement à -80°C

- **Extraction d'ADN /ARN à l'azote liquide à partir du broyat et à partir des tissus (sans TD) pour l'analyse de la diversité des protistes et bactéries associés aux huitres et pour la recherche du OsHv1**

L'extraction des ADN et ARN est réalisée en simultanée grâce au kit ALLPREP minikit (Qiagen ref 80204) en triplicat.

- Sur une prise d'essai de 25mg de broyat de coquillages, 600µl de tampon de lyse sont ajoutés et vortexés pendant 1 min
- Après centrifugation, le surnageant est placé sur une colonne (ALLPREP) qui retient l'ADN et laisse passer l'ARN
- L'ARN, après ajout d'éthanol, est ensuite fixé sur une autre colonne (RNeasy)
- Les 2 colonnes sont rincées par des tampons de lavage adaptés
- L'élution est ensuite réalisée avec 100 µl d'eau stérile (ARN) ou avec un tampon d'élution (ADN). Un total de 300 µl d'ADN et ARN est obtenu.
- 50 µl de ces acides nucléiques sont destinés aux analyses de biologie moléculaire. Les 250 µl d'ADN et les 250 µl de ARN restants sont conservés à 80°C (1 aliquot chaque).

- **Extraction ARN sur Tissus Digestifs (TD) d'huîtres pour l'analyse de la diversité de virus nuisibles pour l'homme.**

Les tissus digestifs d'huîtres concentrent les éventuels microorganismes d'origine anthropique et contiennent peu d'inhibiteurs de réactions enzymatiques

- 2ml de protéinase K (3U/ml) sont ajoutés à 2g de TD issus du lot n°2 puis incubés sur un agitateur rotatif à 37°C puis 60°C pendant 15min
- Après centrifugation, l'équivalent d'1/10 du volume du surnageant est ajouté en sodium pyrophosphate (100mM) puis incubé sous agitation pendant 40 min
- Après centrifugation (20min, 8000g) 1, 5ml de PEG/NaCl sont ajoutés au surnageant puis incubé 1h à 4°C sous agitation.
- Le culot de PEG obtenu suite à la centrifugation est repris dans 2ml de tampon glycine préchauffé.
- Une filtration est réalisée grâce à l'empilement de 3 filtres seringue (5-1,2-0,45 µm)
- Sur le filtrat une endonucléase (Omnicleave, Lucigen ref OC7850K) et son tampon sont ajoutés puis incubés 1h à 37°C
- L'extraction des acides nucléiques est ensuite réalisée avec le kit Nuclisens (Biomérieux, Biomérieux ref 200293). Pour cela un tampon de lyse est ajouté puis les acides nucléiques (AN) sont captés par de la silice magnétique. Après des étapes de lavages, l'élution des ANs est réalisée à 60°C sous agitation forte.
- Les 100µl d'éluat sont traités à la DNase (TurboDNase, Invitrogen AM2238), puis purifiés par un kit RNA Clean & Concentrator (Zymo ref R1015). Les AN sont conservés à -80°C.

*Publications de référence :*

Strittmatter Martina. Simultaneous DNA and RNA extraction from various tissues of the two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*, for metabarcoding. pprroottoocoolss..iioo dx.doi.org/10.17504/protocols.io.22aggae

Strittmatter Martina . PCR for metabarcoding of the eukaryotic microbiome of two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. protocols.io dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5k6g4ze

Strubbia Sofia, Schaeffer Julien, Besnard Alban, Wacrenier Candice, Le Mennec Cecile, Garry Pascal, Desdouits Marion, Le Guyader Soizick (2020). Metagenomic to evaluate norovirus genomic diversity in oysters: Impact on hexamer selection and targeted capture-based enrichment . International Journal Of Food Microbiology , 323, 108588 (13p.) . Publisher's official version : <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108588>