

Étude quantitative des sites d'établissement de la latence du virus de la maladie d'Aujeszky par PCR

R. THIÉRY, A. JESTIN

Centre National d'Études Vétérinaires et Alimentaires,
Laboratoire de Biologie Moléculaire - BP53, 22440 Ploufragan

Étude quantitative des sites d'établissement de la latence du virus de la maladie d'Aujeszky par PCR

Dans le but d'étudier le degré de colonisation de divers tissus porcins par le virus de la maladie d'Aujeszky en phase de latence, une technique de PCR quantitative a été mise au point. Dans cette méthode, un fragment du gène codant pour la glycoprotéine gD du virus PRV est coamplifié en présence de quantités variables de contrôle interne. Les produits d'amplification sont marqués à l'aide d'un oligonucléotide fluorescent capable de s'hybrider sur les deux types de matrice, séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide et détectés à l'aide d'un séquenceur automatique. Les quantités initiales de génome viral sont déterminées au point d'équivalence relativement au nombre initial de copies de contrôle interne. Appliquée à divers échantillons provenant de porcs infectés expérimentalement, cette méthode nous a permis de confirmer que les ganglions trigéminés représentent probablement les sites privilégiés d'établissement de la latence par le virus PRV. Cependant, nous avons observé que les quantités de génome viral détectées dans cet organe peuvent varier de plusieurs ordres de grandeur d'un animal à l'autre. De la même façon, une importante variabilité a été observée lors de l'analyse de différentes parties de l'encéphale, ainsi que dans divers tissus non nerveux (rate, poumon, moelle osseuse, ganglions mésentériques).

Quantitative study of the sites of establishment of latency by Aujeszky's disease virus.

In order to study the degree of colonization of various porcine tissues by latent Aujeszky's disease virus, a quantitative PCR technique was established. In this method, a fragment of the gene coding for glycoprotein gD of PRV is coamplified in the presence of various amounts of internal control. The amplified products are labelled using a fluorescent oligonucleotide that can hybridize on both matrices, separated by electrophoresis on a polyacrylamide gel and detected with the aim of an automated sequencer. The initial amounts of viral genome are determined at the equivalence point relatively to the initial amount of internal control. When applied to various samples coming from experimentally infected pigs, this method allowed us to confirm that trigeminal ganglia are probably privileged sites for establishment of latency from this virus. However, we observed that the amounts of viral genome in this organ can vary of several orders of magnitude from one animal to the other. Similarly, a high variability was observed when different parts of the encephale were analysed, as well as several non-neural tissues (spleen, lung, bone marrow, mesenteric ganglia).

INTRODUCTION

La maladie d'Aujeszky est une cause de pertes économiques importantes dans l'industrie porcine et fait l'objet de campagnes d'éradication ou de contrôle dans de nombreux pays. L'agent responsable de cette maladie est un virus appartenant à la famille des alphaherpesvirus: le virus de la pseudorabie ou PRV (pour Pseudorabies virus). Comme tout les alphaherpesvirus, le virus de la pseudorabie peut persister à l'état latent dans les neurones sensoriels de l'hôte et se réactiver sous l'influence de divers facteurs. La Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) a été utilisée avec succès par différents auteurs pour détecter l'ADN du PRV présent lors des phases aiguës ou bien latentes dans divers tissus de porcs (BELAK et al, 1989; JESTIN et al, 1990; MAES et al, 1990; GALEOTA-WHEELER et OSORIO, 1991; LOKENSGAARD et al, 1991). Quelques auteurs ont également décrit des tests PCR capables de différencier entre les souches sauvages et les souches vaccinales (KATZ et PEDERSEN, 1992; SCHERBA et al, 1992; HASEBE, et al, 1993; DANGLER, et al, 1993).

