

Université de Bordeaux II
U.E.R. de Biochimie et Biologie cellulaire

D.E.A. de BIOLOGIE-SANTE
Option "Pathologie Microbienne et Virale"

**MISE AU POINT DE METHODOLOGIES
POUR LE DIAGNOSTIC ET L'ETUDE
DE LYMPHOCYSTIVIRUS (IRIDOVIRIDAE)**

Rose-Marie LE DEUFF

Septembre 1990

Laboratoire de Pathologie et de Génétique
des Invertébrés Marins
17390 - LA TREMBLADE



IFREMER

Université de Bordeaux II
U.E.R. de Biochimie et Biologie cellulaire

D.E.A. de BIOLOGIE-SANTE
Option "Pathologie Microbienne et Virale"

**MISE AU POINT DE METHODOLOGIES
POUR LE DIAGNOSTIC ET L'ETUDE
DE LYMPHOCYSTIVIRUS (IRIDOVIRIDAE)**

Rose-Marie LE DEUFF

Septembre 1990

Laboratoire de Pathologie et de Génétique
des Invertébrés Marins
17390 - LA TREMBLADE

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I	MATERIEL ET METHODES.....	4
1	- Matériels biologiques.....	4
	1.1 Lignée cellulaire.....	4
	1.2 Virus.....	4
2	- Techniques de culture cellulaire.....	4
	2.1 Conditions de culture de la lignée BF2.....	4
	2.2 Préparation des suspensions virales clarifiées....	4
	2.3 Titrage.....	5
	2.4 Clonage des cellules.....	5
3	- Techniques d'hybridation lymphocytaire.....	5
	3.1 Immunisation des souris.....	5
	3.2 Préparation des cellules.....	5
	3.2.1 Macrophages.....	5
	3.2.2 Cellules de la lignée myelomateuse.....	6
	3.2.3 Lymphocytes.....	6
	3.3 Fusion cellulaire.....	6
	3.4 Sélection des hybridomes.....	7
	3.5 Criblage des hybridomes.....	7
	3.6 Clonage des hybridomes.....	7
4	- Techniques d'analyse d'ADN.....	8
	4.1 Extraction d'ADN.....	8
	4.2 Clonage.....	8
	4.2.1 Souches bactériennes et vecteur de.....	9
	clonage.....	9
	4.2.2 Construction des plasmides recombinants....	10
	4.2.3 Mise en compétence des bactéries.....	10
	4.2.4 Transformation.....	10
5	- Technique d'amplification de séquences par PCR	
	"Polymerase Chain Reaction".....	10
	5.1 Préparation des amorces.....	10
	5.2 Protocole d'amplification.....	10
	5.3 Détection de fragments amplifiés.....	11
6	- Techniques d'électroporation.....	11
	6.1 Electropulsateur.....	11
	6.2 Milieu de pulsation.....	11
	6.3 Marqueur de perméabilisation membranaire.....	11
	6.4 Electroperméabilisation.....	12
	6.5 Test de survie cellulaire.....	12

II RESULTATS

1 - METHODES DE DIAGNOSTIC DE LYMPHOCYSTIVIRUS.....	13
1.1 - Préparation d'anticorps spécifiques de LDV.....	13
1.1.1 - Préparation d'anticorps monoclonaux par hybridation lymphocytaire.....	13
1.1.2 - Préparation d'anticorps polyclonaux.....	14
1.2 - Mise en évidence d'ADN viral.....	14
1.2.1 - Mise en évidence d'ADN viral par centrifugation isopycnique.....	14
1.2.2 - Mise en évidence d'ADN viral par enzyme de restriction.....	17
1.2.3 - Mise en évidence d'ADN viral par hybridation.....	17
1.2.4 - Mise en évidence d'ADN viral par PCR.....	17

2 - METHODES D'ETUDE DE LYMPHOCYSTIVIRUS SUR CELLULES BF2

2.1 - Clonage de la lignée cellulaire.....	18
2.2 - Electroporation des cellules BF2.....	19
2.2.1 - Détermination des paramètres d'electroporation.....	20
2.2.2 - Electroperméabilisation et survie cellulaires en fonction du traitement de mise en suspension.....	20
2.2.3 - Effet de la densité des cellules en culture.....	20

III DISCUSSION.....22

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'aquaculture marine est une activité pratiquée à l'échelle mondiale qui concerne un nombre relativement limité d'espèces de poissons, mollusques et crustacés. Consécutivement aux progrès zootechniques et notamment à la maîtrise des cycles complets d'élevage, les productions aquacoles se sont développées, en particulier celles issues d'écloseries. Cependant, quelle que soit l'espèce considérée et quelles que soient les techniques d'élevage, la pathologie infectieuse constitue un aléa majeur pour les productions, les maladies à caractère épidémique ou endémique étant le plus souvent provoquées par des protozoaires intracellulaires, des bactéries ou des virus.

Parmi les viroses, la famille des Iridoviridae pose problème chez un certain nombre d'espèces de poissons et de mollusques.

Chez les premiers, où le genre *Lymphocystivirus* (virus type : *Lymphocystis Disease Virus*, LDV) a été identifié, la maladie se manifeste par l'apparition de kystes (également appelés nodules ou pseudotumeurs) sur la peau, les branchies et parfois dans les organes internes (FLUGEL, 1985). Par manque de réactifs spécifiques, le diagnostic se fait sur culture cellulaire ou en microscopie électronique et il a été de ce fait relativement difficile d'effectuer des études épidémiologiques approfondies. Cependant, des iridoviroses sont considérées comme étant les causes principales des mortalités observées depuis une dizaine d'années (LANGDON, 1989; PINTO et al., 1989) sur plusieurs espèces de poissons marins en élevage.

Les études sur les iridoviroses chez les mollusques se limitent à des observations ultrastructurales. Chez l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, un virus présentant une similitude extrême avec le LDV a été décrit (COMPS et al., 1976) et impliqué entre 1969 et 1971 dans la disparition de cette huître des côtes françaises. Plus récemment, ELSTON et WILKINSON (1985) ont associé des mortalités massives de larves d'huître japonaise, *Crassostrea gigas*, à un virus du même type (Oyster Velar Virus Disease, OVVD) et avance l'hypothèse d'une transmission verticale de ce virus. Il apparaît que pour certains élevages, les larves virosées meurent rapidement et ne sont donc pas commercialisées. Par contre, lorsque la maladie se développe plus lentement, les larves produites à l'écloserie peuvent être, après métamorphose, distribuées à grande échelle selon la pratique du télécaptage (BOUCHARENC et CADORET, 1989), ce qui peut contribuer à la dissémination du virus. Compte tenu de l'importance de l'huître japonaise pour la conchyliculture mondiale (données FAO, 1990), cette situation doit être considérée comme réellement "explosive".

D'un point de vue fondamental (annexe 1), seul le LDV au sein des *Lymphocystivirus* a fait l'objet d'une caractérisation biochimique réalisée à partir de virus isolé de la perche à grande bouche, *Micropterus salmoides* (souche : ATCC VR-342 Leetown NFH) et produit sur cellules BF2 (ROBIN et al., 1983; ROBIN et al., 1984; ROBIN et al., 1986), tandis que l'étude physique du génome est basée sur deux souches de LDV purifiées à partir de kystes provenant de deux espèces de poissons, la plie, *Pleuronectes platessa*, et le flet, *Platichthys flesus*, (SCHNITZLER et al., 1990). Les modalités de la réplication du LDV sont pratiquement inconnues et par ailleurs, aucune étude sérologique n'a été réalisée sur ces différentes souches de virus.

D'un point de vue appliqué, les recherches sont encore plus limitées. En effet, il n'existe aucune méthode de diagnostic alternative à la microscopie électronique et à la culture cellulaire, qui soit réellement mieux adaptée à des études épidémiologiques de terrain. Il faut noter par ailleurs le caractère différencié et imprécis du diagnostic sur culture de cellules, car le cycle du virus est très lent et l'effet cytopathique est plus ou moins net, le virus étant non lytique.

Dans ce contexte global, il apparaît urgent de considérer quels types de recherche peuvent être développés dans une perspective de prophylaxie de ces iridoviroses.

Un premier axe de travail concerne la mise au point de méthodes de diagnostic, simples à mettre en oeuvre, basées d'une part sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux (MIALHE et al., 1988; SCHONHERR and HOUWINK, 1984) et d'autre part de techniques de caractérisation d'ADN (LANDEGREN et al., 1988; KUMAR, 1989).

La sélection d'animaux résistants peut être envisagée selon une approche de génétique quantitative à partir d'animaux survivants soit à une épidémie, soit à une infection expérimentale si la reproduction de la maladie est maîtrisée au laboratoire. Une telle approche, en cours à l'IFREMER pour sélectionner des huîtres plates, *Ostrea edulis*, résistantes au protozoaire *Bonamia ostreae*, est cependant relativement aléatoire, notamment quant à la stabilité des caractères de la résistance (HERVIO, comm. pers.).

La vaccination, totalement impossible à concevoir chez les mollusques en raison de leur absence de réponse immunitaire à médiation immunoglobuline, est par contre pratiquée chez les poissons. Cependant, l'efficacité de la vaccination dont les procédés sont difficiles à mettre en oeuvre (injection, balnéation, ingestion), est compliquée par le phénomène de focalisation de la réponse immunitaire (COSSARINI-DUNIER, 1985) et de plus, pour les maladies virales, par le coût des vaccins actuellement produits sur cultures cellulaires.

A l'instar des travaux effectués chez les plantes, pour lesquelles la résistance à des viroses a été obtenue par expression soit de protéines virales soit de séquences virales

anti-sens (GRUMET, 1990; VAN DER KROL et al., 1988), les recherches développées sur l'inhibition de la réplication de virus animaux reposent en majorité sur la stratégie anti-sens. Des systèmes *in vitro* se sont avérés particulièrement adaptés pour analyser et sélectionner les séquences et les structures anti-sens efficaces (DUDDING et al., 1990; SARVER et al., 1990). A l'échelle de la cellule, certains modèles visent une application pharmaceutique des oligonucléotides de synthèse, généralement modifiés pour améliorer leur incorporation cellulaire et leur stabilité (STEIN et COHEN, 1988; TOULME et HELENE, 1988). D'autres recherches reposent sur la transformation stable des cellules et l'expression d'ARN anti-sens, en particulier de type ribozyme (SARVER et al., 1990). L'extrapolation de ces travaux à l'échelle de l'animal transgénique est abordée maintenant sur le modèle murin (TAKAYAMA et al., 1989).

Dans le cadre de mon DEA, je me suis initialement attachée au diagnostic des *Lymphocystivirus*, en intégrant la difficulté de purification de ces virus, notamment chez les mollusques (VEYRUNES, comm. pers.). Des anticorps monoclonaux ont été produits par hybridation lymphocytaire, les étapes d'immunisation et de screening des hybridomes ayant été conçues de façon à s'affranchir de la purification de virus et différents types de protocoles de mise en évidence d'ADN viral ont été élaborés. Pour développer des travaux à plus long terme sur le cycle de développement du LDV et la stratégie anti-sens d'inhibition de sa réplication, l'optimisation du système modèle : cellules BF2/LDV a été abordée. La technique d'électroporation cellulaire a été prise en compte en vue de son application à l'introduction d'oligonucléotides anti-sens, et à la transformation cellulaire.

METHODES

ET

MATERIEL

MATERIELS ET METHODES

1- Matériels biologiques

1.1- Lignée cellulaire

La lignée cellulaire BF2 (ATCC CCC58), de type fibroblastique, a été établie à partir de tissus du poisson crapet arlequin (*Lepomis macrochirus*). Cette lignée est utilisée pour la production du virus LDV.

1.2 - Virus

Le virus LDV utilisé correspond à la souche *Lymphocystis* Leetown NFH ATCC VR-342, isolée par WOLF en 1962 chez la perche à grande bouche (*Micropterus salmoides*).

Des kystes, provenant de flets européens (*Platichthys flesus*) de la rivière Elbe en Allemagne (1989), nous ont été fournis par le professeur K. ANDERS (Institut für Meereskunde, Allemagne).

2- Techniques de culture cellulaire

2.1- Conditions de culture de la lignée BF2

Les cellules BF2 sont cultivées à 23°C dans le milieu de Eagle avec sels de Earle (EMEM), additionné de 10 % de sérum de veau foetal (SVF). Les repiquages sont effectués, après trypsination (trypsine 2 g/l, 1 mn), à une densité d'ensemencement égale à 10⁵ cellules/ml.

2.2- Préparation des suspensions virales clarifiées

Des fioles de culture (25 cm²) dont le tapis cellulaire occupe 70 % de la surface sont infectées en substituant le milieu de culture par 1 ml d'une suspension virale clarifiée. Après une incubation de deux heures à 23°C, 5 ml de milieu supplémenté avec 2 % SVF sont additionnés. Les fioles sont ensuite maintenues à 23°C durant la durée du cycle de réplication du virus (trois semaines environ). Les cellules virosées, qui sont alors en suspension dans les fioles, sont centrifugées (3 000 rpm, 15 mn), puis subissent deux cycles de congélation-décongélation avant d'être traitées aux ultrasons (50 W, 30 sec). Les suspensions virales sont ensuite clarifiées (3 000 rpm, 15 mn) et stockées à - 20°C après titrage du virus.

2.3- Titrage

Les cellules BF2 sont réparties dans une plaque de 96 puits préalablement traitée à la poly-D-lysine, à raison de 6000 cellules par puits (100 µl de milieu) et incubées 3 à 4 heures (23°C). Les cellules étant alors fixées, le milieu est éliminé et remplacé par 100 µl de suspension virale (EMEM, 2 % SVF). Après une nuit d'incubation à 23°C, le surnageant est remplacé par 50 µl de EMEM contenant 3 % de méthyl-cellulose, auxquels 150 µl de EMEM à 2 % SVF sont ensuite additionnés.

