

MEMOIRE

Présenté par

Philippe AUDIOT

Titulaire du DELAM (Diplôme d'Etat de Laborantin d'Analyses Médicales) en vue de la validation de la formation post-BTS Biologie Moléculaire dispensée au Lycée technique St Louis à Bordeaux

INITIATION AUX TECHNIQUES

DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEES

A LA PATHOLOGIE VIRALE DES INVERTEBRES MARINS

Unité de Recherche en Pathologie,
Immunologie et Génétique Moléculaire
17 390 La Tremblade

Janvier 1992



MEMOIRE

Présenté par

Philippe AUDIOT

Titulaire du DELAM (Diplome d'Etat de Laborantin d'Analyses Médicales) en vue de la validation de la formation post-BTS Biologie Moléculaire dispensée au Lycée technique St Louis à Bordeaux

INITIATION AUX TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEES A LA PATHOLOGIE VIRALE DES INVERTEBRES MARINS

**Unité de Recherche en Pathologie,
Immunologie et Génétique Moléculaire
17 390 La Tremblade**

Janvier 1992

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Evelyne BACHERE, responsable de l'unité URPIGM qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire.

C'est avec plaisir que je remercie Marc OHRESSER et Rose Marie LE DEUFF pour m'avoir encadré tout au long de ce stage et conseillé pour la rédaction de ce mémoire, ainsi que pour leur amitié.

Enfin, je m'adresse à toute l'équipe de l'unité URPGIM pour sa gentillesse et son aide généreuse.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p 1
MATERIELS ET METHODES	p 3
1- MATERIELS BIOLOGIQUES	p 3
1.1- Les Baculovirus	
1.2- Les Lymphocystivirus.	
2- EXTRACTION D'ADN	p 3
2.1- ADN génomique	
* ADN de crevettes infectées par du Baculovirus	
* Purification d'ADN par gradient de chlorure de césium en présence du colorant de Hoechst	
2.2- ADN plasmidique	
* Minipréparation : "boiling method" modifiée de Sambrook <i>et al.</i> (1989)	
* Maxipréparation	
2.3- Quantification de l'ADN	
* Par spectrophotométrie	
* Méthode de "Saran-Wrap"	
3- CLONAGE	p 6
3.1- Souche bactérienne et vecteur de clonage	
* Souche bactérienne	
* Vecteur de clonage	
3.2- Préparation de l'insert	
3.3- Construction des plasmides recombinants	
3.4- Mise en compétence des bactéries	
* Détermination de la DO correspondant à la densité bactérienne optimale	
* Préparation des cellules compétentes	
3.5- Transformation	
4- MARQUAGE DES SONDES ET HYBRIDATIONS	p 9
4.1- Transfert d'ADN (Southern, 1975)	
4.2- Préparation des sondes	
4.3- Hybridation des membranes avec des sondes marquées	
5- AMPLIFICATION DES SEQUENCES PAR P.C.R. (POLYMERASE CHAIN REACTION)	p 10
5.1- Préparation de l'ADN cible	
5.2- Amorces	
5.3- Réaction d'amplification par P.C.R.	
6- UTILISATION DU SYSTEME D'EXPLOITATION BISANCE	p 11

RESULTATS

- 1- PURIFICATION D'ADN DE BACULOVIRUS p 13
- 1.1- Essais de purification d'ADN viral AcMNPV à partir de cellules SF9 (*Spodoptera frugiperda*) infectées
 - 1.2- Purification d'ADN viral à partir de crevettes (*Penaeus vannamei*) infectées
- 2- PREPARATION DE SONDE VIRALE D'AcMNPV SPECIFIQUE DU GENE
DNA POLYMERASE p 14
- 2.1- Préparation des cellules compétentes
 - 2.2- Contrôle de ligation
 - 2.3- Clonage du fragment *Pst*I-H de AcMNPV
 - 2.4- Etude des colonies recombinantes
- 3- SOUTHERN BLOT : LOCALISATION DU GENE DE LA POLYHEDRINE SUR L'ADN
DE BACULOVIRUS p 16
- 4- DIAGNOSTIC VIRAL PAR P.C.R. p 17
- 4.1- Choix des amorces
 - 4.2- Amplification
- 5- RECHERCHE DE SEQUENCES CONSERVEES DANS LE GENE DE LA DNA
POLYMERASE DES HERPESVIRIDAE p 18

DISCUSSION p 20

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

AcMNPC : *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus
ADN : acide désoxyribonucléique
ATP : adénosine 5'triphosphate
bp : paire de bases
BrEt : bromure d'éthidium
CsCl : chlorure de césium
dATP : désoxyadénosine triphosphate
dCTP : désoxycytidine triphosphate
dGTP : désoxguanidine triphosphate
DO : densité optique
dTTP : désoxythymidine triphosphate
ETDA : acide éthylène diamine tétracétique
kb : kilobase
LDV : Lymphocystis Disease Virus
PCR : Polymerase chain reaction
RNase : ribonucléase
SDS : sodium dodécyl sulfate
TE : Tris-HCl EDTA
UV : ultraviolet
X-Gal : 5-bromo4-chloro3-indolyl -D-galactopyranoside

INTRODUCTION

L'importance économique à l'échelle mondiale des mollusques et des crustacés en aquaculture a conduit au développement de recherches en pathologie infectieuse, qui représente un aléa majeur pour les productions. En effet, quel que soit l'espèce élevée et le pays concerné, les élevages sont fréquemment perturbés par différents types d'agents pathogènes, protozoaires intracellulaires, bactéries et virus.

Les maladies virales constituent le problème majeur pour l'aquaculture comme le montrent les chutes de production de crevettes dues à des Baculovirus, Picornavirus ou des Parvovirus (Lightner, 1983), ou l'épidémie de l'huître portugaise et des mortalités de l'huître japonaise dues à des Lymphocystivirus et des virus de type Herpesviridae. En effet, un Iridovirus a été décrit chez l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, (Comps *et al.*, 1976) et impliqué dans la disparition de cette espèce d'huître des côtes françaises, entre 1969 et 1971. Cet Iridovirus présente des similitudes extrêmes, d'un point de vue ultrastructural avec le Lymphocystivirus, LDV (Lymphocystis Disease Virus), agent pathogène connu chez un certain nombre de poissons marins. Par ailleurs, aux Etats Unis, un virus du même type (OVVD, Oyster Velar Virus Disease) a été associé à des mortalités massives de larves d'huître japonaise, *Crassostrea gigas*, en écloserie (Elston et Wilkinson, 1985). Enfin, très récemment, des mortalités de larves et de naissains d'écloserie de cette même espèce d'huître ont été observées en Bretagne et l'agent infectieux, caractérisé en microscopie électronique, a été identifié comme un virus apparenté à la famille des Herpesviridae (Nicolas et Comps, communication personnelle).

Dans ce contexte, il apparaît que la virologie constitue chez les invertébrés marins d'intérêt aquacole, un domaine de recherches prioritaire à développer. C'est pourquoi des travaux ont été initiés à l'Unité de Recherches en Pathologie, Immunologie et Génétique Moléculaire des Invertébrés Marins (IFREMER, La Tremblade) d'une part, sur la mise au point de méthodes de diagnostic adaptées aux contrôles zoosanitaires et à des mesures de prophylaxie, et d'autre part, sur l'obtention de souches résistantes aux virus par l'inhibition de la réplication virale selon la stratégie anti-sens. Cette inhibition virale repose sur la fixation d'oligonucléotides ou d'ARN anti-sens dont les séquences sont complémentaires d'ARN messager, provoquant le blocage des ribosomes et donc l'arrêt des synthèses des protéines indispensables à la réplication virale.

Compte tenu de l'absence de lignée cellulaire de mollusques et de crustacés, il n'existe pas de modèle viral spécifique de ces animaux. De ce fait, les recherches ont été entreprises sur un Baculovirus d'insecte, *Autographa californica*, Multiple embedded Nuclear Polyhedrosis Virus (AcMNPV, produit sur lignée cellulaire Sf9 de *Spodoptera frugiperda*) et le Lymphocystivirus de poissons (LDV, produit sur lignée cellulaire de poisson, BF2).

Les résultats acquis sur la caractérisation génétique de ces virus hétérologues pourront être extrapolés aux virus d'invertébrés marins. Ainsi, sur la base d'homologie de séquences, des gènes cibles peuvent être recherchés sur les virus spécifiques de crustacés et de mollusques, par techniques d'hybridation ou de PCR.

En ce qui concerne les Baculovirus, deux gènes peuvent être retenus:

- le gène de la polyédrine qui est une protéine majeure exprimée en phase tardive de réplication, présente un intérêt pour une application dans le diagnostic des virus. Il constitue le gène de référence pour l'orientation de la carte physique des baculovirus (Vlak et Smith, 1982).
- le gène de la DNA polymérase virale nécessaire à la réplication virale constitue un gène cible dans le cadre de la stratégie anti-virale par anti-sens.

Par ailleurs ce gène de DNA polymerase, hautement conservée entre les virus à ADN double brin (Tomaski *et al.*, 1988) pourra être également recherchée, sur la base d'homologies de séquences dans le génome des *Herpesviridae* de l'huître.

Dans le cadre de mon stage, je me suis initié aux différentes techniques de base de biologie moléculaire, s'inscrivant dans les deux axes de recherches développés à l'URPIGM sur la stratégie anti-virale et la mise au point de méthodes de diagnostic des maladies virales des invertébrés marins.

MATERIEL ET METHODES

1- MATERIELS BIOLOGIQUES

1.1- Les Baculovirus

Les crevettes post-larves *Penaeus vannamei*, infectées par le *Baculovirus penaei* proviennent d'une éclosérie d'Equateur. L'infection est diagnostiquée par la présence de polyèdres. Elles ont été expédiées en France dans un récipient isotherme en présence de carboglace puis stockées à -80°C .

Le baculovirus d'insecte, *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV), est produit sur lignée cellulaire d'insectes SF9 (*Spodoptera frugiperda*) à 27°C . L'ADN des cellules SF9 saines, l'ADN des cellules infectées par AcMNPV et l'ADN de AcMNPV purifié ont été préalablement extraits au laboratoire.

1.2- Les Lymphocystivirus.

Des tissus infectés par différents isolats de Lymphocystis Disease Virus (LDV, Iridoviridae) sont utilisés:

- kystes de Flet (*platychtis flesus*) provenant de la rivière Elbe (Allemagne)
- kystes de Dorade (*Sparus sp*) provenant d'un élevage de la côte méditerranéenne (France)
- LDV isolé de Perche (*Micropterus salmoïdes*) en 1962 et propagé sur la lignée cellulaire BF2 de poisson *Lepomis macrochirus*.

2- EXTRACTION D'ADN

2.1- ADN génomique

* ADN de crevettes infectées par du Baculovirus

L'extraction d'ADN est réalisée selon le protocole de Sambrook *et al.* (1989) sur des pénéides post-larves. L'échantillon encore congelé est immergé et broyé dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier. Après évaporation de l'azote, la poudre fine obtenue est délayée dans 20 ml de tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 0,1 M, pH 8; RNase A, 20 $\mu\text{g/ml}$; SDS 0,5 %) et incubée 1 heure à 37°C . Cette solution est alors traitée à la protéinase K (100 $\mu\text{g/ml}$, 3 heures à 50°C). Les acides nucléiques sont ensuite extraits trois fois par un volume de phénol saturé en Tris-HCl (0,5 M, pH 8) puis les phases sont séparées par centrifugation (5 mn, à 2000 g, 20°C). La phase aqueuse est recueillie et ajustée à une concentration de 0,3 M d'acétate de sodium pH 5,2, puis additionnée de 2 volumes d'éthanol absolu froid. Les deux dernières étapes sont suivies d'une agitation. Cette solution est conservée à -20°C pendant une nuit pour obtenir une précipitation des acides nucléiques. Après une centrifugation de 30 minutes à 5000 g, le culot est

lavé par l'éthanol 70 %, puis recentrifugé 15 minutes, séché et repris dans du tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1mM pH8).

* Purification d'ADN par gradient de chlorure de césium en présence du colorant de Hoechst

Les acides nucléiques sont séparés par ultracentrifugation isopycnique en chlorure de césium (CsCl 1,25 g/ml, 250.000 g rotor vertical, 15 h) en présence du colorant de Hoechst n°33258 (50 µg/ml). Le chlorure de césium est dissout dans la suspension d'ADN puis la solution stock de colorant de Hoechst est ajoutée. Ce colorant est un agent intercalant augmentant la différence de densité des ADN suivant leur teneur relative en nucléotides A et T (Karlovsky et Cock,1991). L'ADN est visualisé dans les tubes d'ultracentrifugation en polyallomère par illumination aux rayons ultra violet (UV). Ces tubes sont montés sur un fractionneur de gradient branché en série avec une cellule de mesure de l'absorbance et un collecteur de fractions (ISCO), l'absorbance à 254 nm est mesurée en continu. Les fractions retenues (correspondant à des pics d'absorbance) sont regroupées et dialysées contre du tampon TE. Le colorant de Hoechst est préalablement éliminé par plusieurs extractions à l'isobutanol. Le dialysat obtenu est concentré par précipitation éthanolique (décrit ci-dessus).