Le but de cette étude a été d'établir une méthode de PCR quantitative sensible capable de détecter de faibles quantités de génome viral présent à l'état latent dans les tissus porcins. Pour ce faire nous avons opté pour une méthode consistant à utiliser un standard interne qui est co-amplifié en présence de l'ADN de l'échantillon à analyser. La détection ainsi que la quantification sont réalisées sur un séquenceur automatique à l'aide d'un logiciel approprié après une étape de marquage fluorescent des produits d'amplification.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Les animaux et la souche virale

Une dose de $10^{4,5}$ TCID₅₀ du virus de la pseudorabie (souche sauvage Phylaxia B111) a été inoculée par voie intranasale à un lot de 8 porcs âgés de 11 semaines tandis qu'un lot témoin de 7 porcs a été suivi en parallèle. Pendant toute la durée de l'expérience les animaux étaient placés dans des conditions strictes d'isolement en animalerie protégée. Les animaux contaminés ont développé une hyperthermie à partir du 3^{ème} jour après l'inoculation. Cette hyperthermie était comprise entre 40 et 41 °C et n'était pas accompagnée d'autres symptômes. En cours d'essai, des autopsies ont eu lieu en phase aiguë (5 jours et 11 jours après l'inoculation) et en phase de latence (entre 60 et 80 jours post infection) où divers tissus ont été prélevés pour analyse par PCR quantitative. Des prélèvements sanguins ont également été effectués afin de réaliser des contrôles sérologiques.

1.2. Préparation des acides nucléiques

L'extraction des acides nucléiques servant de matrices pour la quantification à partir de tissus de porcs infectés est réalisée comme ci-après. Après autopsie des animaux, les tissus sont prélevés puis conservés à -70 °C. Au moment de l'extraction, 2 à 3 mm³ de tissus sont décongelés, triturés à l'aide d'une lame de scalpel stérile, puis incubés pendant une

nuit à 37°C sous agitation lente dans un volume de 2 ml de solution de lyse (0,1 *SSC; 0,5 % SDS, 250 µg/ml de protéinase K). Après une brève centrifugation pour éliminer les gros débris, le surnageant est soumis à trois extractions successives à l'aide de volumes égaux de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (50/48/2). L'ADN est ensuite précipité à partir de la phase aqueuse par addition de 2 volumes d'éthanol absolu et d'acétate de sodium (concentration finale 0,3M). Les culots d'ADN obtenus après centrifugation sont séchés puis repris dans 100 à 200 microlitres d'une solution stérile de Tris-EDTA (pH 8,2). La quantité totale d'ADN dans chaque échantillon est obtenue par mesure de la densité optique à 260 nm.

1.3. Conditions de PCR

Un couple de primers capable d'amplifier spécifiquement un fragment de 196 pb du gène codant pour la glycoprotéine gD du virus PRV a été sélectionné à l'aide du logiciel Oligo (National Biosciences). Les primers sont synthétisés au laboratoire à l'aide d'un synthétiseur d'oligonucléotides (modèle 391 DNA Synthesizer de chez Applied Biosystems). Chaque primer a une longueur de 25 nucléotides :

Primer A (498) 5' CCTGGTGTCCGTCGACGGCGTGAAC 3';

Primer B (669) 5' CCGGTGCGGGGGCTGCTGGTAGAAC 3',

où les nombres entre parenthèses représentent la position à laquelle chaque séquence débute par rapport au codon initiateur. Les réactions d'amplification sont réalisées dans un volume final de 50µl contenant 2,5 unités de Taq polymérase (Boehringer), 0,5 unités d'Uracyl DNA Glycosylase (GIBCO-BRL), 0,1 mM de dATP, dCTP, dGTP et 0,2 mM de dUTP, 0,4 µM de chaque primer, et 10% de DMSO dans le tampon de réaction (Boehringer). L'utilisation de l'Uracyl DNA Glycosylase et du dUTP permet d'éliminer les contaminations éventuelles provenant des amplifications précédentes (LONGO et al, 1990). Pour chaque échantillon à quantifier, entre 1 et 5 µg d'ADN total sont co-amplifiés en présence de différentes quantités de standard interne (5 à 5000 copies). Les réactions d'amplification sont réalisées dans un bain-marie thermocyclé (modèle 9600, Perkin Elmer) selon le programme suivant: 15 minutes à 50°C (action de l'UDG), 2 minutes à 96°C, puis 40 cycles chacun consistant en trois étapes de 30 sec. à 94°C, 30 sec. à 64°C, 30 sec. à 72°C; suivis d'une étape finale de 10 minutes à 72°C (BOUTIN et al, 1994).