Le titre d'une suspension virale est établi selon la méthode de REED et MEUNCH (annexe 2) et correspond à la dose infectieuse pour laquelle 50 % des cultures sont infectées (DI 50). Les dilutions successives d'une suspension virale sont introduites dans les puits de culture, le pourcentage de cultures virosées étant estimé selon la technique d'immunofluorescence indirecte (paragr. 3.5).

2.4- Clonage de cellules

Les cellules BF2 ont été clonées en microplaque par dilution limite, les cellules étant réparties à raison de 0,3 cellule/puits. Lorsque les colonies recouvrent la moitié de la surface du puits, elles sont repiquées dans des fioles de culture.

3- Techniques d'hybridation lymphocytaire

Le schéma général de préparation d'anticorps monoclonaux selon la technique d'hybridation lymphocytaire est présenté sur la figure 1.

3.1- Immunisation des souris

Deux souris Balb/c ont été immunisées contre des suspensions de LDV clarifiées (paragr. 2.2, sonication : 100 W, 3 mn). Cette immunisation consiste en une première inoculation (500 µl, TCID = $10^{4,32}$ /ml) par voie intrapéritonéale suivie par deux injections identiques de rappel, effectuées à 8 jours d'intervalle. Une dizaine de jours après le dernier rappel, le titre des sérums en anticorps spécifiques est estimé par la technique d'immunofluorescence indirecte (paragr. 3.5) réalisée sur des cultures cellulaires virosées. La souris ayant le titre le plus élevé est sélectionnée pour l'hybridation lymphocytaire et reçoit un dernier rappel 3 jours avant la fusion.

3.2- Préparation des cellules

3.2.1- Macrophages

Immunsation

Préparation des cellules

Fusion par traitement chimique (PEG)

Sélection des hybridomes

Sélection des hybridomes sécréteurs
d'anticorps spécifiques par IIF en
microplaques

Clonage des hybridomes

Cryopréservation des hybridomes

Production des anticorps monoclonaux

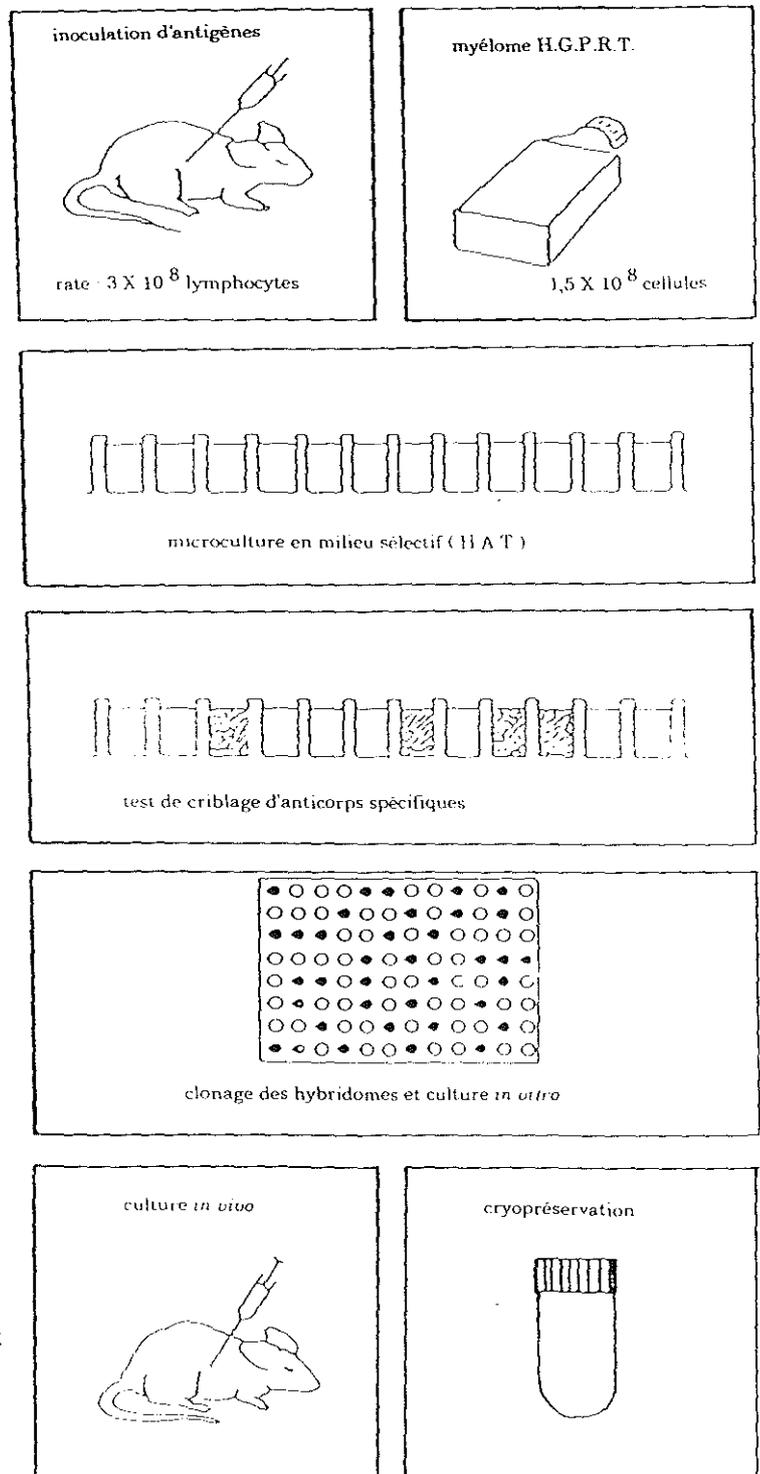


FIGURE 1: Principe de production d'anticorps monoclonaux selon la technologie de l'hybridation lymphocytaire.

Les macrophages présents dans les puits de culture ont pour rôle, d'une part, de phagocyter les cellules mortes et les microorganismes éventuellement présents, et d'autre part, de métaboliser le milieu de culture. Ils sont prélevés dans la cavité abdominale de souris et introduits dans les puits de culture 24 heures avant la fusion cellulaire.

3.2.2- Cellules de la lignée myélomateuse

Les cellules de la lignée myélomateuse P3X63Ag8-653 sont déficientes en Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase (HGPRT-), qui intervient dans la voie secondaire de synthèse des nucléotides. Afin de ne pas obtenir de mutants HGPRT+, les myélomes sont cultivés, à raison de 100 000 cellules/ml au maximum, dans du milieu A (RPMI 1640, 10 % SVF) contenant 0,13 mM de 8-azaguanine, un analogue létal de l'hypoxanthine. Le jour avant la fusion, une concentration de 50 000 cellules/ml environ est nécessaire afin de se situer dans la phase exponentielle de croissance cellulaire. Ces cellules sont cultivées à 37°C dans une étuve à CO₂ (5 %).

3.2.3- Lymphocytes

La souris, sélectionnée sur la base de son titre en anticorps spécifiques, est tuée par décapitation. La rate est alors prélevée aseptiquement, rincée dans du milieu RPMI 1640, broyée à l'aide d'un homogénéiseur de type Dounce dans 10 ml de milieu RPMI 1640. Toutes ces manipulations sont effectuées au froid (4°C), les tubes et broyeurs étant conservés dans de la glace pilée. Le broyat est filtré sur de la gaze stérile et le filtrat est centrifugé (150 g, 10 mn, 4°C). Le culot est repris dans 10 ml de milieu RPMI 1640. Le dénombrement des lymphocytes B est effectué à l'aide d'une cellule de Malassez en prenant soin de ne pas compter les globules rouges.

3.3- Fusion cellulaire

Les cellules myélomateuses, préalablement dénombrées, sont centrifugées (200 g, 5 mn, 4°C). Le culot est repris dans du milieu RPMI 1640 et centrifugé comme précédemment. Ce culot est remis en suspension dans 5 ml de milieu RPMI 1640 et les cellules sont à nouveau comptées. Dans le tube contenant la suspension de splénocytes, on ajoute les cellules myélomateuses en nombre quatre fois moindre. Cette suspension mixte est centrifugée (200 g, 10 mn, température laboratoire). Le surnageant est éliminé et le culot est légèrement remis en suspension par simple agitation du tube. Il faut alors ajouter au culot de cellules 1 ml de polyéthylène glycol 1540 (PEG) à 37°C, les 10 premières gouttes étant mises en 30 secondes (t= 0),

t= 0 mn 30 : mettre au bain-marie à 37°C,

t= 1 mn 30 : centrifuger à 200 g à 20°C,

t= 3 mn 00 : arrêter rapidement la centrifugeuse,

t= 4 mn 30 : mettre au bain-marie à 37°C sans agiter,

t= 6 mn 30 : ajouter aussitôt 6 ml de milieu RPMI 1640 à 37°C, à raison de 100 µl toutes les 5 secondes puis ajouter 9 ml de milieu RPMI 1640.

Cette suspension est centrifugée (150 g, 10 mn, 20°C). Le culot est repris dans 10 ml de milieu B (RPMI 1640, 15 % SVF). Les cellules sont ensuite réparties (25 000, 50 000 et 100 000 cellules/puits) dans les puits des microplaques (96 puits) contenant les macrophages et dont le milieu de culture a été préalablement éliminé. Les plaques de culture sont maintenues à 37°C dans un incubateur à CO₂ (5 %).

3.4- Sélection des hybridomes

Un jour après la fusion, dans chaque puits de culture sont ajoutés 100 µl de milieu B sélectif HAT 2X (Hypoxanthine 10 mM, Aminoptérine 0,04 mM, Thymidine 1 mM). L'aminoptérine bloque la voie de synthèse primaire des nucléotides. Seules les cellules myélomateuses fusionnées avec un lymphocyte (HGPRT+) sont alors capables de se multiplier. Au neuvième jour, 100 µl de surnageant de culture sont remplacés par le même volume de milieu B sélectif HAT 1X. Au moment du criblage des hybridomes, 100 µl de surnageant de culture sont prélevés et remplacés par le même volume de milieu B additionné en hypoxanthine (5 mM) et en thymidine (0,08 mM).

3.5- Criblage des hybridomes

La présence d'anticorps spécifiques des cultures cellulaires virosées est recherchée dans les surnageants de culture des hybridomes en utilisant un système double de détection antigénique, consistant en des cultures cellulaires saines et virosées. Ces dernières, préparées dans des plaques de 96 puits (paragr. 2.3.1), sont fixées au troisième ou au neuvième jour d'infection. Après incubation pendant 15 minutes à température ambiante dans la solution de fixation (tampon IF Pasteur, formaldéhyde 3 %), les plaques sont traitées au Triton X 100 (3 % dans tampon IF Pasteur, 30 mn, température ambiante) afin de perméabiliser les membranes cellulaires (PEEPLES, 1987), puis rincées (tampon IF Pasteur). Les surnageants de culture d'hybridomes sont analysés selon une technique d'immunofluorescence indirecte en déposant 100 µl de surnageant par puits. Après incubation (30 mn, température ambiante) puis deux lavages (tampon IF Pasteur), des anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris, marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (dilution au 1/100 dans du tampon IF Pasteur additionné de bleu d'Evans 1 %) sont déposés dans chaque puits (100 µl, 30 mn, température ambiante). Les puits sont ensuite lavés 3 fois (tampon IF Pasteur) et une goutte de tampon glyciné pour IF (Pasteur) est déposée dans chaque puits. L'examen des cultures au microscope à épifluorescence s'effectue en inversant la microplaque

préalablement recouverte d'un film adhésif (STITZ et al., 1987).

3.6- Clonage des hybridomes

Les hybridomes sélectionnés sur la base de leur spécificité sont clonés selon la technique des dilutions limites. Pour ce faire, les hybridomes sont répartis dans des microplaques à raison de 0,3 cellule/puits sous un volume de 200 µl. Après 10 à 15 jours de culture, la spécificité des anticorps sécrétés est testée à nouveau selon le même protocole d'immunofluorescence indirecte utilisé pour le screening initial des hybridomes. Les clones producteurs d'anticorps de spécificité recherchée sont ensuite cultivés en volumes progressivement augmentés, afin de disposer de suffisamment de cellules, d'une part pour congeler les hybridomes, d'autre part pour inoculer des souris en vue de la production en ascite des anticorps monoclonaux.

4- Techniques d'analyse d'ADN

4.1- Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN total est réalisée en parallèle sur des culots de cellules saines ou virosées (60×10^6 cellules) et sur un kyste de poisson (2,9 g), selon le protocole dérivé de JEANPIERRE (1987). Les tissus ou culots de cellules sont dissociés à l'aide d'un homogénéiseur de tissus de type Potter dans 8 ml d'une solution d'isothiocyanate de guanidine (5 M), à laquelle sont additionnés 1 ml d'acétate d'ammonium (5 M), 1 ml d'une solution de sarkosyl à 20 % et 75 µl de protéinase K à 7 mg/ml. Le broyat est incubé 2 heures à 60°C, en ajoutant 75 µl de protéinase K au bout d'une heure. Les acides nucléiques sont alors précipités par l'éthanol absolu, rincés dans l'éthanol 70° puis repris dans du tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Une nouvelle incubation de 2 heures à 60°C est effectuée dans un volume final de 15 ml, auquel sont ajoutés 75 µl de protéinase K toutes les heures. Les ARN sont digérés par 75 µl d'une solution de ribonucléase à 10 mg/ml (RNase, DNase free, Boehringer). Après incubation (30 mn, 37°C), l'ADN est extrait par du phénol chloroforme puis précipité par l'éthanol absolu. Les acides nucléiques (300 µg par gradient) sont enfin séparés par centrifugation isopycnique en CsCl (1,25 g/ml, 55 000 rpm, 15 h) en présence de l'agent intercalant HOECHST n°33258 (0,5 mg/ml). Après prélèvement des bandes et séparation de l'ADN et du CsCl sur colonne (Sephadex NAP 25, Pharmacia), le colorant de HOECHST est éliminé par l'isobutanol. L'ADN est précipité par l'éthanol absolu et stocké à - 20°C dans du tampon TE (Tris 1 mM, EDTA 0,1 mM).