2.2- ADN plasmidique

* Minipréparation : "boiling method" modifiée de Sambrook *et al.* 1989

Une colonie recombinante est inoculée dans 1 ml de milieu SOB (bactotryptone 2 %; bacto-yeast extract 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; pH 7) contenant de l'ampicilline (50 µg/ml) puis la culture est incubée sous agitation toute la nuit à 37°C. Les bactéries sont recueillies par centrifugation dans des microtubes de 1,5 ml (30 sec, 6000 g). Le culot est resuspendu avec 400 µl de tampon STET (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 10mM, pH 8; EDTA 1 mM, pH 8; triton X-100 5%). Après addition de 30 µl de solution de lysozyme (10 mg/ml dans Tris-HCl 10 mM, pH 8), le lysat est incubé 40 secondes dans de l'eau bouillante et centrifugé (10 mn, 6000 g). Le culot visqueux est éliminé à l'aide d'un cure-dents et le surnageant, additionné de 40 µl d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2), est précipité par 500 µl d'isopropanol. Le tube est agité, incubé 30 minutes à -20°C et centrifugé 10 minutes à 6000 g. Après rinçage à l'éthanol 70 % et centrifugation, l'ADN plasmidique est repris dans 50 µl de TE contenant 20 µg/ml de RNase A. Après inactivation de la RNase par la chaleur, l'ADN est conservé à -20°C.

* Maxipréparation : méthode modifié de Garger *et al.*, 1983

Cinq cents millilitres de milieu SOB contenant de l'ampicilline (50 µg/ml) sont inoculés par une préculture de bactéries recombinantes et placés sous agitation toute la nuit à 37°C .

Après une centrifugation de la culture (15 mn, 2500 g, 4°C), le culot est remis en suspension dans 67,5 ml de Tris-HCl (25 mM, pH 8), EDTA (10 mM, pH 8), glucose (0,9 %), prérefroidis dans la glace, puis 134,4 mg de lysozyme sont ajoutés. Le mélange est agité vigoureusement puis incubé 30 minutes dans la glace en agitant toutes les 5 minutes. Après addition de 16,8 ml d'une solution de sarkosyl (3,33 %) et NaOH (0,667 M), ce mélange est agité doucement et incubé dans la glace. Après 5 minutes, 43,2 ml d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2) sont additionnés avec agitation douce et le mélange est laissé 30 minutes dans la glace.

Après centrifugation (30 mn, 9000 g), le surnageant obtenu est précipité par 72 ml d'isopropanol 20 minutes à température ambiante puis recentrifugé (30 mn, 9000 g, 4°C). Le culot est lavé à l'éthanol 70 %, séché et repris dans 4,8 ml de tampon TE.

Un gradient préformé de chlorure de césium est préparé : il est constitué de zones de deux densités différentes. La première a une densité de 1,465 (12,6 g de CsCl dans du TE qsp 20 ml), la deuxième une densité de 1,8 (4,8 ml d'ADN; 8,4 g de CsCl et 0,8 ml de BrEt à 10 mg/ml). La solution de CsCl, contenant l'ADN et le BrEt, est centrifugée (5 mn, 2000 g) pour éliminer les protéines surnageantes. L'ADN plasmidique est purifié par ultracentrifugation isopycnique à 250.000 g (rotor vertical), pendant 16 heures à 20°C. La bande inférieure correspondant à l'ADN plasmidique super-enroulé est récupérée à l'aide d'une seringue, et le bromure d'ethidium (BrEt) est ensuite extrait à l'isobutanol. La solution est diluée au quart par de l'eau afin d'empêcher la précipitation du CsCl puis précipitée par 2 volumes d'éthanol absolu à 4°C en présence d'acétate de sodium (0,3 M final; pH 5,2). Après rinçage à l'éthanol à 70%, l'ADN est dissout dans un 1 ml de TE et quantifié au spectrophotomètre à 260 nm.

2.3- Quantification de l'ADN

* Par spectrophotométrie

Une lecture sur un spectre d'absorbance à 260 et 280 nm est effectuée sur des dilutions successives de l'ADN de façon à obtenir une densité optique (DO) inférieure à 1 unité. Dans le cas d'ADN très concentré, la densité optique n'est pas proportionnelle à la concentration réelle en ADN. Une vérification par la mesure de DO de différentes dilutions de l'ADN est nécessaire pour obtenir un résultat fiable. En tenant compte du facteur de dilution, la quantité d'ADN est estimée sur la base d'une absorbance à 260 nm égale à une unité de DO pour une concentration d'ADN de 50 µg/ml. Le degré de pureté de l'ADN est vérifié en calculant le rapport des absorbances à 260 nm et à 280 nm (spécifique des protéines).

* Méthode de "Saran-Wrap"

Cette méthode consiste à comparer, par transillumination aux UV, la fluorescence des gouttes de la solution d'ADN de l'échantillon à différentes dilutions, à la fluorescence des gouttes d'une gamme étalon d'ADN plasmidique de 0 à 20 ng.

Un microlitre de chacune des solutions est additionné sur le film transparent "Saran-Wrap", tendu sur la table de transillumination aux UV, à 1 μ l de TE contenant du BrEt (2 μ g/ml). La concentration de l'ADN de l'échantillon est estimée selon son intensité de fluorescence comparativement à celle des solutions de la gamme étalon.

3- CLONAGE

L'ensemble du protocole est schématisé en annexe 1

3.1- Souche bactérienne et vecteur de clonage

* Souche bactérienne

La souche XL1-Blue d'*Escherichia coli* a été choisie pour le chromosome porteur d'un épisome F' contenant les gènes *lacI^q* et *lacZ Δ M15* complétant le gène *lacZ* du vecteur et également le gène de résistance à la tétracycline.

Afin d'éviter les pertes d'épisome F' par délétion, responsables de colonies blanches donnant des "faux positifs", cette souche est cultivée dans un milieu contenant de la tétracycline (12,5 μ g/ml).

* Vecteur de clonage

Le vecteur Bluescript KSII+ (Stratagene, annexe 2), possède un multisite de clonage de 21 sites de restriction uniques inclus dans la portion N terminale du gène *lacZ* et un gène de résistance à l'ampicilline. Les bactéries Lac⁻, mais possédant un vecteur Bluescript KSII+ sans insert dans le multisite de clonage, produisent des colonies bleues sur le milieu sélectif contenant du X-gal, substrat chromogène de la β -galactosidase. Les bactéries transformées par un plasmide recombinant sont blanches, l'insert interrompant le gène *lacZ* du plasmide.

3.2- Préparation de l'insert

L'ADN viral de AcMNPV purifié est hydrolysé par l'enzyme de restriction *Pst*I (Boehringer)(5 U/ μ g d'ADN, 1 h à 37°C), puis migré sur gel d'agarose (0,8 %, 10 V/15 cm, 24h). Après migration et coloration au bromure d'éthidium, le fragment de restriction intéressant est repéré aux UV, puis la portion de gel correspondante est découpée au scalpel. Le fragment est extrait de l'agarose en utilisant le kit GENE CLEAN (Ozyme): le morceau d'agarose est dissout dans 2,5 fois son volume de NaI 6M par chauffage à 50°C pendant 5 minutes environ. Un microlitre de suspension de billes de verre "glassmilk" est ajouté dans le tube. Au cours des 10

minutes d'incubation dans la glace, l'ADN se fixe sur les billes. Une brève centrifugation permet la mise au culot des billes et l'élimination du surnageant. Le culot est lavé à trois reprises par resuspension des billes dans 0,5 ml de solution de lavage et centrifugation brève. Les billes et l'ADN adsorbé sont alors repris dans 20 μ l de tampon TE, pH8 et incubés 5 minutes à 50°C afin de décrocher l'ADN. Les billes sont mises au culot, et le surnageant est prélevé. La présence et la pureté des inserts sont contrôlées par électrophorèse sur minigel d'agarose, puis ils sont quantifiés selon la méthode "Saran-Wrap" (décrite en 2.3).

3.3- Construction des plasmides recombinants

Le vecteur de clonage (5 μ g) est linéarisé par l'enzyme de restriction *Pst*I (Boehringer). L'efficacité de la digestion enzymatique est contrôlée sur une fraction de l'ADN (0,1 μ g) par électrophorèse en gel d'agarose (0,8 %, 100 V/15 cm, 1 h). Après hydrolyse enzymatique, ce vecteur est extrait par du phénol saturé au Tris-Hcl (0,5 M, pH 8) puis par du chloroforme-alcool isoamylique (24-1) et est précipité par de l'éthanol absolu en présence d'acétate de sodium (pH 5,2; 0,3 M final). Le fragment de restriction (25 ng; 5,2 kb) et le vecteur linéarisé (5 ng; 3 kb) sont alors mis en présence de T4 DNA ligase (Gibco-BRL, 2 U, 4 h, 16°C) dans un volume de 10 μ l de tampon 1X T4 ligase en présence de 1 μ l d'ATP 5mM, le rapport molaire, insert sur vecteur, étant équivalent à 5.

3.4- Mise en compétence des bactéries

* Détermination de la DO correspondant à la densité bactérienne optimale

Cent millilitres de milieu SOB sont inoculés avec 1 ml de préculture de bactéries XL1-Blue. La mesure d'absorbance à 550 nm se fait toutes les 20 minutes jusqu'à stabilisation de la valeur de la DO. En parallèle, à partir d'une DO égale à 0,350, on effectue toutes les 40 minutes un ensemencement avec 100 μ l de suspension bactérienne diluée au $1/10^6$ dans du SOB sur des boîtes de Pétri SOB/agar (milieu SOB, bacto-agar 1,2%, ampicilline 50 μ g/ml, tétracycline 12,5 μ g/ml). Un comptage des colonies est effectué après une incubation de 18 heures à 37°C, ce qui permet d'effectuer une numération bactérienne.

* Préparation des cellules compétentes

Les bactéries sont rendues compétentes selon le protocole de Hanahan (1983). Cent millilitres de milieu SOB sontensemencés à partir d'une préculture de XL1-Blue. L'incubation à 37°C est maintenue jusqu'à ce que l'on obtienne $6 \text{ à } 9 \cdot 10^7$ bactéries/ml c'est à dire jusqu'à ce que la culture bactérienne soit dans la seconde moitié de la phase exponentielle de croissance. Les bactéries sont alors placées 10 à 15 minutes dans la glace puis centrifugées (10 mn, 1250 g, 4°C). Le culot, bien égoutté, est mis en suspension dans 1/3 du volume initial de solution RF1:

- RbCl 100 mM
- MnCl₂ 50mM
- acétate de potassium 30 mM
- CaCl₂ 10 mM
- glycérol 15 %
- pH ajusté à 5,8 par de l'acide acétique
- filtration à 0,22 μ m

puis laissé dans la glace pendant 15 minutes. Après centrifugation (10 mn, 1250 g, 4°C), le culot est repris dans 1/12,5 du volume initial de solution RF2:

- MOPS (Morpholino sulfonic acid) 10 mM
- RbCl 10 mM
- CaCl₂ 75 mM
- glycérol 15 %
- pH ajusté à 6,8 par de la soude
- filtration à 0,22 μ m

Après 15 minutes d'incubation dans la glace, les bactéries sont compétentes. Cette préparation permet la conservation à -80°C de ces bactéries réparties en aliquots de 200 μ l.

3.5- Transformation

Le mélange de ligation vecteur-insert est ajouté à 200 μ l de bactéries compétentes décongelées puis maintenu pendant 30 minutes dans la glace. Un choc thermique de 90 secondes dans un bain marie à 42°C est alors pratiqué avant de replacer le tube dans la glace. Huit cents microlitres de SOC (SOB + glucose à 20 mM, filtré à 0,22 μ m) sont ajoutés et ce mélange est mis sous agitation 30 minutes à 37°C pour permettre l'expression des gènes de résistance. Les suspensions bactériennes sont ensuite étalées à raison de 50 à 100 μ l par boîte sur le milieu sélectif (milieu SOB, bacto-agar 1,2 %, ampicilline 50 μ g/ml, tétracycline 12,5 μ g/ml, X-gal 80 μ g/ml, IPTG 0,20 mM). Les colonies blanches et bleues sont visibles après environ 18 heures de culture à 37°C.

4- MARQUAGE DES SONDAS ET HYBRIDATIONS

Le principe du kit utilisé "DNA Labeling and Detection Nonradioactive" de Boehringer est schématisé en annexe 3.

4.1- Transfert d'ADN (Southern, 1975)

L'ADN viral est digéré par *EcoRI*, puis une migration sur gel d'agarose est réalisée. Après coloration au BrEt et photographie sous UV, le gel est dénaturé pendant 1 heure dans un tampon contenant du NaOH (0,5 M) et du NaCl (1,5 M). L'ADN est ensuite neutralisé par immersion du gel dans une solution Tris-HCl (1 M, pH 8) NaCl (1,5 M) puis transféré par capillarité (Sambrook *et al.*, 1989) sur une membrane Hybond-N⁺ (Amersham) prémouillée par le tampon SSC 20X (NaCl, 3 M; Na-citrate, 0,3 M; pH 7), en présence du même tampon pendant 20 heures. L'ADN est fixé sur la membrane au four à vide à 80°C pendant 2 heures.

4.2- Préparation des sondes

Avant de préparer la sonde, l'insert cloné doit être séparé du vecteur. Pour cela, une hydrolyse par l'enzyme de restriction adéquate suivie d'une séparation par migration sur gel d'agarose sont effectuées. Une grande quantité d'ADN plasmidique purifié obtenue par maxipréparation est déposée dans un puits unique et large du gel. Après migration et légère coloration au BrEt, la bande du gel contenant l'insert est découpée puis, introduite dans un boudin de dialyse en présence du tampon d'électrophorèse et soumise à un champ électrique. Cette technique dite d'électroélution permet l'extraction de l'ADN du gel. Après extraction phénolique et précipitation éthanolique, l'éluat est repris dans du TE et quantifié au spectrophotomètre. La pureté de ce fragment de restriction est estimée par migration sur gel d'agarose d'une fraction aliquote. L'ADN purifié est marqué à l'aide du kit de Boehringer, par la méthode d'extension d'amorces au hasard par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I, en utilisant des hexanucléotides aléatoires et un déoxynucléotide marqué.

