

*Définition et test de nouvelles
amorces pour la détection en PCR
du virus de type herpès infectant les
huîtres*

Juin - Août 1997

T. RENAULT et C. LIPART

INTRODUCTION

La collaboration, entamée en 1996 avec A. Davison du Medical Research Council de Glasgow, a permis d'aboutir à l'obtention d'informations sur la séquence de fragments clonés d'ADN de virus de type herpès infectant les huîtres.

1. - Dessin des amorces

Parmi les fragments séquencés, le fragment le plus long (1089 paires de bases) a été retenu pour construire de nouvelles amorces pour la PCR. En effet, une des voies possibles pour améliorer la technique de PCR existante, utilisée pour le diagnostic du virus de type herpès, était d'obtenir des amorces présentant une plus grande spécificité pour l'ADN viral que celle de amorces déjà utilisées. Le fragment cloné retenu a été sélectionné sur la base de son absence d'homologie flagrante avec les séquences existantes dans les banques de données. Il était ainsi possible d'estimer que la séquence de ce fragment était propre au virus et pouvait servir à dessiner de nouvelles amorces.

Ainsi trois couples d'amorces ont été définis en utilisant un site sur le Web (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>), à partir de la séquence fournie par A. Davison :

- ❖ OHV1/OVH2 (taille du fragment attendu 765 pb).
- ❖ OHV3/OVH4 (taille du fragment attendu 896 pb).
- ❖ OHV5/OVH6 (taille du fragment attendu 780 pb).

2. - Sélection des amorces

Les trois couples d'amorces (OVH1/OVH2, OHV3/OHV4 et OHV5/OHV6) ont été testés, en utilisant $5 \cdot 10^7$ et 2500 génomes viraux par tube de réaction, soit respectivement 10 ng et 0.5 pg d'ADN viral extrait de particules purifiées, dans les conditions de PCR définies préalablement au laboratoire de La Tremblade. Cependant, dans ce cas, une seule réaction de PCR est réalisée. Il s'agit de simple PCR et non de nested PCR.

Les trois couples d'amorces testés permettent d'obtenir, après 35 cycles d'amplification, des produits de PCR détectables en gel d'agarose aussi bien pour $5 \cdot 10^7$ génomes viraux que pour 2500 (Fig. 1). Les fragments amplifiés obtenus possèdent la taille attendue. Par ailleurs, aucune autre bande n'est observée pour les trois couples d'amorces utilisées indiquant l'absence d'hybridation non spécifique (Fig. 1).

Le couple OHV3/OHV4 a été retenu pour les expériences ultérieures dans la mesure où la bande détectée sur gel d'agarose pour 2500 génomes viraux était plus nettement lisible que pour les amorces OHV1/OHV2 et OHV5/OHV6 ainsi que pour les amorces A5/A6 en PCR2 (Fig. 1).

3. - Spécificité des amorces OHV3/OHV4

La spécificité des amorces OHV3/OHV4 a été vérifiée en utilisant des échantillons d'ADN d'huîtres creuses saines. Dans ce cas, aucune bande n'est observable en gel d'agarose indiquant que les amorces utilisées ne s'hybrident pas sur l'ADN d'huître.

4. - Définition du seuil de détection

Au vu des résultats obtenus avec les amorces OHV3/OHV4 pour 2500 copies d'ADN viral, des expériences ont été réalisées afin de définir le seuil de détection correspondant à ces amorces (quantité minimale d'ADN viral détecté de façon systématique). Il est ainsi possible d'observer des bandes nettes en gel d'agarose lorsque 500, 100 et 50 génomes viraux sont distribués dans les tubes de PCR (Fig. 2) et cela de façon systématique (5 tubes positifs sur 5). Par ailleurs, des bandes de faible intensité mais détectables sont également obtenues lorsque 25 et 5 copies d'ADN viral sont utilisés par tube de réaction (Fig. 2). De la même manière que pour les quantités plus importantes d'ADN viral, l'obtention de produits de PCR spécifiques est systématique (5 tubes positifs sur 5).

Le seuil de détection en PCR2 pour les couples d'amorces A3/A4 et A5/A6 utilisés dans un protocole de nested PCR est de 2500 génomes viraux. La détection de l'ADN viral en dessous de ce seuil est possible, mais aléatoire avec ces amorces. Les amorces OHV3/OHV4 permettent d'abaisser le seuil de détection de manière significative, c'est à dire d'un facteur de plus de 50 (de 50 à 500) et cela en ne réalisant qu'une seule réaction de PCR.