4.2 - Clonage

L'ensemble du protocole est schématisé sur la figure 2.

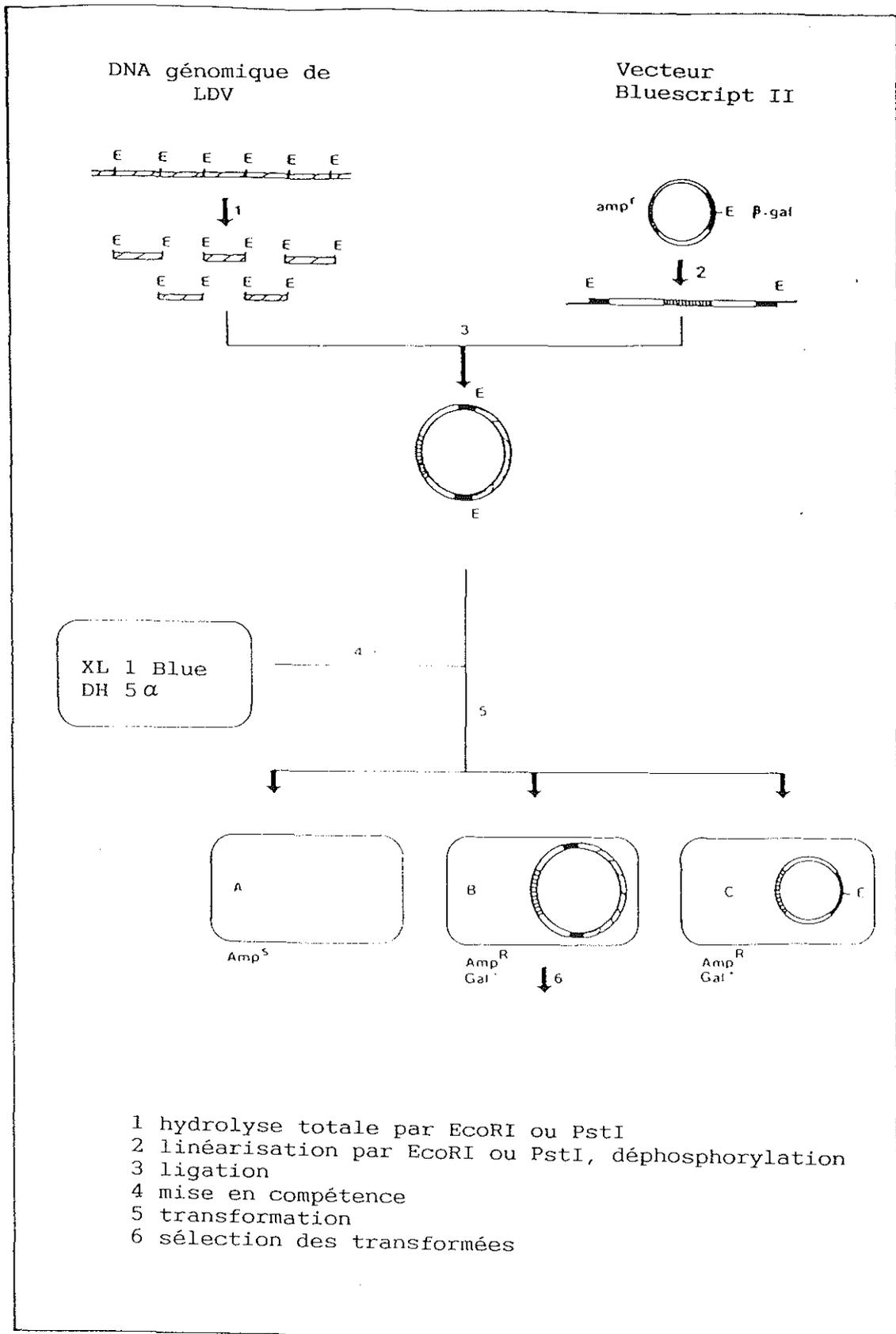


FIGURE 2: Clonage de l'ADN purifié du LDV.

4.2.1 - Souches bactériennes et vecteur de clonage

Deux souches d'*Escherichia coli*, XL1-Blue et DH5a sont utilisées. Afin d'éviter la perte de l'épisome F', et donc celle du gène M15 complétant le gène Lac Z du vecteur, la souche XL1-Blue (dont l'épisome porte un gène de résistance à la tétracycline) doit être étalée sur un milieu contenant de la tétracycline (12,5 µg/ml).

Le vecteur Bluescript II (Stratagène) possède d'une part, un gène de résistance à l'ampicilline et d'autre part, un polylinker de 21 sites de restriction uniques, flanqué des promoteurs de la T3 ARN polymérase et de la T4 ARN polymérase. Ce polylinker et les deux séquences promotrices sont inclus dans la portion N-terminale d'un fragment du gène Lac Z. Les bactéries constitutivement délétées pour Lac Z, mais possédant un vecteur Bluescript II sans insert dans le linker, produisent des colonies bleues sur le milieu sélectif contenant du X-gal, substrat chromogène de la β-galactosidase (paragr. 4.2.4). Les bactéries transformées par un plasmide recombinant sont blanches, l'insert interrompant le fragment Lac Z du plasmide.

4.2.2 - Construction des plasmides recombinants

Deux clonages sont réalisés en parallèle avec deux enzymes de restriction différentes : *EcoRI* et *PstI* (Boehringer).

Les aliquots d'ADN purifié de LDV (5 µg) sont hydrolysés par l'enzyme de restriction (*EcoRI* ou *PstI*, 5 U/µg d'ADN, 1 h 30, 37°C), puis précipités par l'éthanol absolu. Parallèlement, le vecteur de clonage (5 µg) est linéarisé par l'enzyme de restriction correspondante (*EcoRI* ou *PstI*). Ses extrémités 5' sont déphosphorylées (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Boehringer; 5 U/µg d'ADN, 1 h 30, 37°C) et le vecteur est précipité par l'éthanol absolu. L'efficacité des digestions enzymatiques est contrôlée sur une fraction d'ADN (2,5 µg) par électrophorèse en gel d'agarose (0,7 %, 100 V, 4 h).

Enfin, l'ADN viral (500 ng) et le vecteur (100 ng) sont alors mis en présence de T4 ADN ligase (GIBCO-BRL, 2 U, 14°C, 16 h).

4.2.3 - Mise en compétence des bactéries

Les bactéries sont rendues compétentes selon le protocole de HANAHAN, 1983. Des bactéries XL1-Blue et DH5a, cultivées en phase exponentielle de croissance (30 ml de milieu SOB : bactotryptone 2 %, bacto-yeast extract 0,5 %, NaCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, 37°C, 4 h), sont ensuite placées 10 à 15 minutes dans de la glace puis centrifugées (10 mn, 1 250 g, 4°C). Le culot, bien égoutté, est mis en suspension dans 10 ml de solution RF1 (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acétate de potassium 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glycérol 5 %) puis laissé dans la glace pendant 15 minutes. Après centrifugation

(1 200 g, 10 mn, 4°C), le culot est repris dans 3 ml de solution RF2 (MOPS (Morpholino Sulfonic Acid) 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glycérol 15 %), et incubé pendant 15 minutes dans la glace, les bactéries étant alors compétentes.

4.2.4 - Transformation

Le mélange de ligation vecteur-insert est ajouté à 500 µl de bactéries compétentes qui sont maintenues pendant 30 minutes dans la glace. Une incubation de 90 secondes à 42°C est alors pratiquée avant de replacer le tube dans la glace. Les suspensions bactériennes sont ensuite étalées à raison de 50 à 100 µl par boîte sur le milieu sélectif (bactotryptone 2 %, bacto-yeast extract 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, bacto-agar 2,5 mM, ampicilline 50 µg/ml, X-Gal 80 µg/ml, IPTG 0,20 mM). Les colonies blanches et bleues sont visibles après environ 18 heures de culture à 37°C.

5- Technique d'amplification de séquences par PCR (Polymerase Chain Reaction)

5.1- Préparation des amorces

Une paire d'amorces a été choisie dans la séquence répétée du génome du LDV, séquence conservée à 94,93 % pour les deux souches virales chez lesquelles elle a été établie (SCHNITZLER et DARAI, 1989).

5' TCGGCAGAATGAAATACCACG 3'

5' CATGGTTATTGGTGGATACGG 3'

Ces amorces sont séparées par 174 nucléotides ce qui devrait se traduire par l'obtention d'un fragment amplifié de 216 paires de bases.

La synthèse de ces amorces a été réalisée sur un synthétiseur Cyclone (Milligène), selon un procédé décrit en annexe 3.

5.2- Protocole d'amplification

Les amplifications de séquences par PCR (annexe 4) sont réalisées selon un protocole classique (LINZ et al., 1990). Le mélange réactionnel (50 µl) contient: l'ADN, 262 ng de chaque amorce, chlorure de magnésium 2,5 à 5,5 mM, 5 µl de tampon de réaction 10X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, gélatine 0,01 % (P/V)), 100 µM de chaque déoxynucléotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2,5 unités d'enzyme Taq polymérase (Cetus). Ce mélange est recouvert d'une goutte d'huile de paraffine, puis soumis à 25 ou 40 cycles d'amplification dans un bain thermostaté programmable (PHC II, Techne). Chaque cycle comprend:

- une incubation de 2 mn à 92°C (dénaturation des brins cibles)

- une incubation de 2 mn à 52°C (appariement des amorces)

- une incubation de 2 mn à 70°C (élongation à partir des amorces).

Après le 25^{ème} ou le 40^{ème} cycle, une dernière incubation de 5 mn à 70°C permet l'élongation totale des brins inachevés.

5.3- Détection des fragments amplifiés

Après amplification, les échantillons sont refroidis à température ambiante, l'huile de paraffine est enlevée par dissolution dans l'étheroxyde et 8,5 µl de chaque échantillon sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose (2 %). Après l'électrophorèse (40 mn, 10 V/cm), le gel est coloré avec du bromure d'éthidium (BrEt). Les bandes correspondant aux fragments d'ADN amplifiés sont visualisées sur un transilluminateur à rayons ultraviolets.

6- TECHNIQUES D'ELECTROPORATION

6.1- Electropulsateur

L'électropulsateur type PS 10 (JOUAN) permet de délivrer des impulsions électriques de haute tension (jusqu'à 1 KV), dont la durée (jusqu'à 24 msec) et la fréquence (jusqu'à 10 Hz) sont contrôlées par une horloge électronique. L'intensité du champ demeure constante durant toute la durée des impulsions dont le profil cinétique dit "en vague carrée" est visualisé sur un oscilloscope. Ce générateur est relié à des électrodes planes entre lesquelles un champ électrique homogène est créé. Elles sont constituées par trois lames d'acier inoxydable maintenues parallèles, la distance entre l'électrode centrale (+) et les deux électrodes latérales (-) est de 4 mm. Ces électrodes sont adaptées géométriquement à l'utilisation en tant que chambre d'électroporation de cuves (4 ml) à usage unique de type spectrophotométrique.

6.2- Milieu de pulsation

Les cellules sont en suspension dans 1 ml de milieu isoosmotique de pulsation (ROLS, 1985) qui forme un continuum électrique entre les électrodes. Il est composé de tampon phosphate (KH_2PO_4 10 mM, pH 7,2), de saccharose (250 mM) et de chlorure de magnésium (1 mM).

6.3- Marqueur de perméabilisation membranaire

La perméabilité membranaire qui résulte de l'application d'impulsions électriques, peut être mise en évidence par

incorporation de marqueurs non perméants dans les cellules (TEISSIE et ROLS, 1986). Le bleu trypan (SIGMA N°T6146) est généralement employé comme marqueur d'intégrité cellulaire, car la membrane plasmique de cellules intactes l'exclut, alors que les cellules endommagées présentent une coloration bleue particulièrement intense.

6.4- Electroperméabilisation

Les expériences d'électroperméabilisation sont réalisées en conditions stériles dans une hotte à flux laminaire horizontal, les électrodes et les cuves étant stérilisées à l'alcool 70°. Le tapis de cellules BF2 (75 cm²) est dissocié par traitement à la trypsine (5 ml, 2 ou 2X10⁻⁴ g/l, 1 ou 10 mn) ou par la collagénase (5 ml, 10⁻⁸ U/ml, 10 mn). Les cellules mises en suspension sont rincées dans 20 ml de milieu EMEM (10 % SVF), centrifugées (2 000 rpm, 10 mn) et resuspendues dans 10 ml de milieu EMEM (10 % SVF). Les cellules sont maintenues en suspension pendant toute la durée des expériences dans un erlenmeyer siliconé positionné sur le plateau d'un agitateur rotatif, de type Mini-shaker MSR (125 rpm). Pour réaliser chaque test d'électroporation, 0,5 à 1X10⁶ cellules sont prélevées dans l'erlenmeyer, centrifugées (2 000 rpm, 5 mn), et resuspendues dans la cuve contenant 1 ml de milieu de pulsation et dans laquelle elles sont incubées pendant 5 minutes sur de la glace pilée, avant d'être soumises au champ électrique. Immédiatement après le choc électrique, 200 µl de la suspension cellulaire sont mélangés dans un tube à hémolyse siliconé à 200 µl d'une solution de bleu trypan (0,08 % dans du milieu de culture EMEM, 8°C). Après incubation (30 mn, 8°C), les cellules sont comptées sur une cellule de Malassez et le pourcentage de cellules bleues, électroporées et/ou mortes, est estimé.

6.5- Test de survie cellulaire

Parallèlement au test d'électroporation, un test de survie cellulaire est réalisé en prélevant, immédiatement après le choc électrique, 500 µl de cellules traitées, auxquels 500 µl de milieu EMEM sans SVF (8°C) sont additionnés. Les cellules sont placées dans une boîte de pétri (diamètre 35 mm) dans laquelle elles sont incubées 30 mn à 8°C puis pendant 15 à 20 heures à 23°C. Le taux de mortalité est alors déterminé comme indiqué précédemment pour le test d'électroporation.