Un microgramme d'ADN est dénaturé 10 minutes à 95°C et refroidi rapidement dans la glace, puis incubé à 37°C pendant 1 heure en présence de:

- dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- solution d'amorces (hexanucléotides)
- Digoxigénine-11-dUTP
- 2 unités d'enzyme de Klenow.

Après arrêt de la réaction par l'EDTA (20 mM final), l'ADN marqué est séparé des nucléotides libres par précipitation éthanolique en présence de chlorure de lithium 4 M et repris dans 50 μ l de TE.

4.3- Hybridation des membranes avec des sondes marquées

La membrane est préalablement préhybridée pendant 1 heure à 68°C dans la solution d'hybridation à raison de 200 μ l/cm² de membrane. La membrane Hybond-N⁺ est ensuite hybridée pendant 6 heures à 68°C avec de la solution d'hybridation (25 μ l/cm²) contenant la sonde dénaturée par la chaleur (26 ng/ml) dans un sac en plastique soudé. La membrane est ensuite rincée en condition de stringence croissante: SSC 2X, SDS 0,1 % 2 fois 15 minutes à température ambiante puis SSC 0.1X, SDS 0,1 %, deux fois 15 minutes à 68°C. Puis les membranes sont révélées par détection immuno-enzymatique de la digoxigénine incorporée dans la sonde ce qui donne une coloration violette sur la membrane (annexe 3).

5- AMPLIFICATION DES SEQUENCES PAR P.C.R. (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Le principe de la technique de PCR est schématisé en annexe 4

5.1- Préparation de l'ADN cible

D'après le protocole de Webb *et al.*, (1990), les tissus de poissons et cellules BF2 infectées par du virus LDV sont placés 10 minutes dans un bain marie bouillant volume à volume avec du tampon TE afin de lyser les cellules et donc de libérer l'ADN viral. Après refroidissement sur la glace (5 mn), les échantillons sont centrifugés (5 mn, 6000 g) et leur surnageant est utilisé pour la réaction de PCR.

5.2- Amorces

Des amorces de 21 nucléotides sont synthétisées au laboratoire à l'aide d'un système Cyclone DNA Synthetizer (MilliGen); le choix des séquences de ces amorces est présenté en résultats (chapitre résultats, 3.1)

5.3- Réaction d'amplification par P.C.R.

Les amplifications de séquences par P.C.R. sont réalisées selon un protocole classique (Linz *et al.*, 1990). Le mélange réactionnel (50 μ l) contient:

- 6 μ l d'échantillon à amplifier,
- 1 μ l de chaque amorce (250-300 ng),
- x μ l de $MgCl_2$ (de 1,5 à 3,5 mM en concentration finale),
- 5 μ l de tampon de réaction (10X) (Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 500 mM, $MgCl_2$ 15 mM),
- x μ l d'eau distillée stérile,
- 1 μ l soit 500 μ M final de chaque désoxynucléotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),
- 0,5 μ l soit 2,5 unités d'enzyme *Taq* polymérase.

Le mélange est recouvert d'une goutte d'huile de paraffine pour éviter l'évaporation, puis soumis à 25 cycles d'amplification dans un bain thermostaté programmable (PHC2, Techne).

Chaque cycle comprend trois étapes:

- dénaturation de l'ADN (94°C, 1 mn)
- hybridation des amorces (52°C, 1 mn)
- extension des amorces par l'ADN polymérase thermostable (*Taq* polymérase, 72°C, 2 mn)

Après le dernier cycle, une dernière incubation de 10 minutes à 72°C permet l'élongation totale de tous les brins inachevés.

Les échantillons sont ensuite refroidis à température ambiante, l'huile de paraffine est enlevée par pipettage puis, par dissolution dans de l'étheroxyde et par évaporation. Dix microlitres de chaque échantillon sont déposés sur un gel d'agarose à 2 %. Après électrophorèse (150 V/15 cm, 45 mn) et coloration au bromure d'éthidium, les bandes correspondant aux fragments d'ADN amplifiés sont visualisées sous un transilluminateur à rayons ultraviolets, en présence du marqueur de poids moléculaire (DNA ladder de 1 kb, BRL, annexe 5).

6- UTILISATION DU SYSTEME D'EXPLOITATION BISANCE

BISANCE est un système d'exploitation de banques de données où sont répertoriées les séquences connues d'acides nucléiques et de protéines et dont la mise à jour est faite régulièrement. Il permet la consultation et l'utilisation des banques de séquences à distance sur centre serveur ainsi que des données personnelles. Notamment, le programme d'alignement (CLUSTAL) de plusieurs séquences est accessible et est utilisé pour rechercher des séquences

consensus. La recherche des portions en "hairpin", des possibilités d'hybridation des oligonucléotides entre eux et des homologies de séquences entre les oligonucléotides et la banque, ont également été effectuées.

RESULTATS

1- PURIFICATION D'ADN DE BACULOVIRUS

1.1 Essais de purification d'ADN viral AcMNPV à partir de cellules SF9 (*Spodoptera frugiperda*) infectées

Cent microgrammes de cellules d'insecte SF9 infectées et non infectées par le baculovirus AcMNPV et d'ADN de virus purifié ont été chargés respectivement sur trois gradients différents. (Remarque : les densités des trois gradients ne sont pas exactement identiques).

Deux types de résultats (figure 1) ont été observés par illumination des tubes aux UV :

- une seule bande visible dans les gradients contenant l'ADN de cellules saines ou virosées.
- deux bandes visibles et très proches sur le gradient contenant l'ADN de virus purifié correspondant à l'ADN superenroulé et circulaire ouvert.

Le profil d'absorbance à 254 nm des gradients a été enregistré pour les trois échantillons. Il apparaît :

- un pic pour l'ADN de cellules saines (S) (résultat non montré),
- un pic (VB) et une zone moins discrète de densité plus faible (VH) pour l'ADN de cellules infectées (figure 2),
- un seul pic (P) pour l'ADN de virus purifié (figure 3).

Dans ce dernier échantillon, l'obtention d'un seul pic est probablement due à la proximité des bandes et au manque de résolution de l'appareillage de fractionnement dans les conditions d'utilisation.

L'ADN correspondant aux différents pics obtenus a été soumis à une électrophorèse avant et après digestion par l'enzyme de restriction *EcoRI* (figure 4). Tous les ADN non digérés entrent dans le gel sous la forme d'une bande dans la zone de migration non spécifique. L'ADN des cellules SF9 non infectées forme après digestion une trainée sans bande nette, tandis que l'ADN de virus purifié et de cellules infectées (fractions supérieure et inférieure, figure 1) migrent en donnant un profil de restriction identique. L'ADN cellulaire n'est donc pas décelé dans les différentes fractions d'ADN de cellules infectées. Ce qui peut être expliqué par la forte proportion d'ADN viral par rapport à l'ADN cellulaire.

1.2- Purification d'ADN viral à partir de crevettes (*Penaeus vannamei*) infectées

Après l'extraction d'ADN de *P. vannamei* infectées par *Baculovirus penaei*, la concentration en ADN a été estimée par spectrophotométrie. L'absorbance à 260 nm de l'extrait dilué (1/500^{ème}) est de 0,238 D.O., ce qui correspond à une concentration en acides nucléiques de 5,95 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ soit 1,18 mg. La suspension d'ADN n'est pas visqueuse malgré sa forte concentration. D'après cette constatation, il semble que l'ADN ne soit pas de haut poids moléculaire et pourrait

Figure 1: Purification d'ADN par centrifugation isopycnique sur gradient de CsCl, en présence de colorant de Hoechst.

- S: ADN de cellules SF9 saines
- V: ADN de cellules SF9 infectées par le baculovirus AcMNPV
- P: ADN de baculovirus AcMNPV.

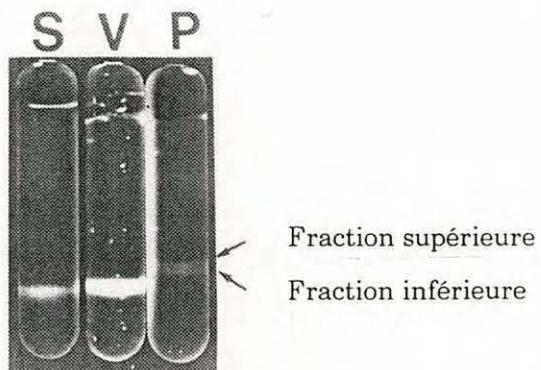


Figure 2: Profil d'absorbance à 254 nm de l'ADN de cellules SF9 infectées par le baculovirus AcMNPV (V), purifié sur gradient de CsCl.

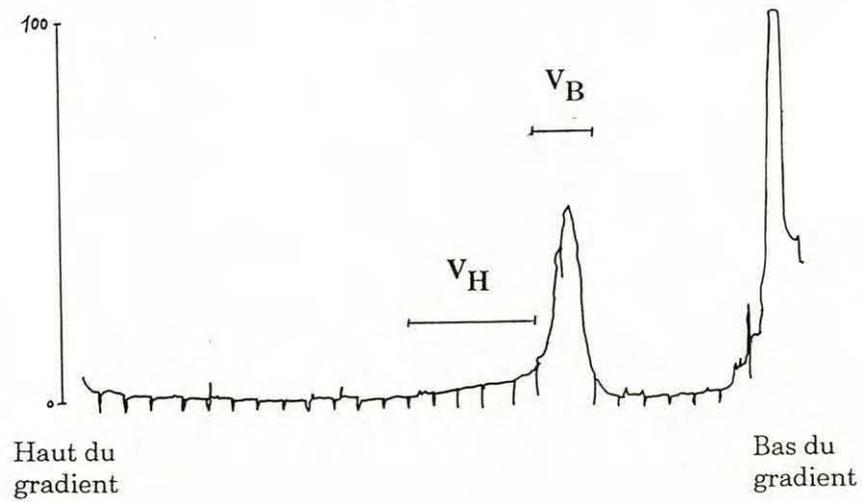


Figure 3: Profil d'absorbance à 254 nm de l'ADN du baculovirus AcMNPV, purifié (P) sur gradient de CsCl.

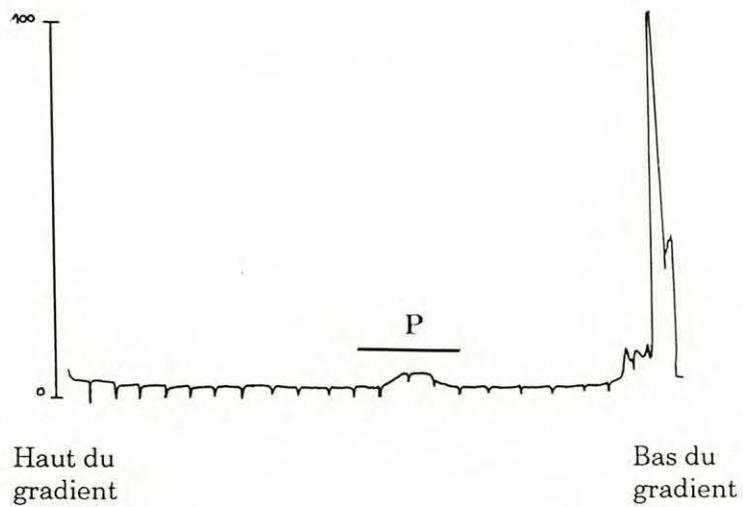
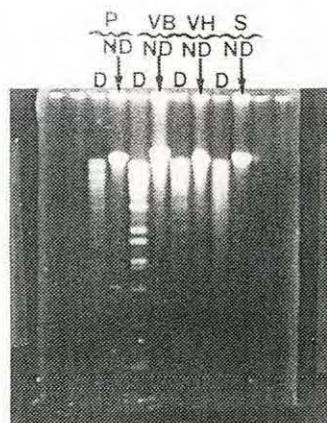


Figure 4: Contrôle de qualité de l'ADN de cellules SF9 saines (S), de cellules infectées par le baculovirus AcMNPV (V_H , V_B) et de baculovirus AcMNPV purifié (P) par électrophorèse en gel d'agarose.

Un microgramme d'ADN digéré (D) ou non digéré (ND) par *EcoRI* sont déposés sur un gel d'agarose 1% et migrent (100 V/15 cm) pendant 1 heure.



être dégradé, au moins en partie. La suspension d'ADN est légèrement colorée, ce qui est révélateur de la présence de contaminants polycycliques (Manning, 1991).

D'après le spectre d'absorption de l'extrait (figure 5), le rapport des absorbances à 260 nm et à 280 nm est de 2,1. Cette valeur n'est pas voisine de 1,8, rapport de l'ADN pur selon Sambrook et al., (1989).

La concentration d'ADN a été vérifiée par une autre méthode de quantification : la méthode "Saran-Wrap" (figure 6) qui donne une valeur de même ordre. Cette méthode, basée sur l'augmentation de la fluorescence du BrEt en présence d'acides nucléiques permet d'éliminer l'erreur due aux impuretés absorbant à 260 nm. Par cette méthode, une concentration de $3,75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ a été obtenue. Par ailleurs, après électrophorèse de l'ADN extrait sur le gel d'agarose (figure 7), cet ADN apparaît en grande partie dégradé comme l'atteste la pénétration d'acides nucléiques dans le gel. Ceci peut s'expliquer par le fait que les échantillons de crevettes virosées sont arrivés décongelés au laboratoire.

De plus, après centrifugation de la totalité de l'ADN de crevettes infectées sur un gradient de chlorure de césium en présence du colorant de Hoechst, aucune bande nette n'est observée (figure 8), mais seulement une importante zone diffuse correspondant probablement à de l'ADN dégradé.

