

## Utilisation de la technique d'amplification de gène pour la détection du virus de la maladie d'Aujeszky dans le sperme de verrat

C Guérin, M Allietta, B Guérin \*, M Thibier

*Laboratoire pour le contrôle des reproducteurs, 13, rue Jouët, BP 65, 94703 Maisons-Alfort, France*

(Reçu le 9 septembre 1993 ; accepté le 6 octobre 1994)

**Résumé** — Le but de cette étude est de préciser les conditions d'utilisation de la technique d'amplification de gène pour la détection du virus de la maladie d'Aujeszky dans le sperme de verrat. Du sperme de verrat a été artificiellement contaminé par le virus, et soumis à la technique d'amplification génique par la polymérase (PCR). La fraction liquide du sperme de verrat était inhibitrice pour l'amplification de gène. Seul un prétraitement enzymatique des échantillons par la protéinase K suivi d'une extraction de l'ADN viral sur une matrice en fibres de verre a permis de lever l'inhibition. Cette méthode simple et rapide a détecté environ 370 séquences cibles d'ADN viral par microlitre d'échantillon. L'emploi d'une sonde spécifique marquée pour détecter le produit d'amplification pourrait permettre d'améliorer la sensibilité de la technique.

**amplification génique par polymérase / Aujeszky / sperme / verrat / virus**

**Summary** — **Detection of pseudorabies virus in semen of boars by a polymerase chain reaction.** *The aim of the present study was to specify the experimental conditions for the use of the polymerase chain reaction (PCR) in the detection of the pseudorabies virus in boar semen. Boar semen was artificially contaminated by Aujeszky's disease virus and submitted to the PCR. The seminal plasma fraction of the semen was found inhibitory for PCR. An incubation of the samples with proteinase K followed by an extraction of the viral DNA on a glass matrix was shown to be able to remove the inhibition. The method was simple, rapid and allowed the detection of around 370 viral DNA sequences per microliter of sample. The detection of the amplified DNA by a specific enzymatically labelled probe could improve the sensitivity of the method.*

**polymerase chain reaction / pseudorabies virus / Aujeszky / semen / boar**

\* Correspondance et tirés à part

## INTRODUCTION

Le virus de la maladie d'Aujesky (SHV1) a, chez le porc adulte, un tropisme essentiellement respiratoire. Cependant, lors d'épisodes aigus, le virus peut être isolé du sperme de verrats (Medveczky et Szabo, 1981 ; Vannier et Gueguen, 1979). La méthode de référence pour le diagnostic est l'isolement du virus sur cultures cellulaires. Elle est sensible et spécifique mais nécessite l'entretien de cultures cellulaires, inconvenient qui est associé à un délai de réponse important. Certaines publications font aussi état d'une toxicité du sperme de verrat pour les cultures cellulaires (Medveczky et Szabo, 1981).

La technique d'amplification de gène (*polymerase chain reaction* : PCR) a connu ces dernières années un développement important, en raison de sa sensibilité et de sa rapidité d'exécution. Elle a déjà été employée avec succès pour la détection du virus de la maladie d'Aujesky dans des prélèvements de cellules nasales ou ganglionnaires (Belak *et al*, 1989 ; Jestin *et al*, 1990 ; Lokensgard *et al*, 1991 ; Maes *et al*, 1990).

Le but de la présente étude est l'adaptation de la technique d'amplification de gène pour la mise en évidence du virus de la maladie d'Aujesky dans le sperme de verrat.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

En l'absence de sperme de verrat naturellement infecté par le virus de la maladie d'Aujesky, des échantillons de semence ont été artificiellement contaminés par le virus.

Le virus a été produit sur cellules PK15 à partir de la souche Kojnok (gracieusement fournie par les services du professeur B Toma, École nationale vétérinaire d'Alfort, France). Le surnageant de culture titrait  $10^{7.6}$  doses effet cytopathogène 50 (DECP<sub>50</sub>/ml) ; des dilutions en série ont été effectuées afin de déterminer la sensibilité de la méthode.

La semence provenait de verrats de centres d'insémination indemnes de maladie d'Aujesky et dûment contrôlés. Les fractions séminales (SN)

et cellulaires (SZ) ont été séparées par centrifugation, 10 min à 1500 g. Les spermatozoïdes ont été lavés 4 fois en PBS afin d'éliminer les sécrétions séminales.

L'épreuve contaminante a consisté en un mélange extemporané de 9 parties d'échantillon spermatique (sperme total = ST, surnageant de centrifugation = SN ou culot de centrifugation contenant les spermatozoïdes = SZ) et d'une partie de suspension virale. Après mélange au vortex, l'échantillon a été déposé sur glace fondante. Les traitements appliqués aux échantillons avant amplification ont été les suivants :

- i) absence de traitement ;
- ii) digestion par un tampon de lyse (NaCl 300 mM ; EDTA 5 mM ; Tris HCl pH 8:20 mM ; sodium Dodecyl Sulfate : 1%) 10 min à 37°C ;
- iii) digestion enzymatique par la protéinase K (Boehringer Mannheim, BP 59, 38242 Meylan cedex) : 100 µg/ml, SDS 0,5%, 1 h à 55°C ;
- iv) traitement par le tampon de lyse (ii) puis par la protéinase K (iii) ;
- v) traitement par le tampon de lyse (ii), la protéinase K (iii) puis extraction chimique au phénol-chloroforme selon les protocoles classiques (Maniatis *et al*, 1982) ;
- vi) chauffage à 115°C pendant 10 min, traitement par la protéinase K (iii), puis extraction de l'ADN viral par adsorption sur fibres de verre en présence d'iodure de sodium saturé (Vogelstein et Gillespie, 1979).