RESULTS

RESULTATS

1- METHODES DE DIAGNOSTIC DE *LYMPHOCYSTIVIRUS*

Des méthodes alternatives à la microscopie électronique et à la culture cellulaire ont été recherchées pour le diagnostic de virus de type *Lymphocystivirus*. Elles reposent sur la préparation de réactifs et la mise en évidence d'ADN ou d'antigènes viraux dans des échantillons biologiques.

1.1- Préparation d'anticorps spécifiques de LDV

1.1.1- Préparation d'anticorps monoclonaux par hybridation lymphocytaire

Lors de la fusion, les plaques ont étéensemencées avec 100 000, 50 000 ou seulement 25 000 cellules par puits afin d'assurer des conditions de préclonage, le taux d'hybridation pouvant être à priori estimé voisin de 10^{-5} . L'analyse à posteriori des résultats révèle que le taux réel d'hybridation a été de 3×10^{-5} et d'après les formules établies par PAOLUCCI (1983), il apparaît que les plaques correspondant aux ensemencements de 25 000 cellules par puits sont les plus intéressantes du point de vue du préclonage puisque 40 % des puits contiennent des hybridomes, 79 % d'entre eux peuvent être considérés comme directement clonés (figure 3, tableau 1). L'intérêt pratique de ce préclonage est à souligner car l'individualisation initiale des hybridomes confère un caractère monoclonal immédiat aux anticorps sécrétés dans les différents puits. Ainsi, les difficultés liées à la présence de plusieurs hybridomes dans un même puits sont évitées lors du criblage des hybridomes, qu'il s'agisse de la sécrétion simultanée d'anticorps de spécificités différentes (antigènes cellulaires/antigènes viraux), ou de l'élimination progressive d'un hybridome intéressant par un autre qui ne le serait pas.

Cependant, afin de tester un nombre suffisamment grand de surnageants d'hybridomes, le criblage a été effectué non seulement sur les 299 cultures d'hybridomes contenues dans les plaques ensemencées à 25 000 cellules par puits, mais aussi sur 353 provenant des plaques ensemencées à 50 000 cellules par puits.

Le double criblage effectué en immunofluorescence indirecte sur des cultures cellulaires saines et virosées, fixées au troisième ou au neuvième jour d'infection, a conduit à la sélection de 9 hybridomes, dont la spécificité a été confirmée après leur clonage selon le même test en immunofluorescence indirecte. Parmi les anticorps monoclonaux sécrétés par ces 9 hybridomes, 7 ont donné une réponse positive au troisième jour d'infection, l'un d'entre eux étant par contre négatif au

Conditions de culture	Nbre de puits	K=0 pK=F	m	K=1 pK	K>2 pK	Nbre de puits avec des hybridomes
A 1	768	10,1%	1	23%	27%	690
A 2	1 056	22%	1,51	32%	26%	824
A 3	768	61%	0,49	31%	8%	299

Ensemencement des puits suite à la fusion :

A1 100 000 cellules/puits
A2 50 000 cellules/puits
A3 25 000 cellules/puits

m = moyenne du nombre de clones différents par puits : $m = -\ln \frac{F}{100}$

F = % de puits ne contenant pas d'hybridomes

K = nombre de clones différents par puits

pK = % puits contenant K clones différents par puits

$$pK = 100 \times \frac{(m)^K}{K} \times \frac{F}{100}$$

(Paolucci, 1983).

TABLEAU 1: Estimations des nombres de puits contenant K clones différents d'hybridomes, pour les conditions de cultures retenues, en fonction du nombre moyen de clones différents par puits de culture.

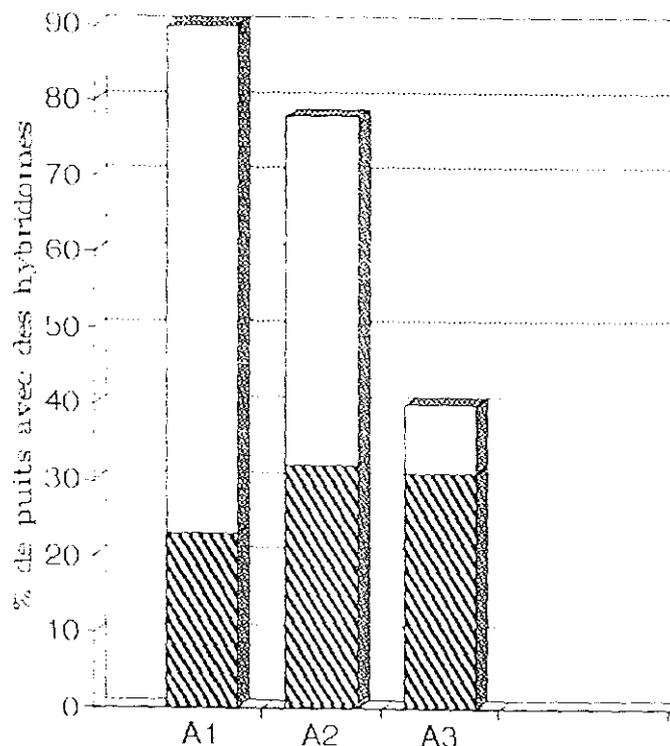


FIGURE 3: Pourcentages de puits contenant des hybridomes préclonés  estimés à partir des pourcentages de puits contenant des hybridomes  observés dans les ensemencements: A1 = 100 000 cellules/puits
A2 = 50 000 cellules/puits
A3 = 25 000 cellules/puits

neuvième jour. Les deux autres anticorps monoclonaux n'ont réagi que vis-à-vis de cultures infectées depuis 9 jours.

Ces différents hybridomes ont été produits en ascite. Le profil de fluorescence, présenté sur la figure 4, correspond à l'un de ceux pour lesquels les anticorps monoclonaux ont été purifiés. Ils constituent des réactifs immédiatement disponibles pour être appliqués en immunofluorescence indirecte à des études épidémiologiques.

1.1.2- Préparation d'anticorps polyclonaux

Parallèlement à la production d'anticorps monoclonaux, des anticorps polyclonaux ont été préparés par immunisation de souris contre des suspensions de LDV clarifiées, la spécificité des immunosérums étant acquise par épuration avec de la poudre acétonique de cellules BF2 saines qui a pour effet d'éliminer les anticorps spécifiques d'antigènes cellulaires.

1.2- Mise en évidence d'ADN viral

1.2.1- Mise en évidence d'ADN viral par centrifugation isopycnique

A partir de cellules saines et virosées d'une part, et d'un kyste d'autre part, l'ADN total a été extrait selon un protocole direct qui s'affranchit de la purification de virus. Le rendement de ces extractions a été estimé d'un point de vue qualitatif et quantitatif (Tableau 2).

Origine de l'ADN	Cellules BF2 saines (300X10 ⁶)	Cellules BF2 virosées (300X10 ⁶)	Kyste (2,9 g)
DO260/280	1,60	1,35	1,30
Quantité totale d'ADN 1 DO = 50 µg/ml	1,16 mg	0,9 mg	11,4 mg

Tableau 2 : Rendement des extractions d'ADN

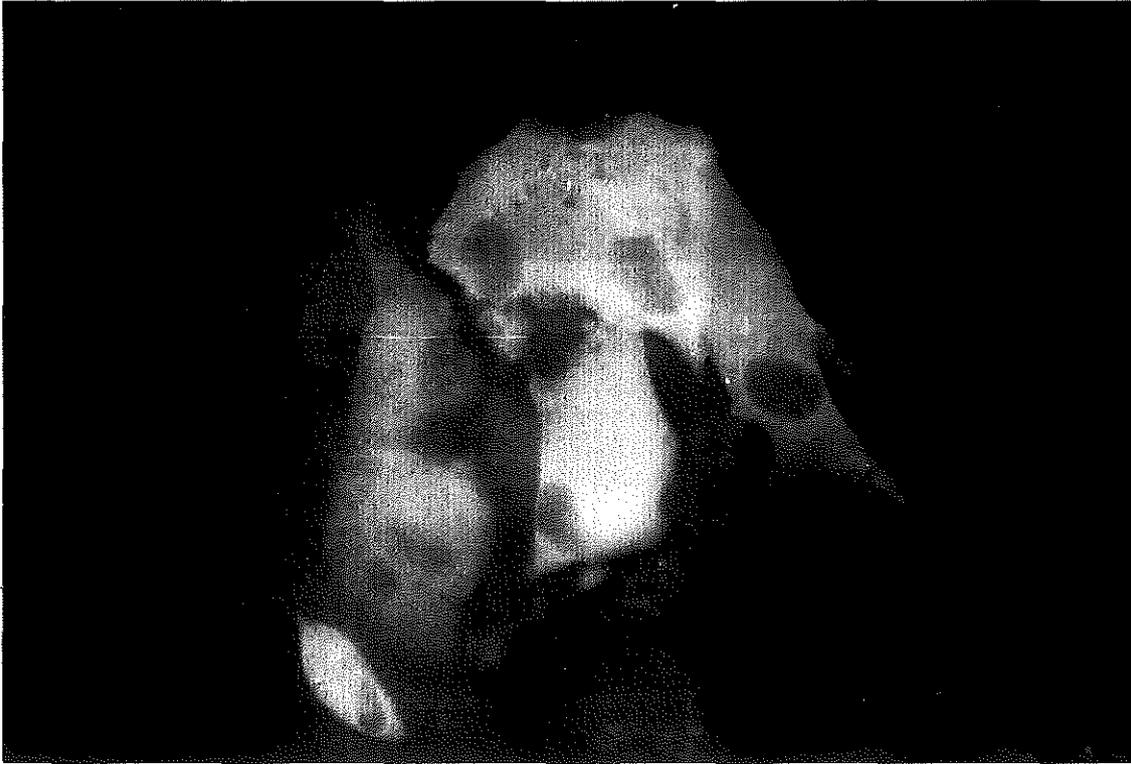


FIGURE 4: Profil d'immunofluorescence de LDV sur culture cellulaire infectée obtenu avec un anticorps monoclonal spécifique (X 800).

Le colorant de HOECHST, qui s'intercale spécifiquement entre les bases G et C a été utilisé avec succès pour séparer l'ADN viral des génomes cellulaires. En effet, après centrifugation isopycnique sur gradient de chlorure de césium, une bande spécifique des échantillons virosés a été observée au dessus de l'ADN cellulaire. La quantité d'ADN présent dans la bande supérieure, supposée d'origine virale, a été estimée par rapport à l'ADN total (Tableau 3).

Origine de l'ADN	Cellules BF2 saines	Cellules BF2 virosées	Kyste
ADN cellulaire (bande inférieure)	21 µg	20 µg	8 µg
ADN "viral" (bande supérieure)	0 µg	13 µg	50 µg
ADN "viral"/total	0 %	39 %	86 %

Tableau 3: Proportions d'ADN viral présent dans des échantillons virosés.

Les natures cellulaires et virales des ADN, correspondant respectivement aux bandes inférieures et supérieures dans le gradient, ont été vérifiées par établissement des profils de restriction établis pour les enzymes *EcoRI* et *PstI*. Les profils des bandes inférieures provenant des différents échantillons correspondaient à des "smears" typiques d'ADN génomique de cellules eucaryotes, quelques fragments répétés étant décelables dans le cas de l'ADN provenant du kyste (flet). Pour les ADN correspondant aux bandes supérieures présentes dans les échantillons virosés, les profils de restriction sont caractéristiques d'ADN viral, plusieurs fragments étant observables.

Dans le cas d'ADN issu du kyste prélevé sur un flet provenant de l'Elbe, une bonne corrélation a été trouvée avec les données établies par DARAI *et al.* (1983) pour deux souches de LDV (Tableau 4). Il faut noter par ailleurs que le fragment de 12,6 Kb pourrait correspondre à un fragment génomique caractérisé par la présence d'un fragment répété (SCHNITZLER *et DARAI*, 1989).

Taille des fragments (Kpb)						
Fragments d'ADN	A		B		C	
	<i>EcoRI</i>	<i>PstI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>PstI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>PstI</i>
A	17,0	16,2	14,4	24,0	28,5	21,0
B	14,8	12,6	*12,7	21,9	*12,7	14,0
C	12,6	8,5	11,2	17,1	12,2	13,5
D	9,3	5,7	9,9	12,5	11,1	12,5
E	8,5	5,0	7,9	8,3	7,9	10,3
F	7,9	4,0	7,5	5,6	7,5	7,4
G	6,7		7,4	4,7	7,4	6,8
H	6,0		7,2	3,6	7,2	5,4
I	2,4		6,6		1,6	3,7
J	1,9		5,6		*1,39	1,35
K	1,5		2,25			1,3
L			1,9			1,25
M			*1,39			1,2
N			0,33			0,2
Total	88,6	52,0	96,27	97,7	96,49	99,8

- Fragments relativement conservés pour les trois souches (caractères gras).
- Fragments portant les séquences répétées(*).

Tableau 4 : Comparaison du profil de restriction obtenu pour l'ADN purifié sur CsCl après extraction du kyste de flet (A) avec les données établies par DARAI et al. (1983) pour l'ADN de flet (B) et de plie (C).

1.2.2- Mise en évidence d'ADN viral par enzyme de restriction

Afin de simplifier le protocole de mise en évidence d'ADN viral dans les échantillons biologiques, en particulier pour s'affranchir de l'étape d'ultracentrifugation, des digestions enzymatiques (*EcoRI*, *PstI*) ont été réalisées sur l'ADN total extrait d'un kyste ou de cultures cellulaires virosées. Les profils de restriction mettent en évidence sous forme de bandes plus intenses les fragments *PstI* et *EcoRI* d'origine virale, ceux-ci étant facilement détectés pour des dépôts initiaux de 2,5 et 5 µg d'ADN total. Il faut noter que le fragment *EcoRI* de 6,7 Kpb n'est pas visible sur ces profils, et pourrait correspondre à de l'ADN cellulaire de type satellite, dont le comportement en gradient de densité de CsCl serait comparable à celui de l'ADN viral.

1.2.3- Mise en évidence d'ADN viral par hybridation.