2- PREPARATION DE SONDE VIRALE D'AcMNPV SPECIFIQUE DU GENE DNA POLYMERASE

2.1- Préparation des cellules compétentes

La cinétique du développement des bactéries a été suivie par une numération bactérienne et une mesure de l'absorbance à 550 nm afin de déterminer la turbidité (variable suivant la souche bactérienne et l'appareillage) correspondant à la densité bactérienne optimale pour la préparation des cellules compétentes correspondant à $6-9.10^7$ bactéries/ml.

Ces résultats sont représentés dans la figure 9 et schématisés par les courbes de la figure 10.

D'après la courbe B (figure 10), la concentration de bactéries de $6-9.10^7$ /ml correspond à une DO à 550 nm comprise entre 0,370 et 0,420. Cette "fourchette", connue, nous a permis la préparation de bactéries compétentes suivant le protocole décrit dans le chapitre Matériels et Methodes, 3.4.

Figure 5: Spectre d'absorbance de l'ADN extrait de post-larves de *Penaeus vannamei* infectées par *Baculovirus penaei* (dilution 1/500).

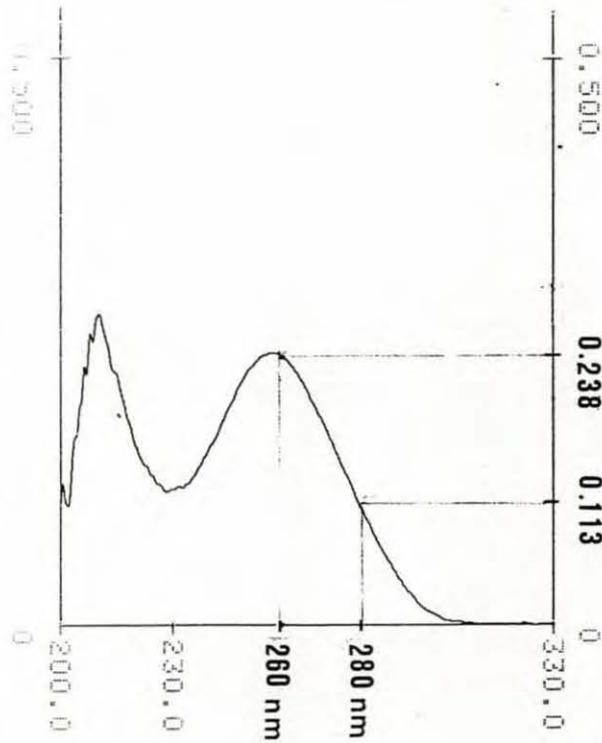


Figure 6: Quantification par la méthode "Saran-Wrap" de l'ADN extrait de post-larves de *Penaeus vannamei* infectées par *Baculovirus penaei*.

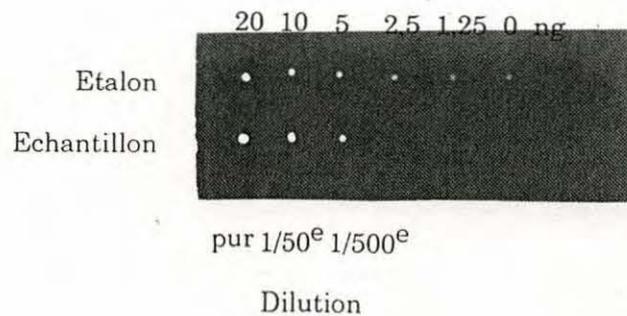


Figure 7: Contrôle de qualité par électrophorèse de l'ADN extrait de post-larves de *Penaeus vannamei* infectées par *Baculovirus penaei*.

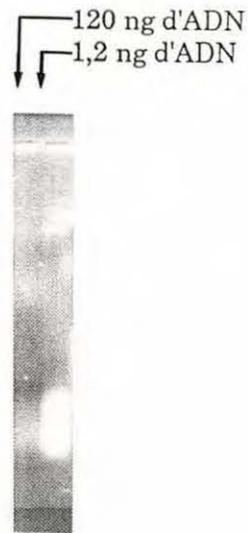


Figure 8: Gradient de CsCl chargé par de l'ADN extrait de post-larves de *Penaeus vannamei* infectées par *Baculovirus penaei*.

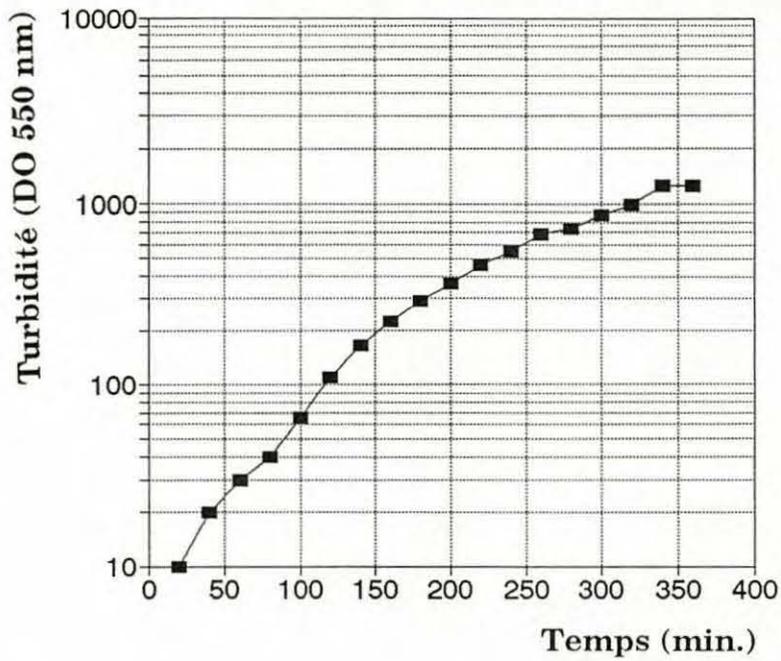


Figure 9: Cinétique de développement des bactéries XL1-Blue: évolution de la turbidité et de la numération bactérienne.

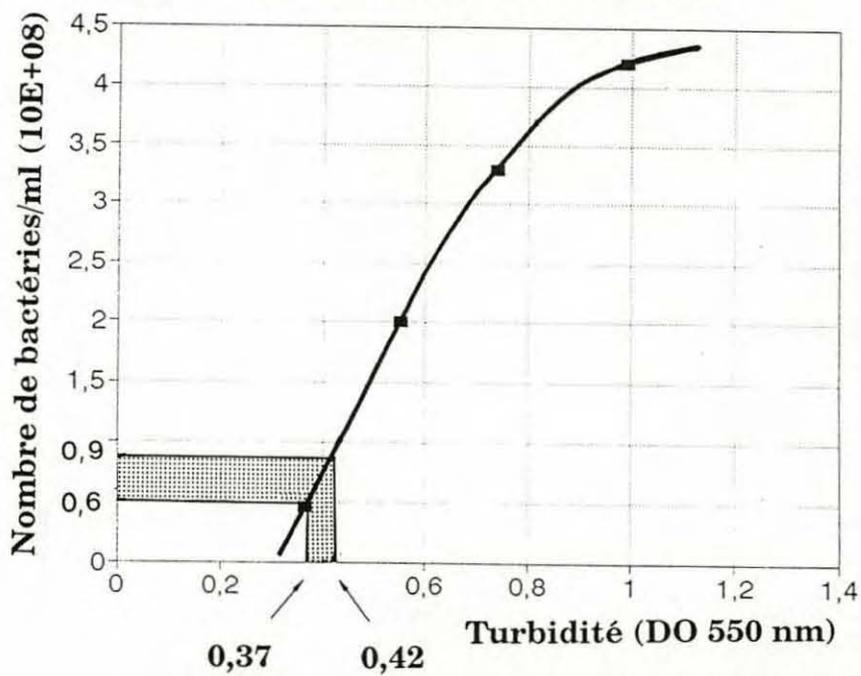
N°	Temps	Turbidité en DO à 550 nm	Nombre de colonies	Nombre de bactéries/ml
1	20 mn	0,010	-	-
2	40 mn	0,020	-	-
3	1 h.	0,030	-	-
4	1 h.20	0,040	-	-
5	1 h.40	0,065	-	-
6	2 h.	0,110	-	-
7	2 h.20	0,165	-	-
8	2 h.40	0,220	-	-
9	3 h.	0,290	-	-
10	3 h.20	0,364	47	$4,7 \cdot 10^7$
11	3 h.40	0,465	-	-
12	4 h.	0,550	200	$2 \cdot 10^8$
13	4 h.20	0,683	-	-
14	4 h.40	0,738	328	$3,28 \cdot 10^8$
15	5 h.	0,880	-	-
16	5 h.20	0,990	416	$4,16 \cdot 10^8$
17	5 h.40	1,300	-	-
18	6 h.	1,250	250	$2,5 \cdot 10^8$

Figure 10: Cinétique de développement des bactéries XL1-Blue.

A: Turbidité de la suspension bactérienne XL1-Blue en fonction du temps.



B: Relation entre la turbidité et le nombre de bactéries par ml.



2.2- Contrôle de ligation

Avant d'effectuer un clonage, une vérification de l'efficacité des enzymes de ligation disponibles au laboratoire est nécessaire. Une méthode rapide par migration sur gel d'agarose est choisie. 0,35 μg d'ADN marqueur de taille (phage τ *Hind*III, DNA molecular weight marker II, Boehringer) est ligué avec chacune des 4 ligases disponibles, puis soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 1 %. La photographie sous UV (figure 11) du gel coloré au BrEt permet d'apprécier l'efficacité de ces ligases qui, en fait, s'avèrent toutes excellentes. En effet, les différents fragments de restriction de phage τ ont été ligués entre eux et une bande de haut poids moléculaire est observée (figure 11).

2.3- Clonage du fragment *Pst*I-H de AcMNPV

Après digestion et migration de l'ADN de AcMNPV, la bande *Pst*I-H (figure 12) contenant le gène DNA polymérase est repérée selon sa taille d'après la carte de restriction établie par Summers *et al.*, 1988 (annexe 6). Ce fragment a été cloné (protocole décrit dans le chapitre Matériels et méthodes, paragraphe 3). Les résultats de ce clonage sont présentés dans le tableau suivant :

tableau : clonage du fragment *Pst*I-H de AcMNPV

	BOITE 1	BOITE 2	BOITE 3
VECTEUR	circulaire sans insert	linéaire sans insert	linéaire avec insert
LIGATION	non	oui	oui
nombre de colonies bleues	960	60	560
nombre de colonies blanches	0	0	4
transformants / μg de vecteur	2.10^6	1.10^5	1.10^6

La boîte 1 correspond à un contrôle de taux de transformation. La boîte 2 montre l'efficacité de la ligase. Ces boîtes sur lesquelles aucune colonie blanche n'a poussé et ayant un taux de transformation normal, confirment l'efficacité du mode de sélection des colonies recombinantes.

Figure 11: Contrôle de qualité de 4 ligases par électrophorèse en gel d'agarose:

- 1- }
- 2- } ADN du bactériophage λ
- 3- } incubé avec 4 ligases différentes
- 4- }
- 5- ADN du bactériophage λ sans ligase.

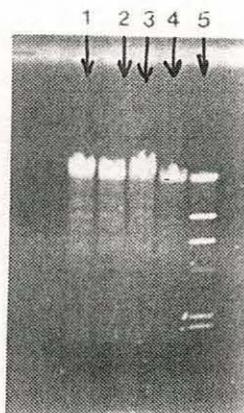
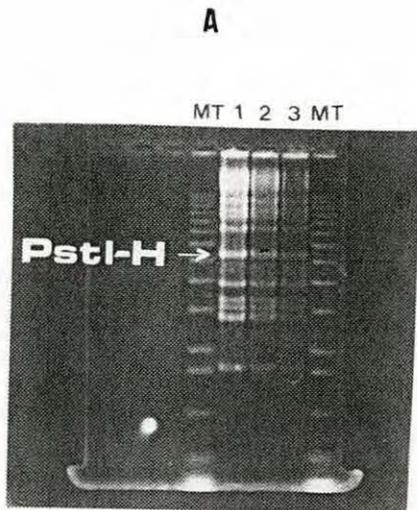
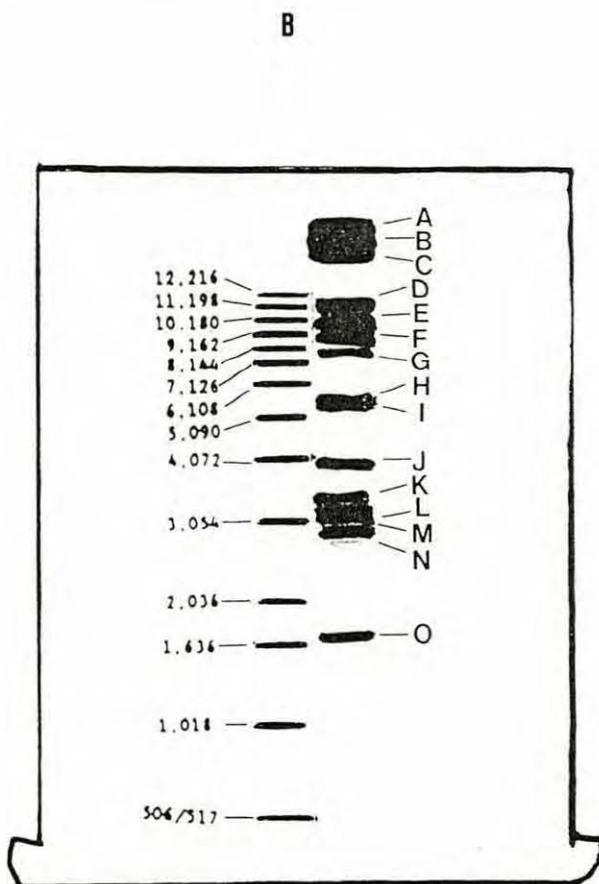


Figure 12: Electrophorèse en gel d'agarose de l'ADN du baculovirus AcMNPV digéré par *Pst*I en vue de l'extraction du fragment *Pst*I-H.