1.4. Construction du standard interne

La construction du standard interne est effectuée par PCR (THIERY et al, 1995). Elle consiste à obtenir une matrice d'ADN quasiment identique à la séquence à quantifier mais contenant une délétion de 6 paires de bases, de façon à permettre la séparation de l'ADN cible par électrophorèse, tout en conservant la même efficacité d'amplification. Pour ce faire l'oligonucléotide suivant a été synthétisé:

5' CCTGGTGTCCGTCGACGGCGTGAACACTTCATGGT 3'

Celui-ci contient la même séquence que l'oligonucléotide B (669) (en caractères gras) à laquelle sont ajoutées 10 bases (soulignées) capables de s'hybrider sur la matrice initiale en laissant une délétion de 10 paires de bases. Ainsi le produit d'amplification obtenu après PCR selon les mêmes conditions que précédemment en utilisant ce dernier oligonucléotide conjointement à l'amorce A (498), possède une longueur de 186 pb ainsi que les 2 sites de fixation des matrices A et B qui sont conservés. Le standard interne est ensuite purifié à l'aide d'un microconcentrateur centricon-100 (Amicon), séquencé afin de vérifier la présence de la délétion et quantifié par mesure de la densité optique à 260 nm.

1.5. Réaction de marquage des produits d'amplification

Un aliquote de 10 μ l de chaque réaction est soumis à 10 cycles de réaction d'élongation dans un volume total de 20 μ l contenant un oligonucléotide fluorescent capable de s'hybrider sur les 2 types de matrices (la séquence virale à quantifier et le standard interne). L'oligonucléotide fluorescent est synthétisé directement à l'aide du synthétiseur d'oligonucléotides muni d'une phosphoramidite couplée au marqueur fluorescent (Fam-Amidite, Applied Biosystems). Le mélange réactionnel contient 0.5 unités de Taq polymérase (Boehringer), 0.1 mM de chaque dNTP, 0.4 μ M de l'amorce marquée et 10% DMSO dans le tampon Boehringer. Chaque cycle d'élongation consiste en 30 sec. à 94°C, 30 sec. à 62°C et 30 sec. à 72°C. Les 10 cycles sont effectués après une étape de dénaturation de 2 minutes à 94°C.

1.6. Détection et séparation des produits d'amplification

Un aliquote de 2,5 microlitres de chaque réaction d'élongation est ajouté à 2,5 microlitre de formamide et 0,25 microlitre de marqueur de taille rox-2500 (Applied Biosystems), dénaturé à 95°C pendant 2 minutes puis placé dans de la glace à +4°C. Ensuite, 2 microlitres de ce mélange sont déposés sur un gel dénaturant (6% acrylamide, bis-acrylamide, urée 8M) et soumis à électrophorèse (6 heures, 1400 volts) sur un séquenceur automatique (Applied Biosystems). Le logiciel Genescan (Applied Biosystems) est utilisé afin de déterminer la taille de chaque fragments (à 2 paires de base près) ainsi que la surface et la hauteur de chaque pic.