La mise au point d'une technique d'hybridation de type dot-blot repose sur la disponibilité de sondes. Des contacts infructueux ayant été pris avec DARAI (Institut für Medizinische Virologie der Universität, Heidelberg) pour se procurer des plasmides recombinants, le clonage des fragments de restriction obtenus pour l'ADN du LDV du kyste de flet a été envisagé. Les données bibliographiques stipulent que l'ADN du LDV est fortement méthylé sur les cytosines dans les séquences CpG, ce qui rend leur clonage plus performant dans des souches d'*Escherichia coli* défectives pour certains systèmes de restriction spécifiques des ADN méthylés (RALEIGH, 1987).

Deux séries d'essais ont été effectuées, en utilisant les souches bactériennes XLI-Blue et DH5α.

Un troisième clonage, prévu avec la souche GC3 qui a été utilisée avec succès par DARAI et APFEL (1985) n'a pas pu encore être effectué, cette souche bactérienne demandée auprès du Professeur MEYER (Max Planck Institut für Medizinische, Heidelberg) n'ayant pas été reçue à ce jour.

Le clonage de l'ADN viral, directement purifié à partir du kyste a été réalisé. Compte tenu de la taille des fragments de restriction obtenus pour différentes enzymes (*EcoRI*: 1,5 à 17 Kpb, *PstI*: 4,0 à 16,2 Kpb) et de la taille maximale (10 Kpb) pouvant être insérée dans le plasmide BluescriptII, deux clonages ont été réalisés en parallèle en utilisant les enzymes de restriction *EcoRI* et *PstI*. Cette approche avait pour but d'obtenir une banque représentative de la majorité du génome. Des colonies blanches, recombinantes, ont été obtenues seulement dans le cas de la souche DH5α. La caractérisation de ces colonies recombinantes est en cours. La préparation de sondes froides selon la technique Amersham (ECL) devant permettre de mettre au point une méthode de type dot-blot.

1.2.4- Mise en évidence d'ADN viral par PCR

La mise en évidence par PCR d'ADN viral dans un échantillon a été prise en compte sur la base des informations concernant la présence de séquences répétées qui sont conservées entre deux souches différentes de LDV. De ce fait, des amorces ont pu être synthétisées, les paramètres expérimentaux étant préalablement établis sur l'ADN viral purifié de la souche provenant du flet (Elbe). Les résultats sont récapitulés dans le tableau 5 et montrent notamment l'absence d'amplification non spécifique quelle que soit la concentration en $MgCl_2$, les fragments amplifiés correspondant strictement à la taille prévue étant observés uniquement pour les échantillons d'ADN viral (figure 5).

La sensibilité de ce test a été appréhendée sur une gamme d'échantillons d'ADN comprise entre 1 ng et 1 fg. La limite de détection, après électrophorèse du produit d'amplification en gel d'agarose, a été estimée à 1 fg, soit environ 10 copies de génome viral.

Plusieurs types d'échantillons biologiques ont été alors considérés: cultures cellulaires BF2 saines et infectées, larves d'huîtres saines et contaminées artificiellement par de l'ADN viral. Dans tous les cas, le traitement de l'échantillon a consisté en une simple cuisson (10 mn, 100°C) par référence à WEBB et al. (1990).

Les résultats révèlent une amplification spécifique pour les échantillons virosés ainsi que pour les larves d'huîtres auxquelles de l'ADN viral avait été ajouté. La limite de détection d'un fragment amplifié correspondait pour ce dernier cas à la présence d'environ 10 copies de génome viral par échantillon (5 ou 10 larves d'huîtres).

2- METHODES D'ETUDE DE LYMPHOCYSTIVIRUS SUR CELLULES BF2.

Dans l'optique de développer des recherches sur le cycle de développement de virus du groupe *Lymphocystivirus*, et sur une stratégie anti-sens d'inhibition de leur répllication, une optimisation du système cellulaire BF2 et certaines techniques ont du être abordées.

2.1- Clonage de la lignée cellulaire

L'infection de la lignée cellulaire BF2 avec des suspensions virales de titre élevé se traduit généralement par un pourcentage relativement limité de cellules virosées dans un puits de culture. Cette lignée n'ayant jamais été clonée, l'hypothèse d'une hétérogénéité cellulaire a été testée. Un clonage par dilution limite a donc été réalisé et a conduit à l'obtention de 52 clones dont 28, relativement dynamiques, ont été repiqués en plus grand volume.

Echantillons	LDV				BF2				C. gigas				T	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
A D N (6µl) ng	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	6µlTE
Amorce 1 µl	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Amorce 2 µl	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tampon (x10) µl	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
MgCl ₂ (10 mM) µl	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20	20	
	mM	2,5	3,5	4,5	5,5	2,5	3,5	4,5	5,5	2,5	3,5	4,5	5,5	5,5
H ₂ O (qsp 50 µl) µl	32	27	22	17	32	27	22	17	32	27	22	17	17	

1^{er} cycle: 95°C 10 mn
52°C 3 mn

2,5 U CETUS µl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
dNTP mix µl	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

2^{ème} cycle: 70°C 2mn

3^{ème} cycle: 92°C 2mn

52°C 2mn

70°C 2mn

4^{ème} cycle: 70°C 3mn

X 24

TABLEAU 5 : Protocole d'amplification enzymatique (PCR) de fragments de la séquence répétée du génome de LDV.

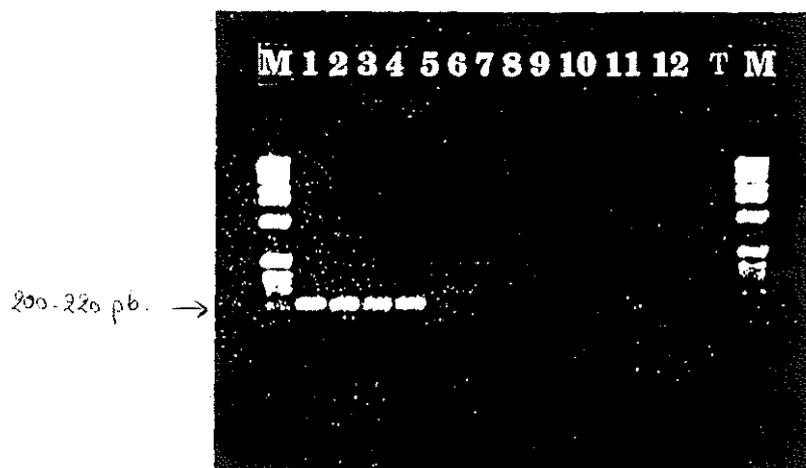


FIGURE 5 : Détection sur gel d'agarose des fragments amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques de la séquence répétée du LDV.

T: Témoin négatif (TE 6µl, MgCl₂ 5,5mM)

M: Marqueur de poids moléculaire d'ADN, échelle 1 Kb (BRL)

1, 2, 3 et 4: ADN de LDV (200 ng)

MgCl₂ 2,5 à 5,5 mM

5, 6, 7 et 8: ADN de cellules BF2 (200 ng)

MgCl₂ 2,5 à 5,5 mM

9, 10, 11 et 12: ADN de C.gigas (200 ng)

MgCl₂ 2,5 à 5,5 mM

La sensibilité relative de ces différents clones vis-à-vis du LDV a été estimée sur la base de la variation des titres établis pour des suspensions virales identiques (tableau 6).

Il apparaît qu'un clone, le 3G11, est réfractaire au LDV alors que les autres conduisent à des titres qui encadrent la valeur établie avec la lignée BF2 non clonée. Ces résultats suggèrent que les virions aient une efficacité d'infection différente selon la nature du clone cellulaire.

Ces clones ont tous été congelés, un plus grand nombre d'ampoules ayant été préparé pour le clone 1B6 qui est le plus sensible au LDV, afin de pouvoir disposer d'un stock suffisant au renouvellement régulier des cellules et éviter ainsi les problèmes de dérive génétique qui peuvent se traduire par une perte progressive de la sensibilité vis-à-vis du virus (ROBIN, comm. pers.).

2.2- Electroporation des cellules BF2

Un programme d'étude visant à l'inhibition de la réplication du LDV par ARN anti-sens nécessite au préalable de disposer d'une méthodologie d'introduction d'oligonucléotides et de plasmides dans les cellules BF2. La technique d'électroporation a été retenue d'une part, en raison de ses performances comparées à d'autres techniques classiques de transformation (MANN et KING, 1989; HAMA-INABA et al., 1986; BÖTTGER, 1988; SIMON et McENTEE, 1989) et d'autre part, en vue de son application potentielle à l'incorporation d'oligonucléotides ADN ou ARN dans les cellules, qui pourrait fournir une méthodologie plus performante que les techniques de microinjection et de diffusion actuellement utilisées.

Les expériences ont été réalisées sur le clone 1B6 et ont pour but de préciser les paramètres d'électroporation des cellules n'induisant pas d'effet cytopathique. L'électroporation a été envisagée sur des cellules en suspension à forte densité (0,5 à 1×10^6 cellules/ml), préférentiellement à des cellules adhérentes pour lesquelles une hétérogénéité zonale dans la réponse aux chocs électriques avait été trouvée (résultats non montrés).

2.2.1- Détermination des paramètres d'électroporation

Des expériences préliminaires ont été réalisées pour déterminer les paramètres des chocs électriques induisant une électroperméabilisation des cellules. Une analyse multifactorielle a porté sur le nombre, la durée et l'intensité des chocs, leur fréquence ayant été fixée arbitrairement à 1 Hz. Les résultats récapitulés dans le tableau 7 révèlent une extrême variabilité des taux d'électroporation et de mortalité pour un même ensemble de paramètres. L'examen des moyennes indique que dans aucun cas le taux d'électroporation n'a été supérieur au taux de mortalité. Il a alors été supposé que le traitement enzymatique des cellules pour leur mise en suspension puisse

CLONES	TITRE (TCID/ml)
3G11	0
2E11 et 1C12	10 ^{1,6}
3F8, 2E4, 3B1 et 1B9	10 ^{1,7}
3F3	10 ^{1,8}
3F1	10 ^{2,2}
BF2 non clonées	10^{2,3}
1E2	10 ^{2,4}
1G3	10 ^{2,5}
3H10	10 ^{2,6}
3B5, 3G6, 1C9, 3E12 et 2B9	10 ^{2,7}
2B6	10 ^{2,8}
1F2	10 ^{2,9}
3C6, 3D10 et 1E7	10 ³
2C6	10 ^{3,2}
2G11 et 1F8	10 ^{3,3}
1C6	10 ^{3,5}
2E6	10 ^{3,9}
1B6	10 ⁴

Tableau 6: Titres obtenus par la méthode de REED et MEUNCH pour les différents clones de BF2.

Durée(ms) Nombre	0,005	0,05	0,1	0,2	0,5			1	5	V/cm
	5					20/35				
10	7/2			52/82	76/85 72/75	78/59 79/68	79/76 84/84 (78/74,4)			2000
		35/44	26/45	45/20 46/58 (45,5/39)	75/91 69/86 70/69 72/73 81/67	82/84 78/82 70/70 66/83	81/67 78/70 78/77 84/86	83/59		1700
				60/95 30/28 (45/61,5)	70/68 75/36 42/70 61/42	71/74 47/16 46/71	75/59 80/79 62/59	82/48	75/95	1500
				41/64 17/20 (29/42)	51/82 59/54 19/31	70/82 75/15 21/17	55/47 42/49 29/12 (46,8/43,2)	50/35		1200
				14/17	40/28 6/13	30/42 10/13	14/12 11/7 (18,5/19,2)	14/29		1000
					6/11	4/1 (5/6)				600
20				66/96 80/30	87/75 74/83					1500 1200
					85/84	52/91 (68,5/87,5)				2000
Témoins: 9/37 6/33 14/31 18/19 5/9 5/32 7/23 7/26 10/10 8/11 8/3 6/6 5/12 5/7 0/1 13/38 6/12 (7,7-18,2)										

Caractères gras: % de cellules perméabilisées
Caractères normaux: % de cellules mortes 15 h. après
l'électroporation
Chaque couple de valeurs correspond à un essai.
Les moyennes sont entre parenthèses.

TABLEAU 7: Influence du nombre (fréquence 1 Hz) et de la durée des chocs électriques sur la perméabilisation et la mortalité des cellules à différentes intensités.

les sensibiliser de façon extrême au traitement ultérieur d'électroporation.

L'examen microscopique de cultures de cellules trypsinées selon le protocole standard, et maintenues en suspension en utilisant un système d'agitation magnétique (type Technomara) a révélé que le nombre de cellules viables diminue rapidement en quelques jours : 50 % après 24 heures, 75 % après 7 jours.

Un traitement alternatif pour la dissociation des cellules a donc été recherché dans la mesure où la trypsination classique pourrait être traumatisante. La trypsinase et la collagénase ont été testées à des concentrations inférieures à celles généralement préconisées pour le repiquage de cellules. La trypsinase diluée d'un facteur 10^{-4} par rapport à la concentration standard (2 g/l) et la collagénase à la concentration de 10^{-8} U/ml, permettent une dissociation efficace des cellules après 10 minutes d'incubation à 23°C.

2.2.2- Electroperméabilisation et survie cellulaires en fonction du traitement de mise en suspension

Une série d'expériences comparatives d'électroporation de cellules mises en suspension par les différents traitements précédemment décrits a été réalisée. Les paramètres d'électroporation ont été choisis par référence aux essais préliminaires et aux travaux de ROLS (1989) : 10 impulsions ; fréquence 1 Hz; durée 0,5 ms; intensité variable. D'après les moyennes établies pour plusieurs expériences, il est apparu qu'une meilleure survie des cellules, estimée 15 heures après l'électroporation est obtenue lorsque la dissociation du tapis cellulaire est plus douce alors que les taux de perméabilisation sont similaires (figure 6). Ainsi, pour une intensité de 1700 V/cm, il ne reste plus de cellules électroporées vivantes après une trypsination standard, alors que pour les traitements plus doux par la trypsinase ou la collagénase il reste respectivement 51 % ou 33 % de cellules électroporées parmi les cellules vivantes.