- A : photographie du gel
- B : schéma explicatif
- C : tableau des fragments de restriction *Pst*I



1,2,3 : ADN de Baculovirus AcMNPV digéré par *Pst*I
 MT : marqueur de taille moléculaire "Echelle kb"



C

Fragment	<i>Pst</i> I
A	26,1 kb
B	22,0 kb
C	17,4 kb
D	11,7 kb
E	10,5 kb
F	8,6 kb
G	7,0 kb
H	5,2 kb
I	4,9 kb
J	3,5 kb
K	3,0 kb
L	2,9 kb
M	2,9 kb
N	2,6 kb
O	1,7 kb

Sur la boîte 3, correspondant au clonage du fragment *PstI* H, on note un très faible pourcentage (0,8 %) de colonies blanches par rapport aux colonies bleues. Cette transformation a donc permis d'isoler 4 clones recombinants.

2.4- Etude des colonies recombinantes

Une étape préliminaire a consisté à contrôler la réussite du clonage par la détermination de la taille des inserts présents dans les plasmides recombinants extraits à partir des quatre colonies blanches précédemment isolées. Une hydrolyse par *PstI* suivie d'une électrophorèse a été réalisée. Après coloration du gel (figure 13), pour les minipréparation n°0 et n°2 non digérées, on observe deux bandes correspondant aux plasmides superenroulé et circulaire ouvert. Pour les échantillons n°0 et n°2 digérés par *PstI*, deux bandes sont observées : l'une correspondant au plasmide (3 kb), l'autre au fragment *PstI*-H inséré (5 kb). Rien n'est visible dans l'échantillon 3. Deux colonies, n°0 et n°2, ont ainsi été retenues d'après la taille de l'insert.

Il faut noter cependant que le fragment *PstI*-H a une taille voisine d'un autre fragment de *AcMNPV* (*PstI*-I) ce qui pourrait conduire à les confondre. Selon la carte de restriction (annexe 6), le fragment *PstI*-H est le seul à posséder le site de restriction de *EcoRI* ce qui permettra de reconnaître le type du fragment suivant les trois hypothèses différentes, après une digestion par *EcoRI* du plasmide recombinant et migration par électrophorèse:

1^{ère} hypothèse : deux bandes à 4,8 et 3,4 kb correspondant au fragment *PstI*-H

2^{ème} hypothèse : deux bandes à 7,8 et 0,4 kb correspondant au fragment *PstI*-H

3^{ème} hypothèse : une seule bande à 7,8 kb correspondant au fragment *PstI*-I

Les deux premières hypothèses dépendent de l'orientation du fragment inséré par rapport au plasmide. Il est possible de confondre les deux dernières hypothèses, une bande à 400 pb pouvant être invisible sur le gel si elle est en trop faible quantité.

Après ce contrôle, l'identité du fragment *PstI*-H est confirmée par la présence des deux bandes 4,8 et 3,4 kb sur le gel (résultat non montré).

Ce fragment sera utilisé ultérieurement comme sonde dans la technique de Southern blot.

3- SOUTHERN BLOT : LOCALISATION DU GÈNE DE LA POLYÉDRINE SUR L'ADN DE BACULOVIRUS

Une maxipréparation a été effectuée sur un clone recombinant ayant inséré le fragment *EcoRI*-I de *AcMNPV*. Ce fragment contenant le gène de la polyédrine a été cloné préalablement au laboratoire. Le fragment *EcoRI* a été purifié par digestion enzymatique, électrophorèse et électroélution.

Figure 13: Contrôle de clonage du fragment *Pst*I-H de AcMNPV dans le vecteur Bluescript, par électrophorèse sur gel d'agarose (1 μ l de minipréparation par puits):

- 1 marqueur de poids moléculaire "Echelle 1kb"
- 2,3 : minipréparation n°3
- 4,5 : minipréparation n°2
- 6,7 : minipréparation n°0

- 2, 4 et 6 : digestion par *Pst*I
- 3, 5 et 7 : non digéré

- 8 : 100 ng de vecteur de clonage natif



Après le marquage du fragment *EcoRI*-I pour obtenir une sonde, un essai préliminaire de Southern blot a été effectué avec succès sur l'ADN de *AcMNPV* digéré par *EcoRI*, migré sur gel d'agarose (figure 14 A) et transféré sur membrane de nylon Hybond-N⁺ (figure 14 B).

La migration par électrophorèse de l'ADN viral (128 kb) digéré par *EcoRI* permet la séparation de plusieurs fragments, dont un fragment *EcoRI*-I de taille 7,7 kb (figure 14 A). Après transfert sur membrane, ce fragment hybride avec la sonde ci-dessus (figure 14 B).

Compte tenu de l'altération de l'ADN obtenu des crevettes infectées, il n'a pas été possible de localiser le gène de la polyédrine sur l'ADN de *Baculovirus penaei* par cette technique de Southern Blot

4- DIAGNOSTIC VIRAL PAR P.C.R.

4.1- Choix des amorces

Peu de séquences sont connues chez les Lymphocystivirus. Toutefois, des amorces ont pu être choisies d'après les données de Schnitzler et Darai (1989) qui montrent que la séquence nucléique répétée du LDV est conservée à 95% entre les isolats de LDV provenant du flet et de la plie.

A partir de cette séquence, des amorces droite (D) et gauche (G) ont été choisies (tableau ci-dessous) afin d'amplifier un fragment de 216 kb.

Les choix de ces séquences est déterminé par le critères de la taille. En effet, la spécificité est obtenue pour des amorces d'au moins 20 bases. La température de demi-dénaturation (T_m) est ensuite calculée par la formule simplifiée suivante qui peut être appliquée à des petits fragments de l'ordre de 20 bases :

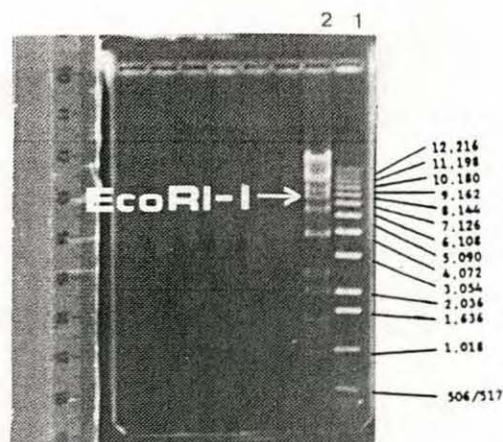
$$T_m (\text{°C}) = 4(G+C) + 2(A+T).$$

Tableau : caractéristiques des amorces

amorce	séquence	nombre de bases	T _m (°C)
D	5'TCGGCACAATGAAATACCACG 3'	21	62
G	5'CATGGTTATTGGTGGATACGG 3'	21	62

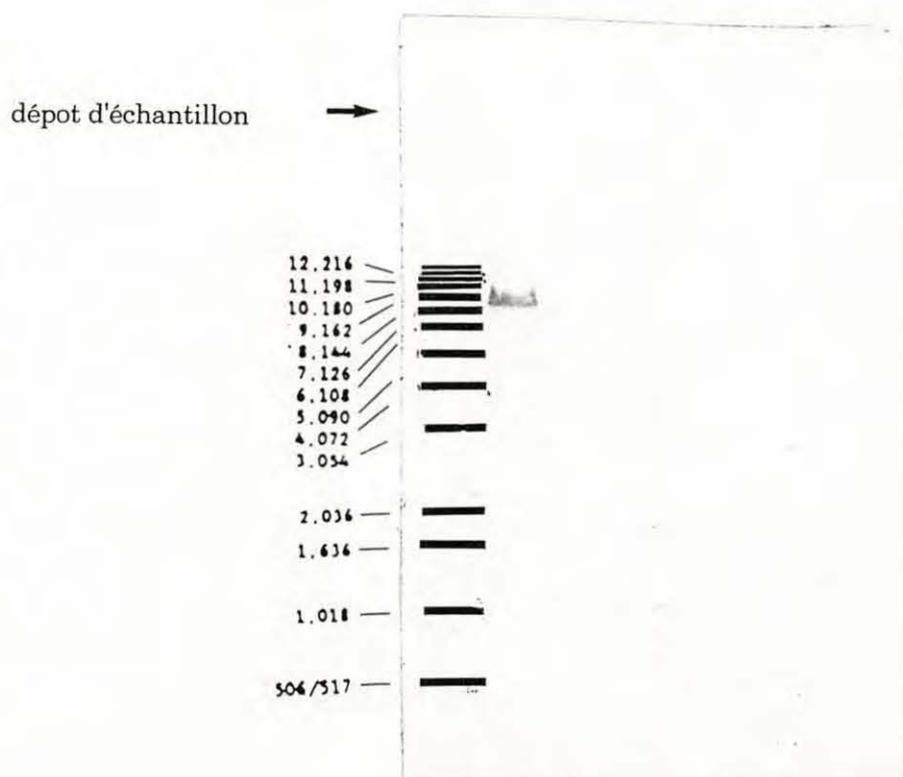
La température d'hybridation pour la PCR est estimée par la formule : T_m - 10°C = 52°C.

Figure 14A: Electrophorèse en gel d'agarose de l'ADN de baculovirus AcMNPV digéré par *EcoRI* (2) avant transfert sur une membrane Hybond-N⁺.
1 : marqueur de poids moléculaire "Echelle 1kb".



Fragment	<i>EcoRI</i>
A	14,4 kb
B	13,5 kb
C	12,3 kb
D	10,7 kb
E	9,1 kb
F	9,0 kb
G	8,8 kb
H	8,8 kb
I	7,7 kb
J	6,8 kb
K	5,5 kb
L	3,9 kb
M	3,6 kb
N	2,5 kb
O	2,2 kb

Figure 14B: Hybridation par Southern Blot (système digoxigénine-phosphatase alcaline) du fragment *EcoRI* d'AcMNPV avec l'ADN d'AcMNPV transféré sur membrane Hybond-N⁺.



4.2 Amplification

Un essai préliminaire de PCR appliqué au *Lymphocystis* sur des kystes de flet bouillis a été réalisé afin de déterminer la concentration optimale de $MgCl_2$ pour trois enzymes *Taq* polymérase différentes: Amersham, Pharmacia et Biolabs. Dix tubes ont été préparés comme décrit dans la figure 15.

La visualisation d'une bande majeure très nette sur le gel (figure 15) a permis de retenir l'enzyme *Taq* polymérase de Amersham pour laquelle la concentration optimale du $MgCl_2$ est de 1,5 mM. Les trainées observées en haut du gel ainsi que la fluorescence dans les puits correspondent probablement respectivement à des contaminations protéiques et à de l'ADN génomique dégradé. En effet, les échantillons sont des tissus de poisson simplement bouillis en présence de TE, sans purification d'ADN.

Un deuxième essai a alors été réalisé dans les conditions optimales sur des tissus infectés par trois souches différentes de virus. Les résultats obtenus (figure 16) montrent que dans le cas du flet (échantillons 1, 2, 3) et de la dorade (échantillons 4, 5, 6), une bande de la taille attendue est visible. Les échantillons de LDV de perche, propagé sur les cellules BF2, étaient très peu virosés et aucune amplification n'est visible (échantillons 7, 8, 9) bien que dans des expériences préliminaires de PCR avec de l'ADN purifié de ce virus, une bande ait été obtenue (Le Deuff R.M., communication personnelle). Dans le témoin négatif (échantillon 10), contenant 6 μ l de surnageant de cellules BF2 saines, aucune amplification n'est visible.

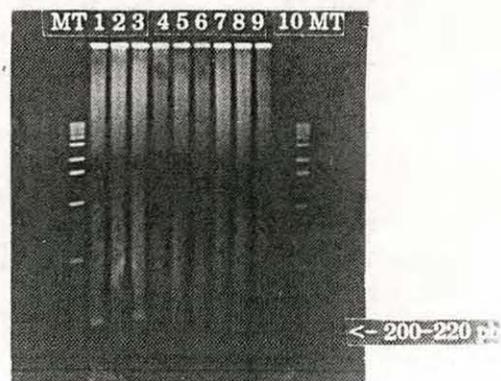
5- RECHERCHE DE SEQUENCES CONSERVEES DANS LE GENE DE LA DNA POLYMERASE DES HERPESVIRIDAE

Une recherche d'homologies entre les séquences de la DNA polymérase de trois *Herpesviridae* humains appartenant aux trois sous-familles α , β et γ : HSV1, HCMV et EBV, a été effectuée grâce à un alignement selon le programme CLUSTAL utilisé dans le système d'exploitation BISANCE. Le résultat de cet alignement figure en annexe 7.

Pour chaque zone d'alignement, des régions susceptibles de fournir des amorces pour de la PCR ont été sélectionnées d'après les séquences d'acides aminés conservées puis par le calcul de la dégénérescence des séquences nucléotidiques correspondantes. L'objectif de cette sélection est d'obtenir des amorces d'au moins 20 mers, les moins dégénérées possibles. Ainsi, trois motifs protéiques ont été sélectionnés (figure 17) et permettront, associés deux par deux, de faire des essais d'amplification de séquences par PCR.

Figure 15: Essai préliminaire de PCR avec:
 - différentes concentrations en $MgCl_2$,
 - différentes enzymes Taq polymérase.

MT: marqueur de taille moléculaire "Echelle 1kb".