1.7. Quantification du nombre initial de copies de génome viral

Pour chaque échantillon à quantifier, une série de 3 tubes contenant un volume identique de la préparation d'ADN sont coamplifiés en présence respectivement de 5, 50 ou 500 copies de standard interne, selon le protocole décrit plus haut. La quantification est obtenue graphiquement en portant le rapport des surfaces de fluorescence du pic standard sur celui de l'ADN viral, obtenus après amplification, en fonction du nombre de copies initiales de standard interne. Le nombre initial de copies d'ADN viral est obtenu au point d'équivalence (au point d'ordonnée égale à 1). Les

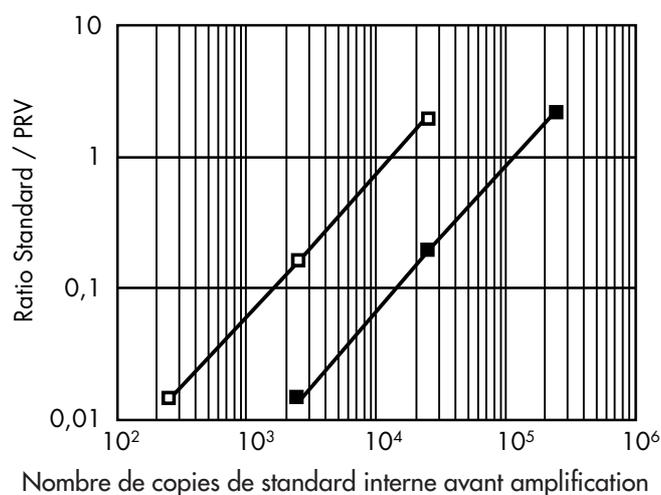
résultats sont exprimés pour 10^6 cellules porcines sachant que 2 μ g de DNA porcin représentent 10^6 cellules.

2. RÉSULTATS

2.1. Validation du standard interne

Afin de vérifier que l'efficacité d'amplification du standard interne est équivalente à celle de l'ADN viral, l'expérience suivante a été réalisée: de l'ADN viral purifié, en concentration connue, a été coamplifié en présence de quantités variables de standard interne puis traité comme indiqué plus haut. Le résultat de la figure 1 montre clairement que les quantités mesurées par la technique de PCR quantitative sont proches des quantités initiales, et que les efficacités d'amplification du standard interne et de l'ADN viral sont égales. Ces résultats permettent de conclure que la molécule standard obtenue selon notre procédure est utilisable en PCR quantitative.

Figure 1 - Validation du standard interne. Quantification de 10000 copies (carrés blancs) et de 100000 copies (carrés noirs) de génome du virus PRV par coamplification avec différentes quantités de standard interne



2.2. Détermination du nombre de copies de PRV dans les ganglions trigémiques

Les ganglions trigémiques sont généralement considérés comme le site primaire d'établissement de la latence du virus PRV. Les quantités de génome de PRV présent dans cette structure nerveuse ont donc été mesurées pendant les phases aiguë et latente de l'infection. Un exemple de quantification par PCR est donnée sur la figure 2. On peut noter que pour ce type d'organe la quantité de génome viral présent dans l'échantillon est compatible avec la gamme de standard interne utilisée. L'ensemble des résultats obtenus sur le lot de porcs infectés est représenté sur la figure 3. On observe des variations importantes du nombre de copies de génome viral dans les ganglions trigémiques (de 20 à 50000 copies pour un million de cellules nerveuses). Cependant il semble que

les quantités de génome viral mesurées dans ces tissus chez les animaux examinés au stade aiguë de l'infection soient significativement supérieures (animaux 7 et 8).

Figure 2 - Exemple de quantification par PCR dans un échantillon de ganglion trigéminal