2.2.3- Effet de la densité des cellules en culture

Les résultats des essais décrits précédemment ont montré une variabilité notable en fonction des expériences. L'état des cultures cellulaires au moment de la mise en suspension a alors été prise en considération en testant le paramètre densité cellulaire au moment de la dissociation. Dans ce but, une deuxième série d'expériences a été réalisée sur des fioles testées individuellement. Celles-ci ont étéensemencées le même jour, à des densités variables. L'électroporation a eu lieu 10 jours plus tard, alors que les cellules étaient en phase exponentielle de croissance, les tapis cellulaires ayant des densités comprises entre 21×10^3 et 140×10^3 cellules/cm².

Quelle que soit la densité initiale des cellules en culture, les tests d'électroporation ont été effectués avec des cellules mises en suspension selon différents traitements

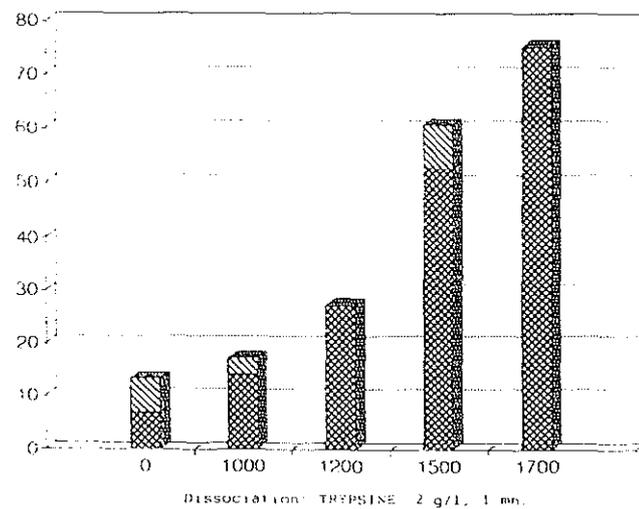
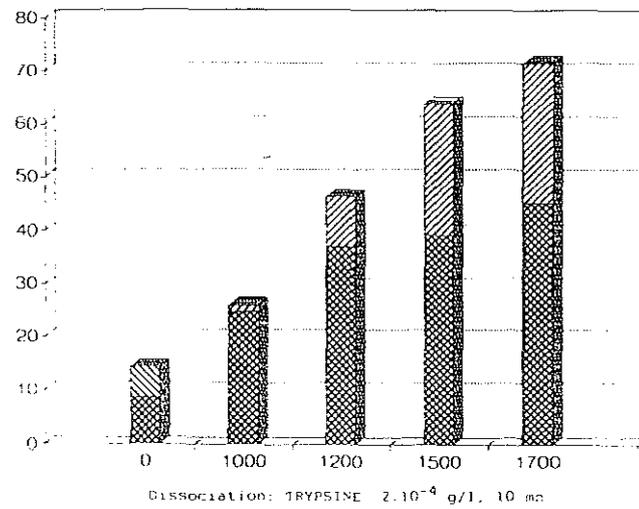
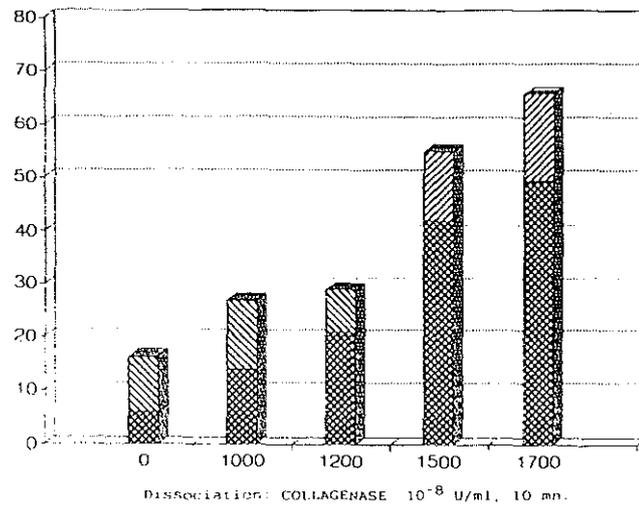
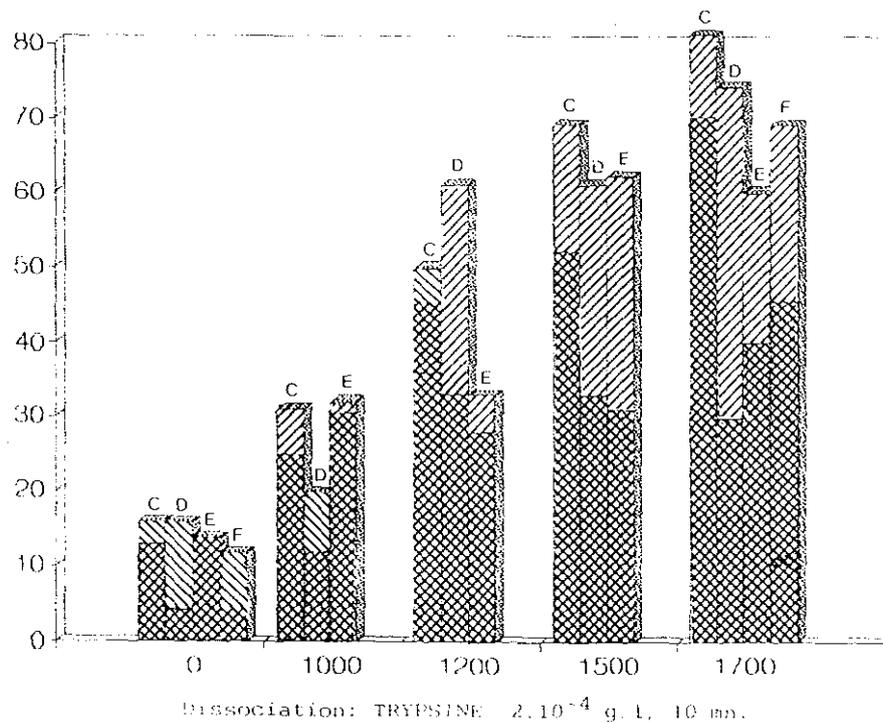
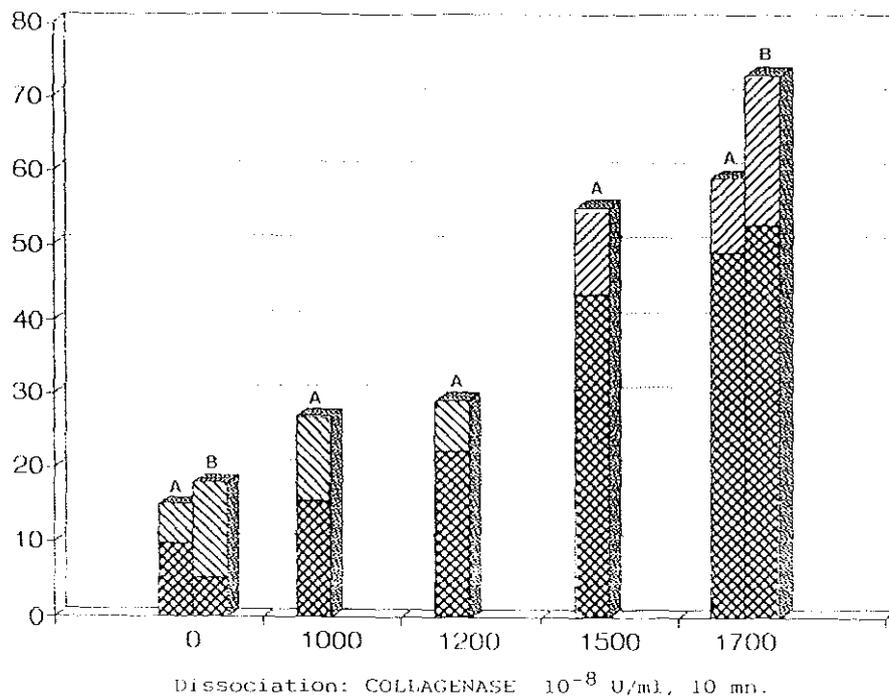


FIGURE 6: Effet du traitement de mise en suspension des cellules sur l'électroperméabilisation et la mortalité des cellules.

 % de cellules perméabilisées.
 % de cellules mortes 15h après l'électroporation.

(figure 7), les concentrations cellulaires étant strictement identiques dans la chambre d'électroporation lors de l'électroporation. Les valeurs obtenues sont à nouveau variables, mais ne semblent pas corrélées avec la densité d'origine des tapis cellulaires des différentes fioles.



- A : $33 \cdot 10^3$ cellules/cm²
 B : $59,3 \cdot 10^3$ cellules/cm²
 C : $52,5 \cdot 10^3$ cellules/cm²
 D : $80,8 \cdot 10^3$ cellules/cm²
 E : $140 \cdot 10^3$ cellules/cm²
 F : $21,1 \cdot 10^3$ cellules/cm²

▨ % de cellules perméabilisées.

▨ % de cellules mortes 15h. après l'électroporation.

FIGURE 7: Effet de la densité initiale des cellules en culture sur l'électroperméabilisation et la mortalité après mise en suspension par différents traitements.

DISCUSSION

DISCUSSION

Le premier axe de travail développé au cours de mon stage de DEA a été orienté vers la prophylaxie des iridoviroses de mollusques et de poissons marins basée, sur le développement de méthodes de diagnostic adaptées notamment à des études épidémiologiques de terrain.

La production d'anticorps monoclonaux a été entreprise selon le protocole d'hybridation lymphocytaire. Des anticorps ont été obtenus en s'affranchissant totalement de la purification de virus tant pour l'étape d'immunisation des souris pratiquée avec des extraits de cellules clarifiés, que pour le criblage des hybridomes. Pour ce dernier, la technique d'immunofluorescence indirecte a été choisie car, bien que non automatisable, elle permet d'analyser précisément la spécificité des anticorps en visualisant directement leur réactivité vis-à-vis de cultures cellulaires saines et virosées. Cette collection d'anticorps monoclonaux, en particulier ceux dont les épitopes sont présents sur des protéines relativement précoces, devra être caractérisée plus précisément.

Pris dans leur ensemble et avec les anticorps polyclonaux, ils constituent pour le groupe de Lymphocystivirus une série originale de réactifs qui pourront être rapidement utilisés dans le cadre d'études épidémiologiques. Dans cette perspective, les techniques d'immunofluorescence ou d'immunoperoxidase indirectes seraient particulièrement intéressantes car applicables à des diagnostics précoces sur des embryons de mollusques dont les cellules peuvent être facilement dissociées et cytocentrifugées (BOULO, comm. pers.). Par ailleurs, les protocoles d'immunisation et de criblage, indépendants de la disponibilité en virus purifié, pourront être appliqués à la préparation d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'OVVD de *C. gigas*, des souris pouvant être immunisées avec des homogénéisats de larves virosées, le criblage étant lui pratiqué en immunofluorescence indirecte, en parallèle sur des cellules embryonnaires saines et virosées. D'ores et déjà, des contacts ont été établis avec des équipes de pathologistes de plusieurs pays, notamment aux Etats-Unis avec celle de R.ELSTON (Batelle, état de Washington) pour tester ces anticorps sur des échantillons de larves d'huître japonaise, certaines ayant été fixées lors de mortalités associées à la présence de virus de type OVVD. Les différents laboratoires concernés par des problèmes de mortalités chez différentes espèces de poisson en association avec des virus de type LDV ou apparentés ont été approvisionnés en anticorps monoclonaux afin de tester leur spécificité et valider leur application pour le diagnostic.

Parallèlement à cette approche immunologique, le diagnostic de Lymphocystivirus a été envisagé par des méthodes de mise en évidence d'ADN viral, indépendamment ou à l'aide de réactifs spécifiques de type sondes nucléiques ou oligonucléotidiques.

Une approche indépendante de réactifs spécifiques et de la purification préalable de virus a consisté à extraire l'ADN d'un échantillon et à révéler la présence d'ADN viral par son profil de restriction. L'utilisation d'une ou deux enzymes de restriction pourrait alors être suffisante pour identifier le virus avec une relative fiabilité par référence aux cartes de restriction établies par DARAI (1983) pour deux autres souches de LDV isolées de deux espèces différentes de poissons. Cette méthodologie, utile pour l'acquisition de données épidémiologiques sur les souches de virus, est par contre mal adaptée à une application aux diagnostics de routine devant être pratiqués dans des structures d'élevage.

Le clonage de l'ADN viral a donc été entrepris après avoir purifié l'ADN viral sur gradient de chlorure de césium en présence de colorant de HOECHST. Ce procédé, qui ne nécessite pas de purifier préalablement le virus, constitue une solution de choix dans le cas des mollusques pour lesquels il n'existe pas de lignée cellulaire. Or, les essais d'isolement de virus ont toujours été infructueux en raison essentiellement de la consistance des tissus qui nécessite d'utiliser des détergents lors de l'isolement et de la purification d'agents pathogènes (MIALHE *et al*, 1985; MIALHE *et al*, 1988). En effet, en l'absence de ces tensioactifs, les rendements de purification sont quasiment nuls, alors que leur présence doit être inadéquate pour les virus de type LDV (ROBIN, 1983) compte tenu de leur forte teneur en lipides. Parmi les fragments clonés, des sondes seront judicieusement choisies sur la base de leur spécificité plus ou moins stricte à l'échelle du genre. Après marquage avec des enzymes (AVRAMEAS, 1969), ces sondes froides permettront d'appliquer les techniques de type dot-blot à des échantillons d'ADN brut, et de disposer ainsi d'un diagnostic très sensible d'iridoviroses.