Enzyme	Amersham			Pharmacia			Biolabs			les 3
tube n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$MgCl_2$ (mM)	1,5	2,5	3,5	1,5	2,5	3,5	1,5	2,5	3,5	3,5
Echant.	surnageant de kyste de flet bouilli									TE

Figure 16: Essai d'amplification à partir de LDV de différentes origines: 1-3: flet, 4-6: dorade, 7-9: virus isolé de perche et propagé sur culture cellulaire, 10: témoin cellules BF2 saines



Figure 17: Trois motifs protéiques (A, B et C) conservés pour les ADN polymérases des *Herpesviridae*: HSV1, HCMV et EBV. Les séquences nucléotidiques correspondant sont indiquées ainsi que le calcul de leur dégénérescence (D).

Motif A :

Y - D - G - Q - Q - I - R - (V) = 7 (ou 8) acides aminés
 D (F)

TAT-GAT-GGA-CAA-CAA-ATT-CGA-GTA
 G C C T G G C A T T T G C
 C C C C C C C C C C

2x2x 2x 4x 2x 2x 3x2x4x2x4

<-----> 21 mer => D = 3072
 <-----> 23 mer => D = 12 288

Motif B :

I - I - Q - A - H - N - L - (C) = 7 (ou 8) acides aminés
 M

ATT-ATT-CAA-GCA-CAT-AAT-ITA-TGT
 C C A T G T C C C G C
 A A C C C C C C C C

3x 3x2x2x2x4x 2x 2x2x4x 2

<-----> 20 mer => D = 2304
 <-----> 23 mer => D = 9216

Motif C :

R - V - I - Y - G - D - T - (D) = 7 (ou 8) acides aminés
 I

CGA-GTA-ATT-TAT-GGA-GAT-ACA-GAT
 A T A T C C T C C T C
 G A G A G C G C C C C C

2x4x2x4x 3x 2x 4x 2x 4x 2

<-----> 21 mer => D = 3072
 <-----> 23 mer => D = 12288

Une vérification a ensuite été effectuée en les comparant avec toutes les séquences de la banque de données. Il s'avère que ces motifs ne sont présents que dans les séquences d'ADN polymérase des *Herpesviridae* (résultats non montrés) ce qui confirme la spécificité de ces séquences vis-à-vis de ces virus et aussi leur bonne conservation, puisque les motifs sont retrouvés dans toutes les séquences connues d'ADN polymérase des *Herpesviridae*.

DISCUSSION

Le travail effectué au cours de ce stage s'inscrit dans le cadre de recherches en pathologie virale des invertébrés marins. La finalité de ces études est de limiter le développement des maladies d'une part, par la mise au point de méthodes de diagnostic sensibles et d'autre part, par la recherche de moyens de lutte anti-virale tels que l'inhibition de la réplication de virus par stratégie anti-sens.

Concernant ce dernier point, il est nécessaire de développer les recherches sur les gènes cibles potentielles des anti-sens. Les Baculovirus, bien connus d'un point de vue génétique chez les insectes, sont cultivables sur des lignées cellulaires. De plus, des virus apparentés à la même famille sont responsables de mortalités importantes chez les pénéides. Un Baculovirus d'insectes, l'AcMNPV, a donc été retenu comme modèle d'étude. Compte tenu de la difficulté d'approvisionnement en Baculovirus de pénéides, liée d'une part à l'éloignement géographique des zones d'élevage contaminées (Equateur), et d'autre part à l'absence de lignées cellulaires de pénéides ne permettant pas de cultiver *in vitro* ces virus, certaines expérimentations développées dans ce mémoire ont donc été préalablement réalisées sur du Baculovirus d'insectes.

Des essais de séparation d'ADN viraux et cellulaires ont été réalisés directement à partir de cellules SF9 infectées. Cette stratégie de séparation des ADN parasites et cellulaires a déjà été appliquée avec succès pour des protozoaires d'invertébrés marins tels que *Marteilia refringens* (Lubat, 1990) ou *Bonamia ostreae* (Hervio, 1992). Cette méthode permet de s'affranchir des étapes de purification parfois lourdes à mettre en oeuvre pour obtenir des parasites en assez grande quantité.

Lors de nos essais, la séparation de deux types d'ADN par centrifugation en gradient de CsCl et en présence de colorant de Hoechst, n'a pas été obtenue. Cela peut s'expliquer de différentes façons. Un pourcentage similaire en bases pures (A-T) dans les deux types d'ADN ne permettrait pas en effet de séparer les ADN selon ce critère. Cette première hypothèse pourrait être testée en utilisant une plus grande résolution des gradients. Une autre hypothèse serait que la proportion d'ADN cellulaire est trop faible dans les cellules infectées pour pouvoir être visualisé sur gradient (Summers et Smith, 1988). Cette hypothèse pourrait être vérifiée en déposant un mélange d'ADN de cellules saines et de virus purifié.

Ce type de séparation sur gradient a été aussi appliqué à des post-larves de pénéides infectées par du Baculovirus, mais sans succès. La zone de fluorescence diffuse obtenue dans le gradient serait due soit, à une dégradation des ADN présents, pouvant être incriminée à une mauvaise conservation des échantillons de crevettes, soit à une trop grande quantité d'ADN déposée. Dans des conditions satisfaisantes d'extraction des ADN, si la séparation de plusieurs bandes n'était pas obtenue, il pourrait être envisagé de faire migrer sur gel, avant et après

coupure par enzyme de restriction, l'ADN obtenu dans les différentes fractions afin de localiser les zones les plus riches en ADN viral.

Une seconde partie de ce mémoire a été consacrée au clonage de fragments de AcMNPV dans un plasmide et leur amplification dans le but d'en préparer une sonde. Les fragments clonés du génome de AcMNPV – fragment du gène de la DNA polymérase virale ou de la polyédrine – correspondent à des gènes susceptibles d'avoir le plus fort pourcentage d'homologie avec le baculovirus de crevette.

Des essais préliminaires de Southern blot ont été réalisés sur le Baculovirus AcMNPV, afin de vérifier la fiabilité des sondes préalablement obtenues, le seuil de sensibilité de la technique devant être toutefois déterminé. Une mise en évidence du gène de la polyédrine, par Southern blot, sur *Baculovirus penaei* n'a pu être abordée du fait de l'état très dégradé de l'ADN.

L'utilisation de ces fragments clonés comme sondes permettra de localiser par Southern blot les gènes homologues sur de l'ADN viral de crevettes. Le travail pouvant se poursuivre par le clonage et le séquençage des fragments spécifiques de crevette.

Au cours du stage, une autre stratégie de recherche de séquences a été abordée sur un autre génome viral : l'amplification enzymatique d'ADN ou PCR. De nombreux Herpesvirus ont été décrits chez les mammifères. Les séquences de certains de leurs gènes, disponibles dans les banques de données, ont pu être exploitées. Ainsi, la comparaison des séquences protéiques des ADN polymérases de trois de ces virus humains (HSV1, HCMV et EBV) a aboutit à la sélection de motifs conservés non seulement pour ces trois virus, mais aussi pour les autres Herpesvirus dont les séquences sont connues. A partir de ces séquences conservées, la complexité des séquences nucléotidiques correspondantes a été calculée. Les trois amorces, dont le degré de dégénérescence était minimal, peuvent dès lors être synthétisées et utilisées afin de caractériser le gène de l'ADN polymérase de l'Herpesvirus de l'huître creuse et de l'huître plate.

Concernant la facette diagnostic développée au cours de ce rapport, le diagnostic des viroses par PCR est en effet une technique réellement plus avantageuse que la microscopie. Cette technique est en effet relativement rapide et peut même s'affranchir de l'étape préliminaire d'extraction d'ADN des échantillons. Ceci a été montré lors des expériences de PCR relatives au LDV de poissons, pour lesquelles les échantillons virosés ont été simplement placés dans un bain-marie bouillant pendant dix minutes afin de lyser les cellules et libérer l'ADN viral cible. Cette méthode de diagnostic, basée sur l'hybridation d'amorces oligonucléotidiques est particulièrement intéressante dans la mesure où aucune séquence de pathogènes d'invertébrés marins n'est connue actuellement. En effet, comme il l'a été montré pour le LDV, des sondes ont

été synthétisées uniquement sur la base des recherches de séquences consensus puis validées lors de nos expériences de PCR. Ces réactifs, s'ils se montrent assez spécifiques et sensibles, sont d'ores et déjà utilisables pour mettre au point un diagnostic, par PCR, de virus de type Lymphocystivirus chez l'huître, *Crassostrea gigas*.

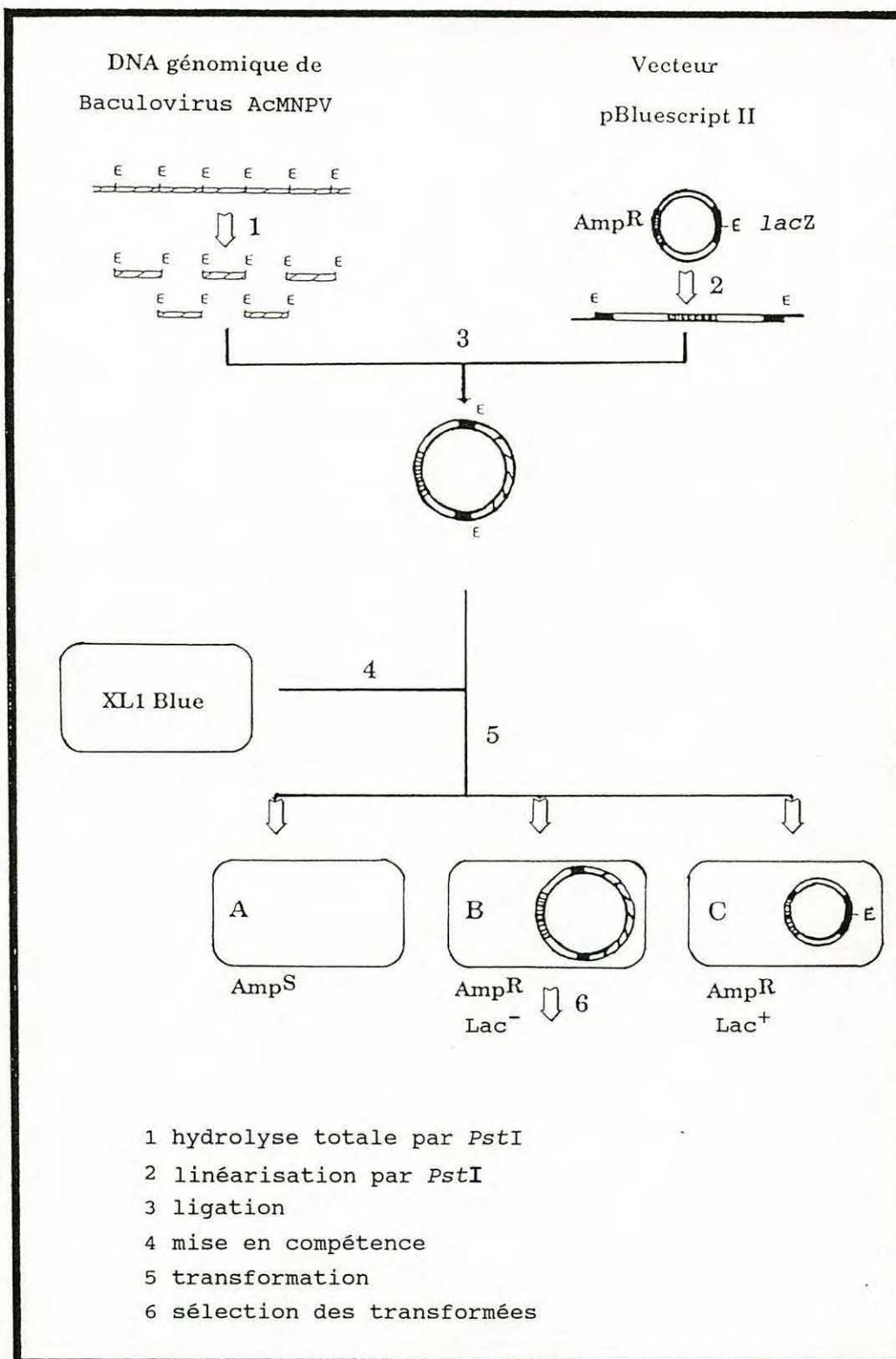
BIBLIOGRAPHIE

- COMPS M., BONAMI J.R., VAGO C. et CAMPILLO A., 1976. Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk).
C. R. Acad. Sc. Paris, série D, 285: 427-429.
- ELSTON R.A. and WILKINSON M.T., 1985. Pathology, management and diagnosis of Oyster Velar Virus Disease (OVVD). *Aquaculture*, 48: 189-210.
- GARGER S.J., GRIFFITH O.M., and GRILL L.K., 1983. Rapid purification of plasmid DNA by a single centrifugation in a two-step cesium chloride-ethidium bromide gradient. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 117: 835-842.
- HANAHAN D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166: 557-580.
- HERVIO D., 1992. Contribution à l'étude de *Bonamia ostreae*, protozoaire parasite de l'huître *Ostrea edulis*, et à l'analyse des interactions hôte-parasite. Thèse de Doctorat de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, spécialité protistologie, pp 186.
- KARLOVSKY P. and de COCK W.A.M., 1991. Buoyant Density of DNA-Hoechst 33258. *Analytical Biochem.*, 194: 192-197.
- LIGHTNER D.V., 1983. Diseases of cultured penaeid shrimp. In *Handbook of Mariculture*. Mc VEY, J.V., ed, 1: 289-320.
- LINZ U., DELLING U. and RÜBSAMEN-WAIGMANN H., 1990. Systematic studies on parameters influencing the performances of the polymerase chain reaction. *J. Clin. Chem. Biochem.*, 28: 5-13.
- LUBAT V., 1990. Approches biologiques et moléculaires dans l'étude des myxosporides, du PKX et des *Marteilia*. Impacts en aquaculture. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, pp 111.
- MANNING K., 1991. Isolation of Nucleic Acids from Plants by Differential Solvent Precipitation. *Analytical Biochem.*, 195: 45-50.
- SAMBROOCK J., FRITSCH E.F. and MANIATIS T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edit., vol. 1, 2 et 3, C.S.H., Cold Spring Harbor (ed), Laboratory Press, USA.
- SOUTHERN E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517.
- SCHNITZLER P. and DARAI G., 1989. Characterization of the repetitive element in the genome of Fish Lymphocystis Disease Viruses. *Virol.*, 172: 32-41.
- SUMMERS M.D. and SMITH G.E., 1988. A manual of methods for Baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station, 57 p.
- TOMALSKI M.D., WU J., MILLER L.K., 1988. The location, Sequence, Transcription and Regulation of a Baculovirus DNA Polymerase Gene. *Virol.*, 167: 591-600.
- VLAK J.M. and SMITH G.E., 1982. Orientation of the Genome of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus: a Proposal. *J. of Virol.*, 41: 1118-1121.
- WEBB L., CARL M., MALLOY D.C., DASCH G.A. and AZAD A.F., 1990. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microb.*, 28: 530-534.