5. - Répétabilité

Afin de vérifier si les résultats obtenus pouvaient être répétés, une première expérience a été réalisée dans laquelle 27 tubes contenant 50 copies d'ADN viral et 27 tubes Témoin négatif (ne contenant pas d'ADN viral, mais de l'eau bidistillée) ont été traités en PCR, en utilisant les amorces OHV3/OHV4. Les témoins négatifs et les tubes contenant l'ADN viral sont systématiquement alternés au cours de la préparation de la réaction de PCR, afin de vérifier s'il est possible de travailler sans contamination majeure. Les résultats obtenus montrent la présence du fragment de taille désiré pour 25 des 27 tubes contenant l'ADN viral (50 copies) et pour aucun des tubes Témoin négatif. Cette expérience indique que le protocole de PCR mis au point au laboratoire de La Tremblade associé à l'utilisation des amorces OHV3/OHV4 permet de réduire de façon répétable le niveau de détection de l'ADN viral par rapport aux amorces A3/A4 et A5/A6.



Figure 1 - Test des amorces OHV1/OHV2, OHV3/OHV4 et OHV5/OHV6 sur ADN viral extrait de particules virales purifiées (1 μ l d'échantillon et 2.5 unités d'ADN polymérase). a, b et c : $5 \cdot 10^7$ copies (a : OHV1/OHV2, b : OHV3/OHV4 et c : OHV5/OHV6) ; d, e et f : 2500 copies (d : OHV1/OHV2, e : OHV3/OHV4 et f : OHV5/OHV6) ; g : 2500 copies avec A3/A4 et A5/A6 ; h : $5 \cdot 10^7$ copies avec A3/A4 et A5/A6.



Figure 2 - Définition du seuil de détection de l'ADN viral extrait de particules purifiées (1 μ l d'échantillon et 2.5 unités d'ADN polymérase). 1 à 5 : 5 copies, 6 à 10 : 25 copies, 11 à 15 : 50 copies, 16 à 20 : 100 copies, 21 à 25 : 500 copies, 26 et 28 : 2500 copies et 27 : $5 \cdot 10^7$.

6. - Essais de nested PCR

Des amorces internes (OHV13/OHV14) ont été dessinées au sein du fragment amplifié par OHV3/OHV4. Les tests réalisées, en utilisant le protocole de nested PCR mis au point avec les amorces A3/A4 et A5/A6, ont permis de mettre en évidence des problèmes de contaminations. En effet, il a été possible de détecter dans les témoins négatifs (ne contenant que de l'eau bidistillée) le fragment attendu. L'extrême sensibilité de la réaction de PCR1 avec les amorces OHV3/OHV4 fait que les contaminations sont très facilement observées en PCR2 (présence de contaminations à très faible niveau et non détectables dans les tubes de PCR1 et révélation de ces contaminations en PCR2). Devant, ces difficultés et la grande sensibilité de la PCR avec les amorces OHV3/OHV4, il a été estimé que la nested PCR n'était pas une voie à privilégiée dans ce cas.

7. - Analyse comparative d'échantillons

Des échantillons de larves d'huître creuse et d'huître plate, prélevés entre 1992 et 1997 et conservés congelés à -20°C, ont été analysées en utilisant les amorces A3/A4 et A5/A6 avec le protocole de nested PCR défini au laboratoire et les amorces OHV3/OHV4 dans une simple PCR (une seule réaction). Les examens réalisées montrent que 9 échantillons sur 16 sont positifs en PCR2 lorsque les amorces A3/A4 et A5/A6 sont utilisées alors que 14 échantillons sur 16 le sont pour le couple d'amorces OHV3/OHV4 (Fig. 3).

8. - Obtention d'une sonde nucléique marquée à la digoxigénine en PCR et test de sa spécificité en Southern blotting

Une sonde marquée à la digoxigénine a été produite en utilisant des nucléotides particuliers (dUTP digoxigénine) dans une réaction de PCR utilisant les amorces OHV3/OHV4. 10^4 génomes viraux sont utilisés par tube de réaction. La sonde ainsi obtenue est testée en Southern blotting (transfert des ADNs sur membrane de Nylon) sur le fragment amplifié non marqué et produit en PCR à partir d'ADN viral extrait de particules purifiées et sur les fragments amplifiés à partir d'échantillons de larves infectées. Il est ainsi possible d'observer un marquage spécifique (Fig. 4).