L'amplification par PCR a été anticipée sur l'établissement et l'analyse des séquences de différentes souches de LDV, étapes indispensables à une sélection pertinente des paires d'amorces nucléotidiques (KUMAR, 1990). C'est donc dans une optique plus strictement méthodologique de traitement de l'échantillon que des essais ont été effectués en utilisant les informations disponibles dans les banques de données. Les séquences répétées du LDV, établies pour deux souches de virus provenant de flet et de plie, présentent une homologie de 99,86% entre les deux copies contenues dans le génome du virus isolé de flet et de 94,93% avec les séquences du virus de la plie (SCHNITZLER *et DARAI*, 1989). Il s'est avéré qu'aucune amplification n'était obtenue avec de l'ADN purifié d'huître japonaise ou d'ADN des cellules de poisson de la lignée BF2 mis en présence d'amorces correspondant à cette séquence répétée. Par contre, l'amplification spécifique par PCR a permis de détecter 1 fg d'ADN viral soit environ 10 copies de génome. Cette sensibilité est équivalente pour des échantillons de larves d'huître japonaise artificiellement contaminées par de l'ADN viral. Ces résultats préliminaires suggèrent que cette technique soit l'outil idéal pour diagnostiquer précocement le virus dans des productions larvaires d'huîtres ou de poissons, en tenant compte notamment

des possibilités d'automatisation du diagnostic et du traitement très rapide des échantillons qui consiste à "cuire" les larves. La simplicité et l'efficacité de ce traitement ont été établies et démontrées pour le diagnostic par PCR d'autres types d'agents infectieux (PERSING et al., 1989; WEBB et al, 1990).

A un niveau plus fondamental, les sondes ADN et les anticorps monoclonaux constituent des réactifs de choix dans des études *in vitro* ou sur culture cellulaire pour estimer la réplication virale et analyser l'effet inhibiteur de molécules anti-sens. Ces études nécessitaient dans un premier temps d'optimiser le système modèle : cellules BF2/LDV, et ont conduit rapidement au clonage de la lignée cellulaire BF2. Ainsi, l'hypothèse d'une hétérogénéité des cellules dans la lignée BF2 non clonée a été étayée par la mise en évidence d'un clone cellulaire réfractaire au LDV. Ceci peut expliquer la présence constante de cellules non infectées, quel que soit le titre des suspensions virales utilisées pour infecter la lignée BF2. Par ailleurs, l'observation de la variabilité du titre d'une suspension virale en fonction des clones suggère que, les multiplicités d'infection étant strictement équivalentes, les virions aient un pouvoir pathogène spécifique différent selon la nature du clone cellulaire.

Ce travail d'optimisation constituait une étape préliminaire à la poursuite du travail sur la réplication du LDV, notamment pour préciser les phases précoces de son cycle et identifier les transcrits précoces susceptibles de constituer des cibles pour une stratégie anti-sens. La sélection d'anti-sens (séquences, tailles et structures) efficaces pour inhiber la traduction de gènes viraux, repose sur des études réalisées *in vitro* et à l'échelle cellulaire.

Dans cette optique, la technique d'électroporation a été prise en compte pour son application potentielle à la transformation des cellules BF2 ou à l'introduction d'oligonucléotides de synthèse. Les expérimentations préliminaires se sont largement inspirées des travaux récents dans ce domaine (ROLS 1989; TEISSIE et ROLS, 1986). Les paramètres électriques ont pu être optimisés grâce à l'utilisation d'un colorant non perméant, le bleu trypan, relativement bien adapté à la détermination des taux de perméabilisation et de survie des cellules électroporées en suspension. D'autres essais seront nécessaires, d'une part pour limiter les effets cytopathiques du traitement de mise en suspension de cellules, d'autre part pour préciser les caractéristiques optimales des chocs électriques. Sur la base des paramètres expérimentaux qui ont été établis, l'électroperméabilisation pourrait être directement extrapolée à la transformation cellulaire par un plasmide (ROLS, comm. pers.), alors que son application à l'incorporation d'oligonucléotides ADN ou ARN de synthèse devra être expérimentée plus en détail car plus originale. De plus, d'autres méthodes d'introduction d'ADN devront être prises en compte comparativement à l'électroporation: précipitation au CaPO_4 , DEAE, liposomes.

Les motivations des travaux exposés dans ce rapport sont relativement appliquées puisqu'elles se situent dans le domaine de la prophylaxie de maladies virales.

Ce caractère appliqué sera prédominant dans les travaux ultérieurs qui concerneront le diagnostic. Par contre, les recherches visant à l'inhibition du virus par des molécules anti-sens seront essentiellement de nature fondamentale et porteront sur des travaux de virologie classique, qui s'inspireront largement des expérimentations développées pour le groupe des *Ranavirus* (*Iridoviridae*) sur le modèle FV3 (WILLIS *et al.*, 1990)

La stratégie d'inhibition virale par anti-sens qui motive ce travail mérite d'être discutée, par référence notamment aux plantes chez lesquelles elle peut être analysée comparativement à la sélection de plantes résistantes liée à l'expression de protéines de capsid (GRUMET, 1990). En effet, en dépit de résultats pratiques encore discutés, elle présente l'avantage d'être d'un point de vue théorique plus "facile" à élaborer car le niveau d'information nécessaire sur la biologie moléculaire du virus est certainement moindre pour perturber la traduction d'ARNm par des molécules anti-sens (TAKAYAMA *et al.*, 1990; INOUE, 1988; SIMONS, 1988; VAN DER KROL *et al.*, 1988) que pour obtenir l'expression de protéines ayant un effet inhibiteur sur la réplication virale. Cette argumentation, étayée en virologie animale par de nombreux travaux *in vitro* et en culture cellulaire, est renforcée par les progrès en cours sur les ribozymes grâce à la maîtrise de leur synthèse artificielle.

A l'instar des travaux développés chez les plantes (UCHIMIYA *et al.*, 1989; VAN DEN ELZEN *et al.*, 1989) et les animaux domestiques (PURSEL *et al.*, 1989), l'objectif à plus long terme est d'extrapoler ce modèle d'inhibition virale à l'échelle de l'organisme par l'obtention d'animaux transgéniques. C'est pourquoi les techniques de transfert de gènes, qui sont relativement bien maîtrisées chez plusieurs groupes zoologiques, en particulier chez les poissons (OZATO *et al.*, 1989), ont été récemment abordées chez les mollusques, dans le cadre d'un programme initié par l'IFREMER.

BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES

- AUBERTIN, A. M., T.N. THAM and L. TONDRE. , 1990. Regulation of protein synthesis in frog virus 3-infected cells. In *Molecular Biology of Iridoviruses*, (Ed. G. DARAI): 187-201.
- AVRAMEAS, S., 1969. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of conjugate for detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, 6 : 43-52.
- BÖTTGER, E.C., 1988. High-efficiency generation of plasmid cDNA libraries using electrotransformation. *BioTech.*, 9: 878-880.
- BOUCHARENC, V. and J.P., CADORET, 1989. Deux saisons de "télécaptage" de l'huître plate. *Aqua Revue*, 2: 37-41.
- COMPS, M., J.R. BONAMI, C .VAGO and A. CAMPILLO, 1976. Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci.*, Paris (D), 282: 1991-1993.
- COSSARINI-DUNIER, M., 1985. Le système immunitaire des poissons et la vaccination en pisciculture. *Le point vétérinaire*, 90: 342-352.
- DARAI, G., K. ANDERS, H.G. KOCH, H. DELIUS., H. GELDERBLOM, C. DAMALECOS and R.M. FLÜGEL, 1983. Analysis of the genome of Fish Lymphocystis Disease Virus isolated directly from epidermal tumours of *Pleuronectes*. *Virol.*, 126: 466-479.
- DARAI, G. and H. APFEL, 1985. Molecular cloning and stable amplification of the DNA molecules heavily methylated at CpG sequences using a new *E.coli* cell system (GC3). *Develop. Biol. Stand.*, 59: 3-9.
- DUDDING, L.R., A. HARINGTON and V. MIZRAHI, 1990. Endoribonucleolytic cleavage of RNA : oligodeoxynucleotide hybrids by the ribonuclease H activity of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 167: 244-250.
- ELSTON, R. and M.T. WILKINSON, 1985. Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD) *Aquaculture*, 48: 189-210.
- FLUGEL, R.M., 1985. Lymphocystis Disease Virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 116: 133-150.
- GRUMET, R., 1990. Genetically engineered plant virus resistance. *HortScience*, 25: 508-513.

HAMA-INABA, H., T. SHIOMI, K. SATO, A. ITO and M. KASAI, 1986. Electric pulse-mediated gene transfer in mammalian cells grown in suspension culture. *Cell Struct. Funct.*, 11: 191-197.

HANAHAN, D., 1983. Techniques for transformation of *E.coli*. *Meth. in Enzymol.*, Ed. RAY WU., Chap.VI.

INOUE, M., 1988. Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation - a review. *Gene*, 72 : 25-34.

JEANPIERRE, M., 1987. A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucl. Acid. Res.*, 22: 9611

KUMAR, R., 1989. The technique of polymerase chain reaction. *Technique - J. Meth. Cell Molec. Biol.*, 3: 133-152.

LANGDON, J.S., 1989. Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis.*, 12: 295- 310.

LANDEGREN, U., R. KAISER, C.T. CASKEY and L. HOOD, 1988. DNA diagnostics - Molecular techniques and automation. *Science*, 242: 229-237.

LINZ, U., U. DELLING and H. RÜBSAMEN-WAIGMANN, 1990. Systematic studies on parameters influencing the performances of the polymerase chain reaction. *J. Clin. Chem. Biochem.*, 28: 5-13.

MANN, S. and L. KING, 1989. Efficient transfection of insect cells with baculovirus DNA using electroporation. *J.Gen.Virol.*, 70: 3501-3505.

MIALHE, E., E. BACHERE, C. LE BEC and H. GRIZEL, 1985. Pathologie animale - Isolement et purification de *Marteilia* (Protozoa : Asctospora) parasites de bivalves marins. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 4: 137-.

MIALHE, E., E. BACHERE, D. CHAGOT and H. GRIZEL, 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture*, 71: 293-299.

MIALHE, E., V. BOULO, H. GRIZEL, H. ROGIER and F. PAOLUCCI, 1988. Monoclonal antibodies : a tool for molluscan pathology. *American Fisheries Society Special Publication*, 18: 304-310.

OZATO, K., K. INOUE and Y. WAKAMATSU, 1989. Transgenic fish : biological and technical problems. *Zoological Science*, 6: 445-457.

PAOLUCCI, F., 1983. Optimisation des techniques de préparation des anticorps monoclonaux par hybridation lymphocytaire. *Rapport de DEA Option Immunologie, Université de Montpellier*.

PEEPLES, M.E., 1987. Differential detergent treatment allows immunofluorescent localisation of the newcastle virus matrix protein within the nucleus of infected cells. *Virologie*, 162: 255-259.

PERSING, D. H., S.R. TELFORD III, A. SPIELMAN and S. W. BARTHOLD. 1990. Detection of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* ticks with the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microb.*, 28 (3) : 566-572.

PINTO, R.M., P. ALVAREZ-PELLITERO, A. BOSCH and J. JOFRE, 1989. Occurrence of a viral erythrocytic infection in the mediterranean sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Fish Dis.*, 12: 185-191.

PURSEL, V. G., C.E. REXROAD and D.J. BOLT, 1989. Gene transfer for enhanced growth of livestock. In *Animal Growth Regulation* (Ed. D.R. CAMPION, G.J. HAUSMAN and R.J. MARTIN): 359-375.

RALEIGH, E.A., 1987. Restriction and modification *in vivo* by *Escherichia coli* K12. *Methods in enzymology*, 152: 130-136.

ROBIN, J., C. LARIVIERE-DURAND and J. BERNARD, 1983. The chemical composition of Lymphocystis Disease Virus of fish. *Rev. Can. Biol. Exptl.*, 42: 173-176.

ROBIN, J., L. BERTHIAUME and A. LAPERRIERE, 1984. Etude des polypeptides de structure du virus de la maladie lymphokystique des poissons (Lymphocystis Disease Virus) multiplié en culture cellulaire. *Ann.Virol. (Inst. Pasteur)*, 135: 67-80.

ROBIN, J., A. LAPERRIERE and L. BERTHIAUME, 1986. Identification of the glycoproteins of Lymphocystis Disease Virus (LDV) of fish. *Arch. Virol.*, 87: 297-305.

ROLS, M.P., 1989. Electroporeabilisation de cellules animales approche biophysicochimique des mécanismes dans le cas des cellules de la lignée CHO. Thèse présentée devant l'université Paul Sabatier de Toulouse.

SARVER, N., E.M. CANTIN, P.S. CHANG, J.A. ZAIA, P.A. LADNE, D.A. STEPHENS and J.J. ROSSI, 1990. Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science*, 247: 1222-1225

SCHNITZLER, P. and G. DARAI, 1989. Characterization of the repetitive element in the genome of Fish Lymphocystis Disease Viruses. *Virology*, 172: 32-41.

SCHNITZLER, P., A. RÖSEN-WOLFF and G. DARAI, 1990. Molecular biology of Fish Lymphocystis Disease Virus. *Molecular Biology of Iridoviruses*, Ed. G.DARAI, Chap.10: 203-234.

SCHÖNHERR, O.T. and E.H. HOUWINK, 1984. Antibody engineering, a strategy for the development of monoclonal antibodies. *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol.*, 50: 597-623.

SIMON, J.R. and K. McENTEE, 1989. A rapid and efficient procedure for transformation of intact *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 164: 1157-1164.

SIMONS, R. W., 1988. Naturally occurring antisense RNA control - a brief review. *Gene*, 72 : 35-44.

STEIN, C.A. and J.S. COHEN, 1988. Oligonucleotides as inhibitors of gene expression : a review. *Cancer Res.*, 48: 2659-2668.

STITZ, L., H. HENGARTNER, A. ALTHAGE and R.M. ZINKERNAGEL, 1987. An easy and rapid method to screen large numbers of antibodies against internal cellular determinants. *J. Immunol. Meth.*, 106: 221-216.

TAKAYAMA, K.M., S. KURIYAMA, S. WEISS, K. CHADA, S. INOUE and M. INOUE, 1989. Antisense RNA-mediated inhibition of viral infection in tissue culture and transgenic mice. *Molecular biology of RNA.*: 299-310.