ANNEXES

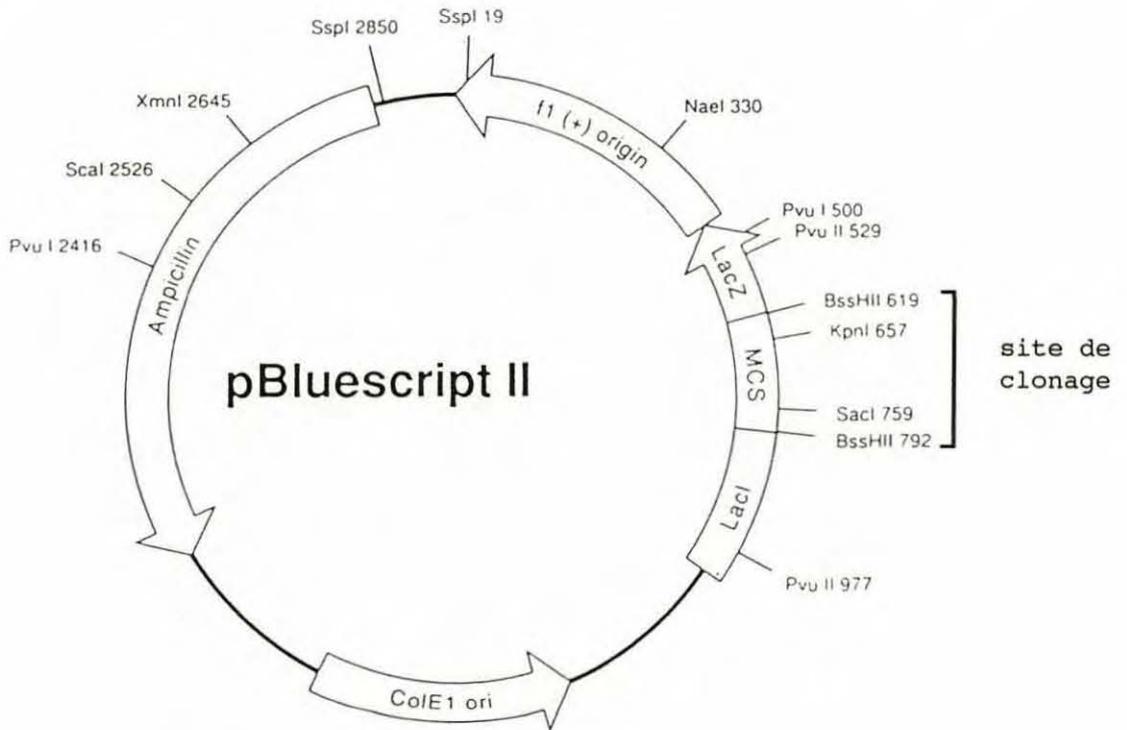
Annexe 1

Principe de clonage de l'ADN génomique du baculovirus AcMNPV

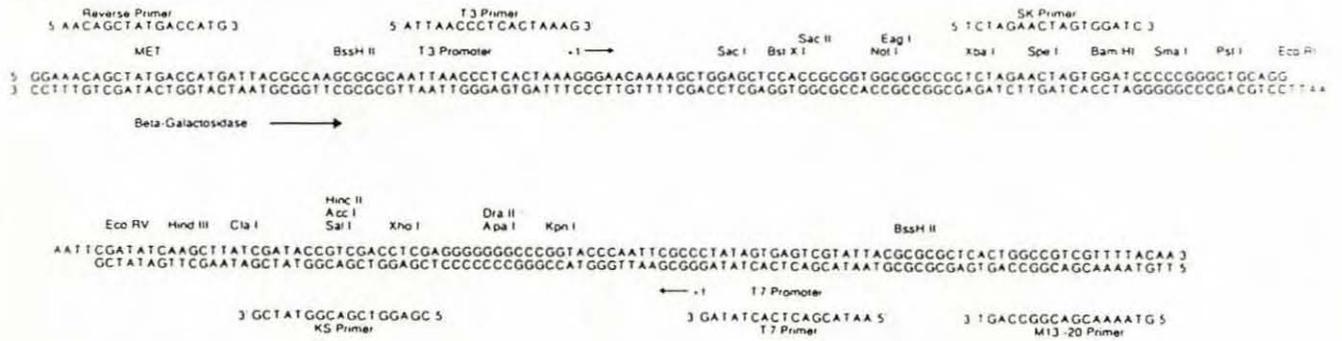


Annexe 2

Carte physique du vecteur Bluescript II



site de clonage :

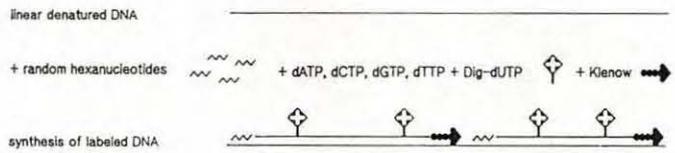


Annexe 3

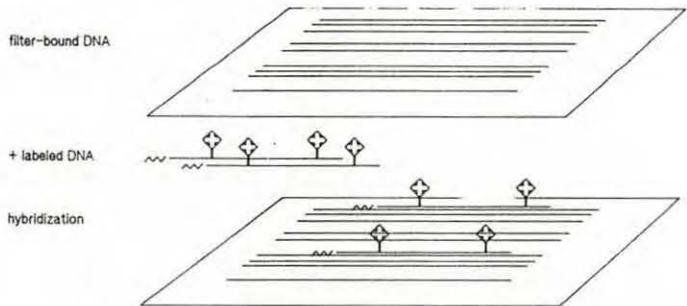
Protocole de marquage froid de l'ADN (A) et principe de la détection digoxigénine/phosphatase alcaline (B)

A

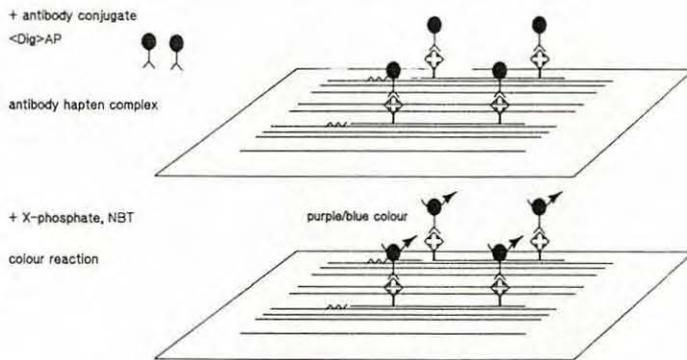
1- Etape de marquage



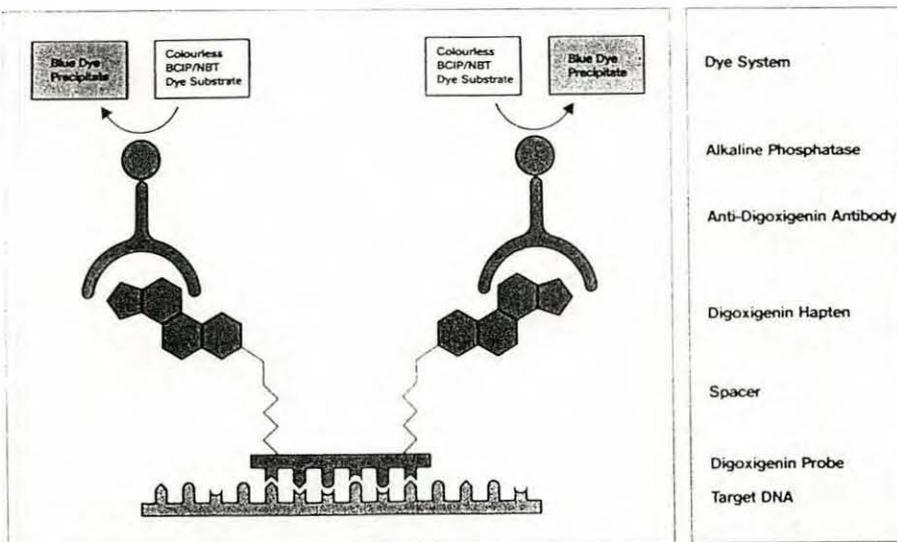
2- Etape d'hybridation



3- Etape de détection



B

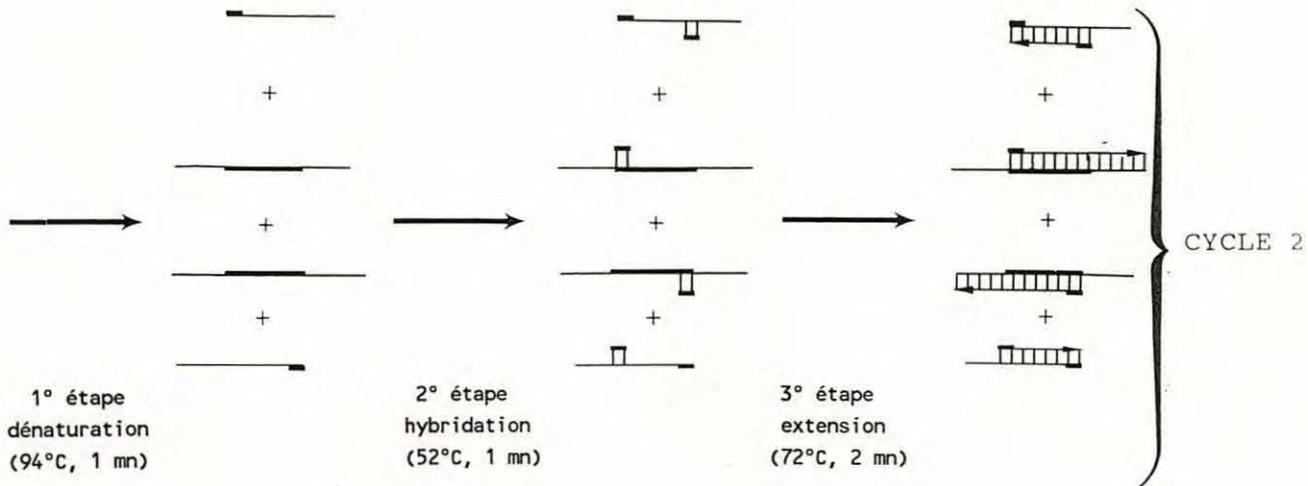
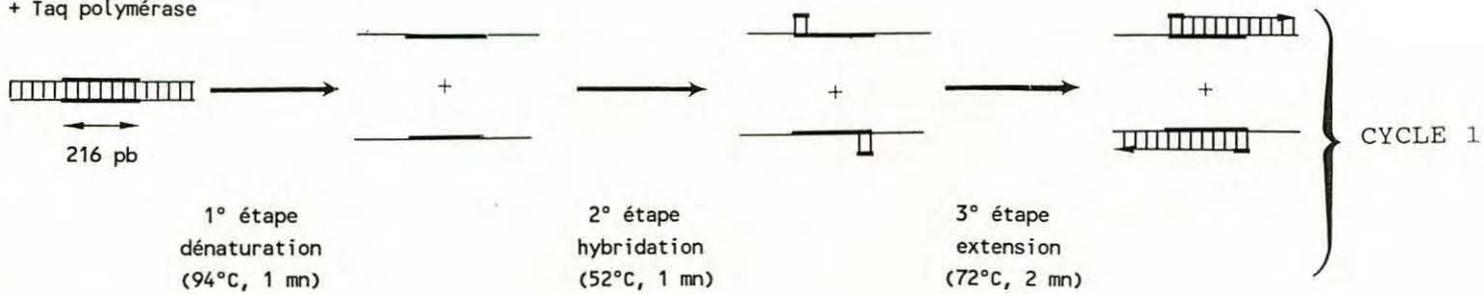


Annexe 4

Principe de l'amplification enzymatique d'ADN par PCR

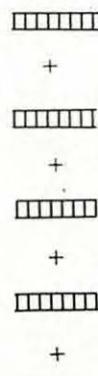
La technique d'amplification enzymatique par PCR (Linz et al., 1990) est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase. Cette enzyme est capable de copier un brin d'ADN utilisé comme matrice, en un brin complémentaire par élongation de l'extrémité 3'OH d'une amorce oligonucléotidique. Cette technique consiste à effectuer n cycles successifs d'amplification de la séquence d'ADN double brin encadrée par les deux amorces. Un cycle d'amplification est composé de 3 étapes permettant de réaliser successivement la dénaturation de l'ADN (94°C), l'hybridation des amorces (52°C) et leur extension d'ADN par l'ADN polymérase. Pour éviter l'addition d'enzymes à chaque cycle, une ADN polymérase thermostable à 100°C est utilisée (Taq polymérase).