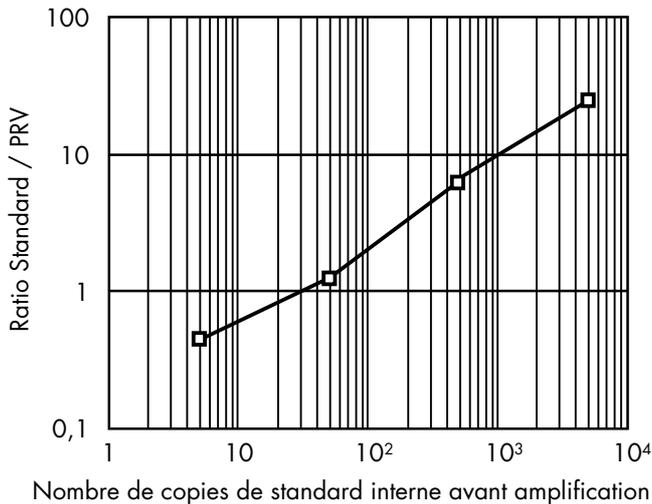
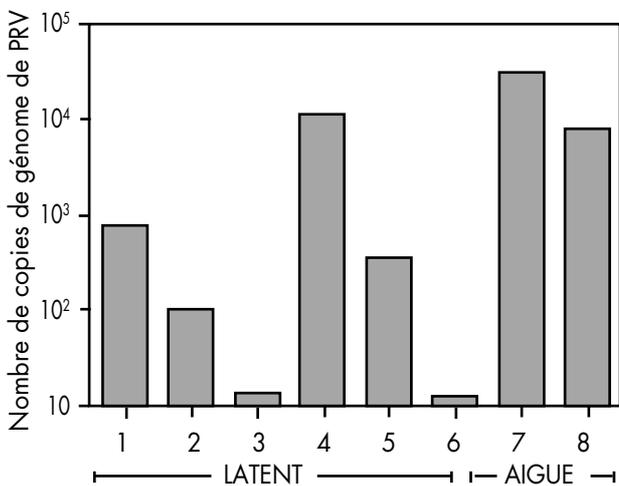


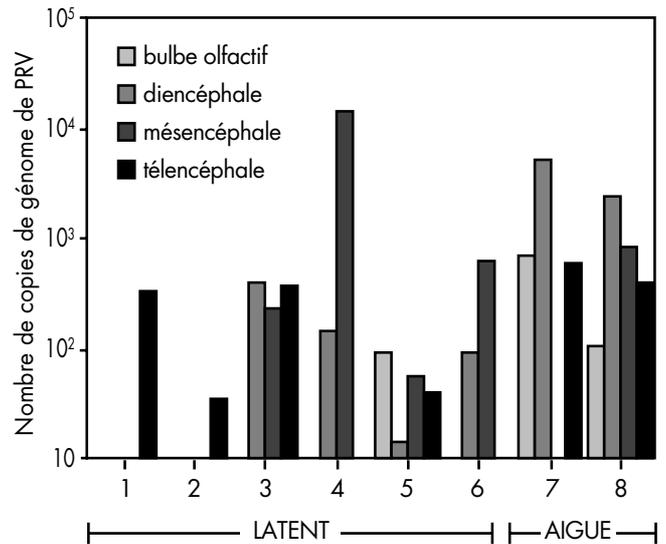
Figure 3 - Estimation du nombre de copies de PRV dans les ganglions trigéminals de différents porcs



2.3. Détermination du nombre de copies de génome viral dans divers tissus nerveux

Différents échantillons provenant de différentes parties de l'encéphale ont également été analysés: mésencéphale, diencéphale, télencéphale et bulbe olfactif. Les résultats sont représentés sur la figure 4. La encore, on peut constater que les quantités de génome viral sont très variables d'un animal à l'autre et également plus élevées dans les tissus prélevés au stade aiguë de l'infection (7,8) que pendant la phase de latence (1 à 6). Cependant ces quantités restent globalement plus faibles que dans les ganglions trigéminals.

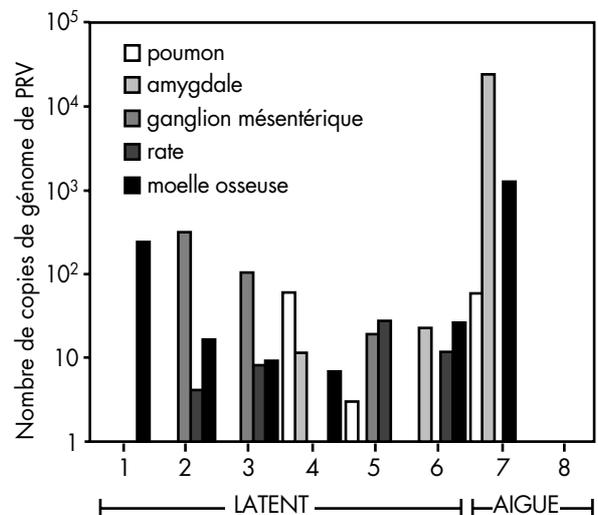
Figure 4 - Nombre de copies de génome viral dans divers tissus nerveux