TAKAYAMA, K.M. and M. INOUE, 1990. Antisense RNA. *Biochem. Mol. Biol.*, 25: 155-184.

TEISSIE, J. AND M.P. ROLS, 1986. Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electroporabilisation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 140: 258-266

TOULME, J.J. and C. HELENE, 1988. Antimessenger oligodeoxyribonucleotides : an alternative to antisense RNA for artificial regulation of gene expression - a review. *Gene*, 72: 51-58.

UCHIMIYA, H., T. HANDA and D.S. BRAR, 1989. Transgenic plants. *J. Biotech.*, 12: 1-20.

VAN DEN ELZEN, P.J.M., M. J. HUISMAN, D. P-L WILLINK, E. JONGEDIJK, A. HOEKEMA and B. J. C. CORNELISSEN, 1989. Engineering virus resistance in agricultural crops. *Plant Mol. Biol.* 13: 337-346.

VAN DER KROL, A.R., J.N.M. MOL and A.R. STUITJE, 1988. Antisense gene in plants : an overview. *Gene*, 72: 45-50.

VAN DER KROL, A.R., J. N. M. MOL and A.R. STUITJE, 1988. Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques* 6 (10): 958-975.

WEBB, L., M. CARL, D.C. MALLOY, G.A. DASCH and A.F. AZAD, 1990. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microb.*, 28: 530-534.

WILLIS, D.B., J.P. THOMPSON and W. BECKMAN, 1990. Transcription of Frog Virus 3. *Molecular Biology of Iridoviruses*, Ed. G. DARAI, Chap.8: 173-201.

ANNEXES

ANNEXE 1

Caractéristiques principales des lymphocystivirus et virus apparentés.

A - PROPRIETES DE LA PARTICULE VIRALE

A.1 - BIOCHIMIE (LDV)

- Acide nucléique (1,6%) :
 - . Une molécule d'ADN db linéaire.
 - . PM = 61 à 201 Kpb, génome = 98 kpb.
 - . Redondance terminale.
 - . Densité = 1,69 g/cm².
 - . Méthylation des résidus cytosine : totaux = 22%, dans les séquences CpG = 74%.
 - . Séquences connues :
 - . Séquence répétée : 1413 pb, deux copies, deux ORF : 150 et 339 AA.
 - . Séquence du gène de la thymidine kinase : 950 pb, 318 AA.
- Protéines (42,3%) et glycoprotéines (39%) :
 - . Au moins 33 polypeptides (PM de 14 à 220 Kd) de structure, dont 10 glycoprotéines.
 - . Activités enzymatiques associées au virion : ATPase, DNase, protéine kinase, thymidine kinase.
- Lipides : 17,1%

A.2 - MORPHOLOGIE (OVVD ET AUTRES VIRUS DES MOLLUSQUES APPARENTES AUX LYMPHOCYSTIVIRUS , LDV)

- Icosaédrique.
- Diamètre = 230 à 380 nm.

B - REPLICATION

B.1 - CARACTERISTIQUES GENERALES DES IRIDOVIRIDAE

- Entrée du virion par pinocytose et décapsidation dans des vacuoles phagocytiques.
- Inhibition rapide de la synthèse des macromolécules de la cellule hôte et arrêt des divisions cellulaires.
- Transcription : apparemment nucléaire.
- Réplication de l'ADN : sites cytoplasmique et probablement nucléaire, peut-être selon le mécanisme du cercle roulant.
- Assemblage des particules : cytoplasmique, au niveau de viroplasmes (ou : corps d'inclusion paracrystallins).

B.2 - CARACTERISTIQUES SPECIFIQUES DU LDV

- Hypertrophie des cellules virosées qui s'entourent d'une capsule hyaline épaisse : cellules kystiques.
- Relarguage par rupture des cellules kystiques, plusieurs mois après l'infection. Pas de phase lytique ni de phénomène de bourgeonnement.

B.3 - CARACTERISTIQUES SPECIFIQUES DE L'OVVD

- Gonflement et détachement des cellules épithéliales du velum.

C - ASPECTS BIOLOGIQUES

- Hôtes :
 - . Classe des poissons : plusieurs dizaines de familles.
 - . Classe des mollusques : *Crassostrea angulata*, *Crassostrea gigas*.
- Transmission horizontale. Forte suspicion de transmission verticale.

ANNEXE 2

Détermination du titre (à 8 jours) d'une suspension virale selon la méthode de REED et MEUNCH.

Dilutions	A		B		% puits infectés
	Nombre de puits		Somme des puits		
	Infectés	Non infectés	Infectés	Non infectés	
1	8	0	32	0	100 %
10 ⁻¹	8	0	24	0	100 %
10 ⁻²	8	0	16	0	100 %
10 ⁻³	6	2	8	2	80 %
10 ⁻⁴	2	6	2	8	20 %
10 ⁻⁵	0	8	0	16	0 %
10 ⁻⁶	0	8	0	24	0 %
10 ⁻⁷	0	8	0	32	0 %
10 ⁻⁸	0	8	0	40	0 %
10 ⁻⁹	0	8	0	48	0 %
10 ⁻¹⁰	0	8	0	56	0 %

Les chiffres de la colonne B sont obtenus par addition successive des chiffres de la colonne A allant de bas en haut pour ce qui est des puits infectés et de haut en bas pour ce qui est des non infectés. Cet artifice de calcul permet d'augmenter le nombre de puits dans chaque lot et donc la précision statistique sur la mesure du pourcentage de puits infectés. Celui-ci est calculé à partir de la colonne B et non pas de la colonne A.

On obtient le TCID (Tissue Culture Infectious Dose) par calcul de la "distance proportionnelle" pour les deux dilutions les plus proches de 50 % :

$$\frac{80 - 50}{80 - 20} = 0.5$$

$$TCID = 10^{3.5}$$

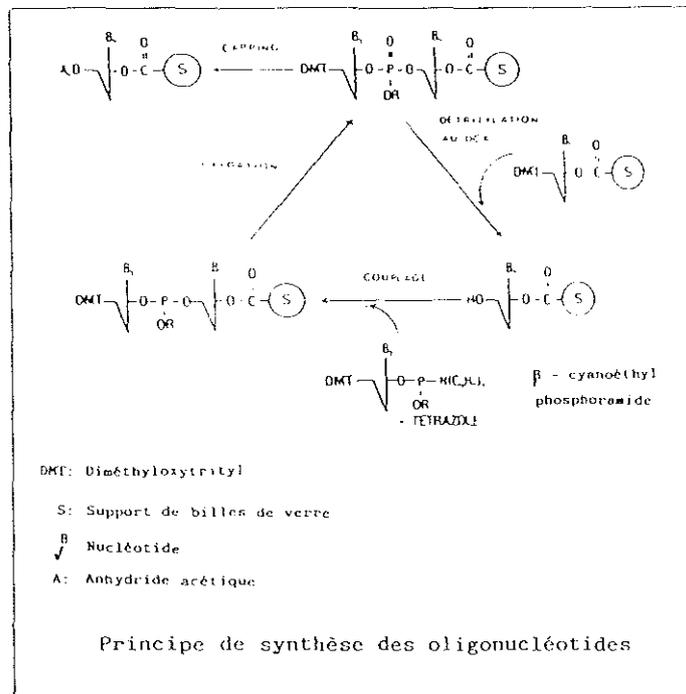
Le titre est obtenu en tenant compte du volume de l'inoculum (50 µl)

$$\frac{10^{3.5} \times 1000}{50} = 20 \cdot 10^{3.5} = 10^{4.8} / \text{ml}$$

ANNEXE 3

Principe de la synthèse d'A.D.N.

Le principe de la synthèse d'A.D.N., repose sur l'utilisation de β -cyanoéthyl phosphoramidites (nucléotide). Un premier nucléotide est fixé sur un support de billes de borosilicates par son extrémité 3'. L'extrémité 5' est protégée par un groupement diméthoxytrityl (D.M.T.). La première étape du cycle consiste à éliminer cette protection grâce à l'acide dichloroacétique (D.C.A.) pour permettre dans un deuxième temps, le couplage avec un β -cyanoéthyl phosphoramidites (nucléotide) en présence de tétrazole qui agit comme activateur de la réaction chimique. Le phosphore est rendu pentavalent par oxydation à l'iode, et un nouveau cycle peut alors être reconduit. Le cycle de polymérisation est résumé sur le schéma suivant:

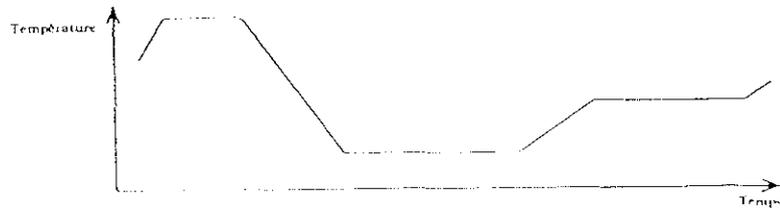
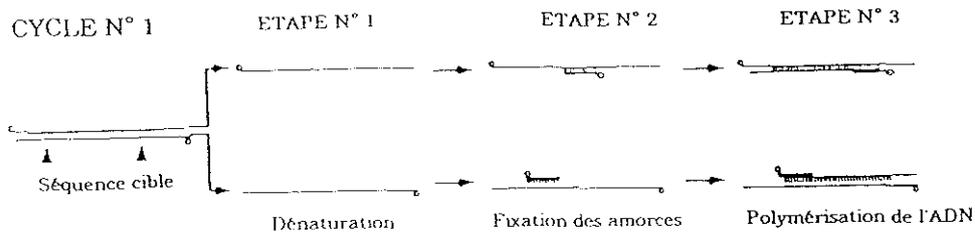


Lorsque le polynucléotide est achevé, l'extrémité 5'OH libre est protégée par l'anhydride acétique (A) (étape de "capping").

ANNEXE 4

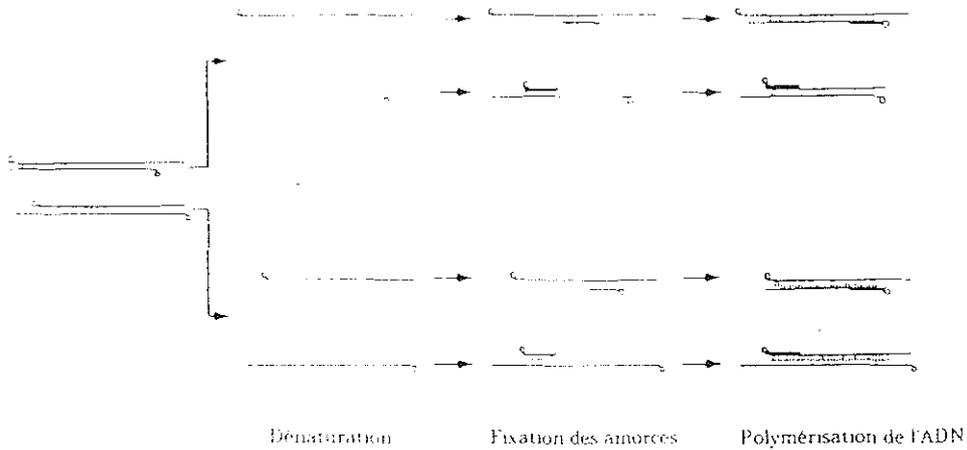
Principe de la PCR

La technique d'amplification enzymatique par PCR (LINZ, 1990) est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase. Cette enzyme est capable de copier un brin d'ADN utilisé comme matrice, en un brin complémentaire par élongation à partir de l'extrémité 3' OH libre d'une amorce oligonucléotidique. Cette technique consiste à effectuer n cycles successifs d'amplification de la séquence d'ADN double brin qu'ils encadrent. Un cycle d'amplification est composé de 3 étapes permettant de réaliser successivement la dénaturation de l'ADN (95°C), l'hybridation des amorces (52°C) et l'extension des brins d'ADN par l'ADN polymérase. Pour éviter l'addition d'enzymes à chaque cycle, une ADN polymérase pouvant résister à 100°C est utilisée (Taq polymérase).



3 étapes d'un cycle d'amplification enzymatique.

CYCLE N° 2



CYCLE N° 3

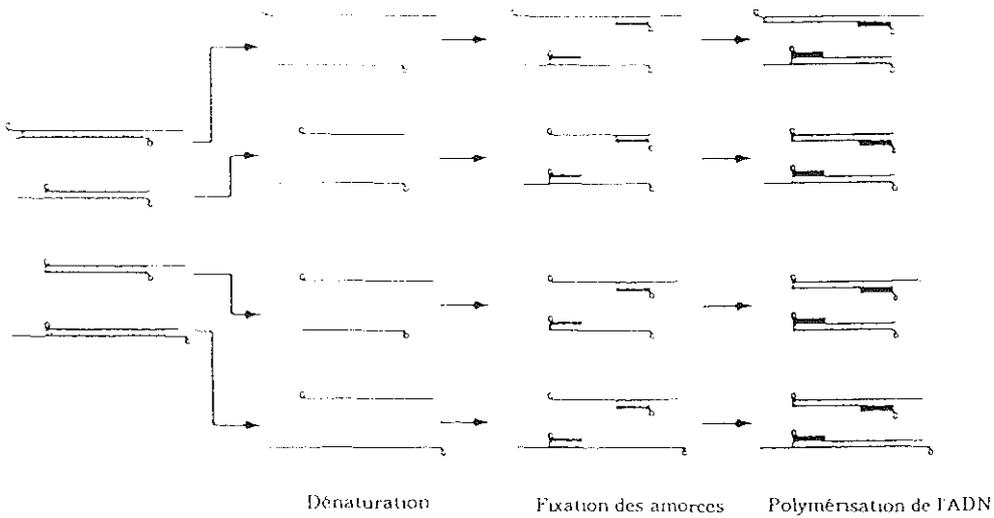


Schéma du principe de 3 cycles successifs d'amplification enzymatique.