ADN cible + amorces + dNTP
+ Taq polymérase



etc. (25 cycles)

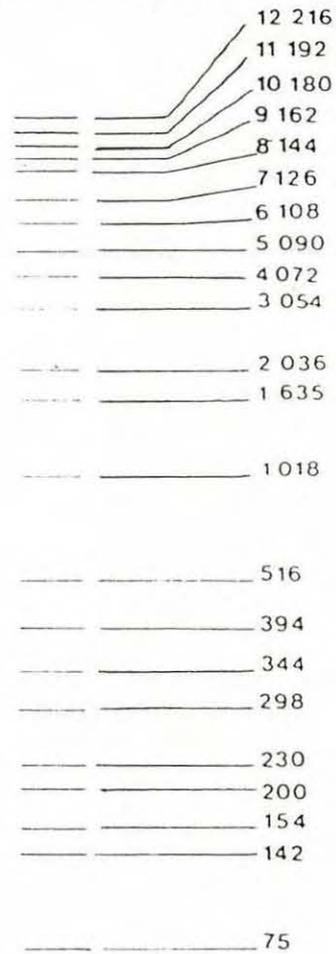
 = ADN cible contenu dans l'échantillon (6 µl)
 = Amorces oligonucléotidiques
 Amorce droite = 5' TCGGCACAATGAAATACCACG 3'
 Amorce gauche = 5' CATGGTTATTGGTGGATACGG 3'
 = ADN nouvellement synthétisé


 + etc.


Annexe 5

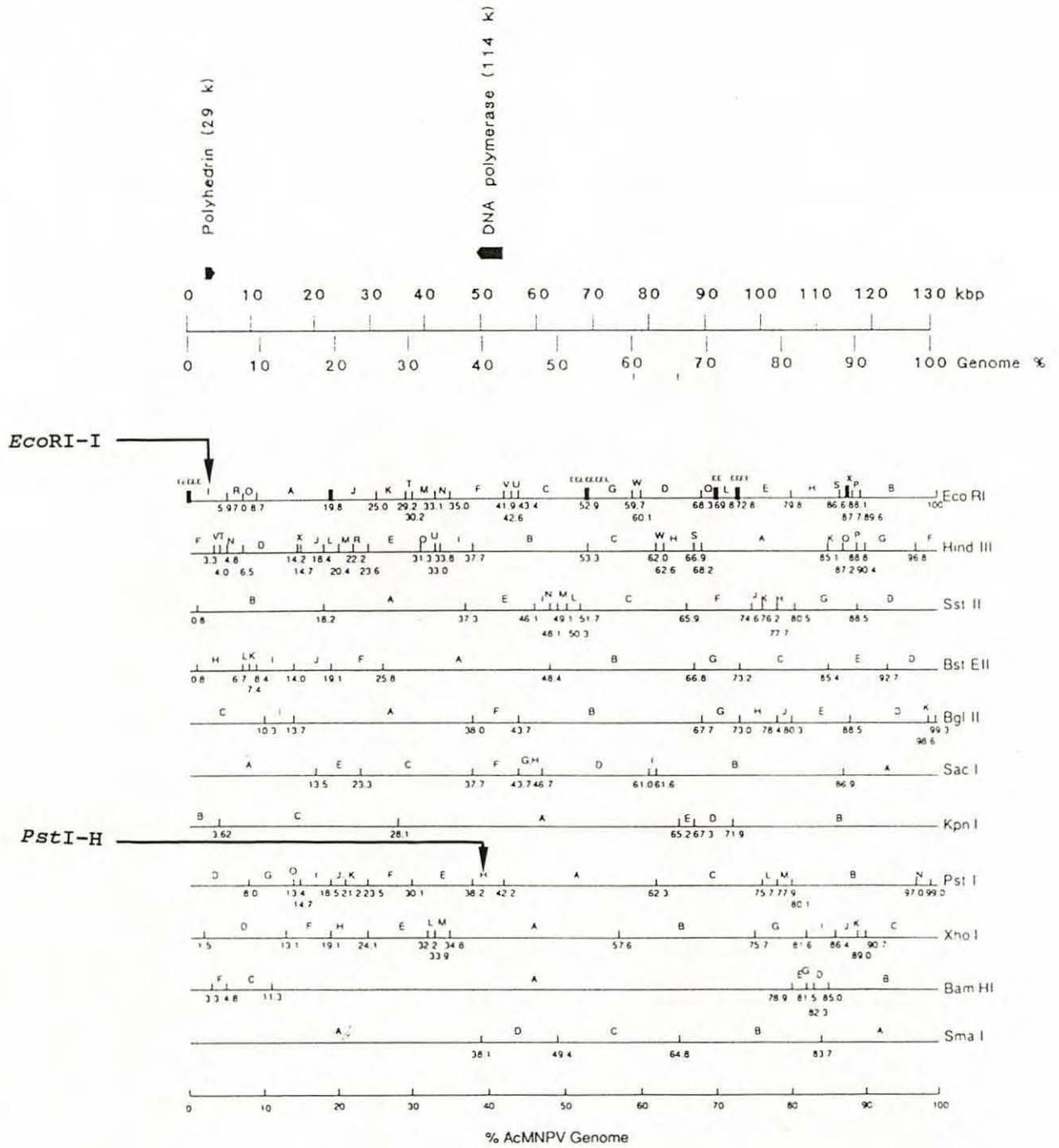
Détermination des poids moléculaires des fragments d'ADN séparés par électrophorèse

Caractéristiques du marqueur de taille 1 Kb (BRL).

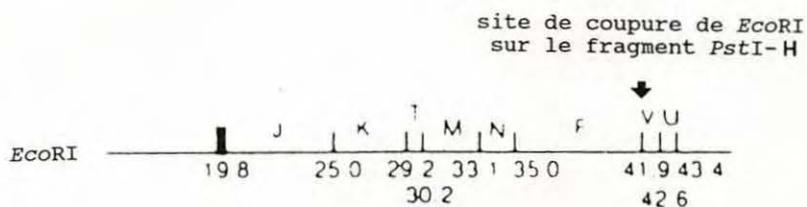
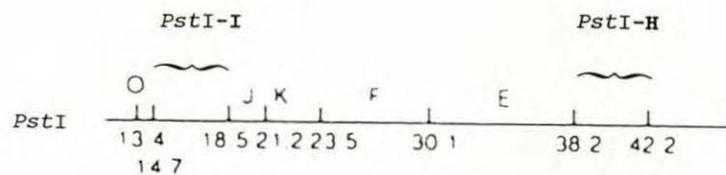


Annexe 6

Carte de restriction du baculovirus AcMNPV (Summers et al., 1988)



Fragment	<i>Pst</i> I		<i>Eco</i> RI	
	%	kb	%	kb
A	20,1%	26,1 kb	11,1%	14,4 kb
B	16,9%	22,0 kb	10,4%	13,5 kb
C	13,4%	17,4 kb	9,5%	12,3 kb
D	9%	11,7 kb	8,2%	10,7 kb
E	8,1%	10,5 kb	7%	9,1 kb
F	6,6%	8,6 kb	6,9%	9,0 kb
G	5,4%	7,0 kb	6,8%	8,8 kb
H	4%	5,2 kb	6,8%	8,8 kb
I	3,8%	4,9 kb	5,9%	7,7 kb
J	2,7%	3,5 kb	5,2%	6,8 kb
K	2,3%	3,0 kb	4,2%	5,5 kb
L	2,2%	2,9 kb	3%	3,9 kb
M	2,2%	2,9 kb	2,8%	3,6 kb
N	2%	2,6 kb	1,9%	2,5 kb
O	1,3%	1,7 kb	1,7%	2,2 kb



Annexe 7

Comparaison des séquences protéiques d'ADN polymérase d'Herpesviridae

Les séquences d'ADN polymérase de trois Herpesviridae appartenant aux trois sous-familles α , β et γ ont été comparées grâce au programme d'alignement Clustal. Ces séquences sont désignées par les mnémoniques suivants :

DJBE16 : Herpes simplex 1 (HSV1, α)
 DJBE2L : Epstein-Barr virus (EBV, γ)
 DJBEC1 : Human Cytomegalovirus (HCMV, β)

Les motifs protéiques A, B et C correspondant aux oligonucléotides les moins dégénérés candidats pour la PCR, sont soulignés.

```

DJBE16      MFSGGGGPLSPGGKSAARAASGFFAPAGPRGAGRPPCLRQNFYNPYLAPVGTQQKPTG
DJBE2L      M---SGGL-----FYNPFL-----RPNKGLL----KCPD-
DJBEC1      M-----FNNPYLSGGVTGGAVAGGRRQRSQPSAQSGKRPQP-
              *           * *           .           . *

DJBE16      PTQRHTYYSECDEFRIAPRVLEDEAPPEKRAGVHDGHLKRAPKVYCGGDERDVLRVGSG
DJBE2L      -----KEYLRLIPKCFQTPGA---AGVVDVRGPQPPLCFYQDSLTVVGGDEEG
DJBEC1      -----KQFLQIVPRGVMFDGQ---TGLIKHKTGRLPLMFYREIKHLLSHDM--
              .. * * . . * . * . .

DJBE16      -GFWP--RRSRLWGGVDHAPAGFNPTVTVFHVYDILENVEHAYGMRAAQFHARFMDAITP
DJBE2L      KGMW--WRQRAQEGTARPEADTHGSPLDFHVYDILETV--YTHEKCAVIPSDKQGYVVP
DJBEC1      --VWPCPWRETL-----VGRVVGPIRFHTYDQTDVAV--LFFDSPENVSRYRQHLVP
              * * . * * * * * . * . *

DJBE16      TGTVITLLGL-TPEGHRVAVHVGTRQYFYMNKEEVDRLQCRAPRDLCERMAALRESP
DJBE2L      CGIVIKLLGRRKADGASVCNVVFGQAYFY-----ASAPQGLDVEFAV-LSALK
DJBEC1      SGNVLRFFGA-TEHGYSICNVVFGQRSYFY-----CEYSDTDRLR-EV-IASVG
              * * . * * * * * * * * * .

DJBE16      GASFRGISADHFEAEVVERTDYYYYETRPALFYRVYVRSRSG----RVLSTYLCDNFCAIK
DJBE2L      ASTFDRRTPCRVSVKVTRRSIMGYGNHAG-DYHKITLSPNSVCHVATWLQDK--HGCR
DJBEC1      ELVPEPRTPYAVSVTPATKTSIYGYGTRPVPDLQCVSISNWTMARKIGEYLLE---QGFP
              .. . * .. . * . * .

DJBE16      KYEGGVDATTRFILDNPGFVTFGWYRLKPGRNNTLAQPRAPMAFGTSSDVEFNCTADNLA
DJBE2L      IFEANVDATRRFVLDND-FVTFGWYSCR--RAIPRLQHRD----SYAELEYDCEVGDLS
DJBEC1      VYEVVRDPLTRLVIDRR-ITTFGWCSVN--RYDWRQQGRA----STCDIEVDCDVSDLV
              . * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DJBE16      IEGGMSDLPAYKLMCFDIECKAGGEDELAFFVAGHPEDLVIQISCLLYDLSTTA-----
DJBE2L      VRREDSSWPSYQALAFDIECL-GEEG--FPTATNEADLILQISCVLWSTGEEAGRYRRI
DJBEC1      AVPDDSSWPRYRCLSFDI ECMSGEGG--FPCAESDDIVIQISCVCYETGGNTAVDQGI
              * * * * * * * * * * * * * * * * *

DJBE16      -----LEH--VLLFSLGSCDLPESHLNELAARGLPTPVVLEFDSEFEMLL
DJBE2L      -----LLTLGTCEDIE-GVE-----VYFPSELDMLY
DJBEC1      PNGNDGRGCTSEGVI FGHSLHLFTIGTCGQVGPVD-----VYFPSEYELL
              * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```


DJBE16 TDPERDIQDFVLTAELSRHPRAYTNKRLAHLTVYYKLMARRAQVPSIKDRIPYVIVA---
DJBE2L REGRVPMGELCFSTELSRKLSAYKSTQMPHLAVYQKFVERNEELPQIHDRIQYVVFVEPK-
DJBEC1 YLHRVRVEDLVLSSVLSKDISLYRQSNLPHIAVIKRLAARSEELPSVGDRVFYVLTAPGV
. ** . * ..*..* .. * ..* . ** . ** .

DJBE16 ----QTREVEETVARLAALRELDAAAPGDEPAPPAALPSPAKRPRETPSPADPPGGASKP
DJBE2L -----GGV-----K-----GARKT
DJBEC1 RTAPQGSSDNGDSVTAGVVSRSDAIDGTDDDADGGGVEESNRRGGEPAKK-----RARKP
... **

DJBE16 RKLLVS-ELAEDPAYAIAHGVALNTDYYFSHLLGAACVTFKALF-GNNAKITESLLKRFI
DJBE2L -----EMAEDPAYAERHGVPVAVDHYFDKLLQGAANILQCLFDNNSGA-----ALSV
DJBEC1 PSAVCNYEVAEDPSYVREHGVP I HADKYFEQVLKAVTNVLSPVFPGETARKDKFLHMVL
* . **** . * ** . * ** . * . . . *

DJBE16 PEVWHPPDDVTARLRAAGFGAVGAGATAEETRRMLHRAFDTLA
DJBE2L LQNFTAR-----PPF-----
DJBEC1 PRRHLHLE-----PAF--LPYSVKAHEC-----C
. *