2.4. Détermination du nombre de copies de génome viral dans divers tissus non nerveux

Des prélèvements issus de divers autres tissus (rate, moelle osseuse, amygdale, poumons, ganglions mésentériques) ont également été analysés (figure 5). Sur les deux animaux étudiés en phase aiguë, un animal présentait des quantités élevées de génome de PRV dans les amygdales et la rate (animal numéro 7), tandis qu'aucun génome de virus n'était détecté dans ces tissus chez le deuxième animal (numéro 8). Lors de la phase latente, les quantités de génome viral présentes dans les mêmes tissus étaient comprises entre zéro et 200 copies par million de cellules porcines (numéros 1 à 6).

Figure 5 - Nombre de copies de génome viral dans divers tissus non nerveux



3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Plusieurs méthodes de PCR quantitative ont été décrites récemment. Nous avons choisi de développer une méthode

faisant appel à l'utilisation d'un standard interne et à la détection par fluorescence des produits d'amplification à l'aide d'un séquenceur automatique d'ADN (PORCHER et al, 1992; PANNETIER et al, 1992-1993). Cette méthodologie a été utilisée dans le but d'établir un test quantitatif pour la mesure de faibles quantités de génome du virus PRV in vivo. Ce choix a été guidé par plusieurs raisons. L'utilisation d'un standard interne s'est montrée efficace (PANNETIER et al, 1993), particulièrement lorsque celui-ci possède des propriétés similaires à celles de l'ADN cible et lorsque le même couple d'amorces est utilisé pour amplifier les deux espèces moléculaires. De cette manière, il est possible d'éliminer les causes possibles d'artefacts dues à des différences d'efficacité d'amplification entre le standard et l'ADN cible. De plus, nous utilisons la détection par fluorescence à l'aide d'un séquenceur automatique d'ADN car ceci ne nécessite pas l'utilisation de radio-isotopes, tout en conservant une excellente sensibilité. Cependant cette méthodologie de détection reste lourde, coûteuse, et utilise un matériel qui n'est pas encore partout disponible.

Plusieurs méthodes ont été développées dans le but de détecter les herpèsvirus à l'état latent. La présence de virus peut être détectée après réactivation in vivo (SAWTELL et THOMPSON, 1992) ou bien après réactivation in vitro par explantation et coculture des tissus infectés (BERAN et al, 1980), mais ces méthodes sont longues et manquent de sensibilité. Les techniques moléculaires sont généralement plus puissantes. C'est le cas des hybridations de type Southern ou "dot blot" (GUTEKUNST, 1979; RZIHA et al, 1986) ou bien de l'hybridation in situ (ROCK et FRASER, 1983; BROWN et al, 1990). Cependant, la quantification des génomes latents est difficile à réaliser avec ces techniques. Les blots peuvent donner une information semi-quantitative mais il n'est pas toujours possible de détecter de très faibles quantités de virus. Le nombre de cellules positives sur une

coupe de tissus peut être déterminé par hybridation in situ, mais l'information reste limitée par la taille de la zone observée.

Une méthode quantitative basée sur la PCR a été récemment décrite pour le virus PRV (SCHANG et OSORIO, 1995). Cependant, cette dernière méthode utilise une séquence standard endogène porcine (le gène Nuclear Factor 1) qui nécessite l'addition d'une paire d'oligonucléotides supplémentaire dans la réaction et qui, de plus, est hétérologue par rapport à la séquence virale à quantifier. Par ailleurs, la détection des produits d'amplification est réalisée par transfert de type Southern à l'aide de sondes radioactives.