9. - Hybridation *in situ*

La sonde marquée à la digoxigénine, préparée par PCR avec les amorces OHV3/OHV4, a été testée en utilisant un protocole d'hybridation *in situ*, mis au point préalablement au laboratoire de La Tremblade. Il est ainsi possible d'observer un marquage nucléaire et cytoplasmique de certaines cellules sur coupes histologiques d'animaux (naissain) infectés (contrôlés en microscopie électronique à transmission) : cellules des tissus conjonctifs du manteau, des palpes labiaux, etc... Ce sont ces cellules dans lesquelles les particules virales sont détectées en microscopie électronique.

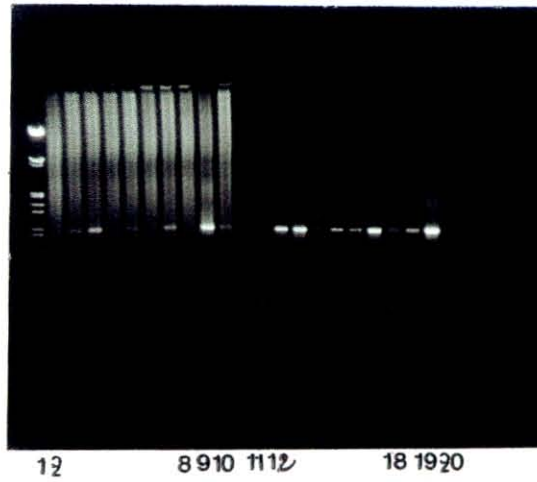


Figure 3 - Analyse comparative d'échantillons de larves d'huître. 1 : témoin négatif ; 2 à 8 : échantillons de larves, produits de PCR2 après nested PCR (amorces A3/A4 et A5/A6) ; 9 et 10 : témoins positifs $5 \cdot 10^7$ et 2500 copies (A3/A4 et A5/A6) ; 11 : témoin négatif ; 12 à 18 : échantillons de larves, produits de PCR avec OHV3/OHV4 ; 19 et 20 : témoins positifs $5 \cdot 10^7$ et 2500 copies (OHV3/OHV4).



e d c b a

Figure 4 - Test de spécificité d'une sonde marquée à la digoxigénine, fabriquée en PCR en utilisant les amorces OHV3/OHV4. Hybridation sur membrane a : fragment d'amplification obtenu à partir de larves d'huître creuse infectées ; b et c : fragments d'amplification obtenus à partir de larves d'huître plate infectées ; d et e : fragments d'amplification obtenus respectivement à partir de $5 \cdot 10^7$ et 2500 copies de génomes viraux

TRAVAUX EN COURS ET PERSPECTIVES

❖ Le seuil de détection très bas (entre 5 et 50 copies d'ADN viral) permet d'envisager de rechercher avec les amorces OHV3/OHV4 d'éventuels stades latents de l'infection ainsi que des niveaux très faibles de réplication chez les huîtres. Dans ce but, des analyses en PCR d'échantillon de gonade (géniteurs ayant donné des élevages larvaires présentant des mortalités associées à la détection d'ADN viral en PCR et de géniteurs stressés (expériences menées à IFREMER Bouin)) ont été entreprises.

Cependant, le seuil de détection obtenu avec les amorces OHV3/OHV4 pose le problème des contaminations. Il est absolument nécessaire de prendre un ensemble de précautions extrêmement strictes et de les appliquer scrupuleusement.

❖ L'obtention par PCR de sondes spécifiques de l'ADN viral marquées à la digoxigénine et la mise au point d'un protocole d'hybridation *in situ* permet d'envisager de développer une technique de PCR *in situ*. Cette technique alliant la grande sensibilité de la PCR et la spécificité de l'hybridation *in situ* pourrait permettre de détecter la présence de très faibles quantités d'ADN viral (latence) dans des échantillons de matériel biologique et de les localiser. La réalisation d'un stage en PCR *in situ* à l'Institut Pasteur de Lyon (T. Renault, novembre 1997) devrait permettre de faciliter la mise au point de la technique.

Cependant, la lourdeur et la technicité de cette méthode ne permet pas d'envisager son utilisation en routine rapidement après sa mise au point.