En conclusion, nous avons développé une méthode de PCR quantitative basée sur la coamplification avec un standard interne et la détection par fluorescence. Cette méthode s'est avérée suffisamment sensible et spécifique pour détecter de faibles quantités de génomes du virus PRV dans des prélèvements de tissus porcins. Cette méthodologie sera utilisée dans des études visant à déterminer avec précision les sites d'établissement de la latence de souches virales recombinées ainsi que dans des études d'efficacité vaccinale. Pour ce faire, une méthode de PCR quantitative destinée à la quantification des transcrits associés à la latence (LATs), basée sur le même principe sera également utilisée (travaux en cours).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement R. CARIOLET, G. BENNEVENT et B. BEAUREPAIRE pour la production des animaux et pour leur assistance technique lors des prélèvements d'échantillons, ainsi que le Dr. H.-J. RZIHA pour le don de la souche de PRV phylaxia B111.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BELAK S., BALLAGI-PORDANY A., FLENSBURG J., 1989. Arch. Virol., 108, 279-286.
- BERAN G.W., DAVIES E.B., ARAMBULO P.V., WILL L.A., HILL H.T., ROCK D.L., 1980. J. Am. Vet. Med. Assoc., 176, 998-1000.
- BOUTIN P., ARNAULD C., THIERY R., COSTA J.M., JESTIN A., 1994. Acta Veterinaria Hungarica, 42, 381-385.
- BROWN T.M., OSORIO F.A., ROCK D.L., 1990. Vet. Microbiol., 24, 273-280.
- DANGLER C.A., HENDERSON L.M., BOWMAN L.A., DEEVER R.E., 1993. Am. J. Vet. Res., 54, 540-545.
- GALEOTA-WHEELER J., OSORIO F. A., 1991. Am. J. Vet. Res., 52, 1799-1803.
- GUNTERKUNST D.E., 1979. Am. J. Vet. Res., 40, 1568-1572.
- HASEBE H., GALEOTA-WHEELER J., OSORIO F. A., 1993. Vet. Microbiol., 34, 221-231.
- JESTIN A., FOULON T., PERTUISSET B., BLANCHARD P., LABOURDET M., 1990. Vet. Microbiol., 23, 317-329.
- LONGO M.C., BERNINGER M.S., HARTLEY J.L., 1990. Gene, 93, 125-128.
- KATZ J.B., PEDERSEN J.C., 1992. Biologicals, 20, 187-195.
- LOKENSGAARD J.R., THAWLEY D.G., MOLITOR T.W., 1991. J. Virol. Methods, 34, 45-55.
- MAES R., BEISEL C., SPATZ S., THACKER B., 1990. Vet. Microbiol., 24, 281-295.
- PANNETIER C., COCHET M., DARCHÉ S., KOURILSKY P., 1992. C.R. Acad. Sci. Paris, Série III 315, 271-277.
- PANNETIER C., DELASSUS S., DARCHÉ S., SAUCIER C., KOURILSKY P., 1993. Nucleic Acid. Res., 21, 577-583.
- PORCHER C., MALINGE M.C., PICAT C., GRANDCHAMP B., 1992. BIOTECHNIQUES, 13, 106-113.
- ROCK D.L., FRASER N.W., 1983. Nature, 302, 523-525.
- RIZHA H.J., METTENLEITER T.C., OHLINGER V., WITTMANN G., 1986. Virology, 155, 600-613.
- SAWTELLE N.M., THOMPSON R.L., 1992. J. Virol. 66, 2150-2156.
- SCHANG L.M., OSORIO F.A., 1995. J. Virol. Methods, 50, 269-280.
- SCHERBA G., JIN L., SCHNITZLEIN W.M., VODKIN M.H., 1992. J. Virol. Methods, 38, 131-144.
- THIÉRY R., BOUTIN P., ARNAULD C., JESTIN A., 1995. Biotechniques, 18, 212-213.