La technique d'amplification était dérivée de celle décrite par Jestin *et al* (1990). Après préchauffage à 115°C pendant 10 min, 1 µl d'échantillon a été ajouté à 9 µl de mélange réactif (dNTP) : 200 mM ; (primers : 5'CG.TAC.CGC.GCC.CAC.GTG.GCC3'; 5'GTC.GGT.GAG.GAT.GTT.CAC.GC3') : 1 µM ; [Taq polymérase] : 2,5 U/100 µl ; [MgCl<sub>2</sub>] : 2,5 mM ; [Tris HCl] : 100 mM ; (KCl) : 500 mM ; Triton x 100 1% ; pH = 8,8).

L'amplification a eu lieu sous huile minérale dans un thermocycler Perkin Elmer selon le cycle suivant : 2 min à 96°C, 30 cycles comprenant 1 min 30 à 94°C, 30 s à 65°C, 30 s à 72°C ; 8 min à 72°C.

La détection a été effectuée sur gel d'agarose (Seakem 2% - bromure d'éthidium 0,5 µg/ml) après électrophorèse (100 v 1/2h) de 5 µl d'échantillon amplifié et observation des bandes en transillumination UV. Un résultat positif a été matérialisé sur le gel par la présence d'une bande de 262 paires de bases. Le produit d'amplification a été digéré par une enzyme de restriction (Nar I), et la taille des sous produits a été contrôlée (Jestin *et al*, 1990).

## RÉSULTATS

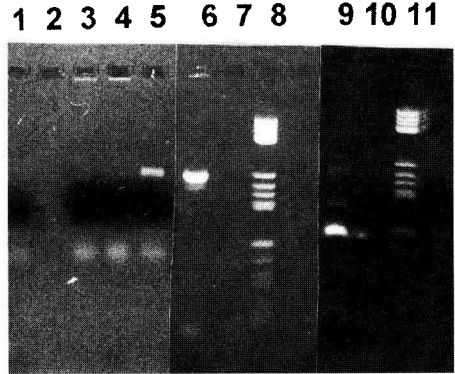
La méthode d'amplification de gène appliquée à des échantillons constitués de sperme total (ST) et de virus a donné des résultats négatifs : aucune bande n'a été détectée sur le gel. Lorsque les fractions du sperme ont été séparées, la séquence recherchée a été détectée dans la fraction contenant les spermatozoïdes lavés (figs 1-5), et pas dans celle contenant les sécrétions séminales (figs 1-4). Le préchauffage à 115°C a entraîné en outre la coagulation des protéines du plasma séminal et rendu difficile le prélèvement d'une partie aliquote. Ces premiers résultats nous ont amenés à soumettre les échantillons SN ou ST à divers traitements avant amplification. Ni les procédés de digestion enzymatique, ni ceux d'extraction chimique n'ont donné de résultats satisfaisants. Seul le protocole n° 6 comprenant une digestion enzymatique et l'extraction de l'ADN viral sur fibres de verre a donné des résultats régulièrement positifs après amplification (tableau I). L'effet inhibiteur observé dans les échantillons contenant la fraction séminale du sperme a disparu. Des échantillons contenant des quantités décroissantes de virus ont été testés par le protocole précédent. La plus faible concentration virale détectée par ce système était  $10^{5,6}$  DECP<sub>50</sub>/ml, soit environ 370 séquences cibles d'ADN par  $\mu$ l d'échantillon testé (fig 2).

## DISCUSSION

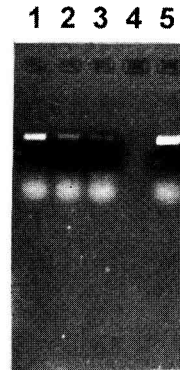
Les résultats obtenus avec les mélanges ST/SHV1 ou SN/SHV1 ont montré l'impossibilité de détecter le virus dans les échantillons contenant la fraction liquide du sperme, et suggèrent la présence d'inhibiteurs de l'amplification dans le plasma séminal du verrat. Plusieurs protocoles ont été envisagés afin de supprimer cette inhibition.

Bien que non inhibitrice, l'utilisation de la fraction cellulaire du sperme (SZ) a été écartée. En effet, cette fraction comporte une

quantité importante d'ADN cellulaire risquant d'interférer avec l'amplification de la séquence virale recherchée. D'autre part, une étude réalisée sur du sperme de bovin naturellement contaminé par le virus de la rhinotrachéite bovine infectieuse (BHV1) montre que la majeure partie du virus se trouve dans la phase liquide du sperme (Guerin *et al*, 1993).



**Fig 1.** Détection du SHV1 après amplification de gène. Électrophorèse 100 V, 1 h. 1. Témoin négatif ; 2. Vide ; 3. ST + SHV1 ; 4. SN + SHV1 ; 5. SZ + SHV1 ; 6. Fragment amplifié : 262 bp ; 7. Vide ; 8. Marqueur moléculaire (PBR322 digéré par HaeIII) ; 9. Fragment amplifié digéré par NarI ; 10. Vide ; 11. Marqueur moléculaire (PBR322 digéré par HaeIII).



**Fig 2.** Détection après amplification de gène, d'échantillons SN + SHV1 traités par protéinase K puis adsorption sur fibres de verre. Électrophorèse 100 V, 1/2 h. 1.  $10^{6,6}$  DECP<sub>50</sub>/ml ; 2.  $10^{5,9}$  DECP<sub>50</sub>/ml ; 3.  $10^{5,6}$  DECP<sub>50</sub>/ml ; 4. Vide ; 5. Témoin positif.

**Tableau I.** Détection de la séquence virale par transillumination UV après amplification de gène.

Traitement avant amplification	Type d'échantillon		
	ST + SHV1	SN+ SHV1	SZ + SHV1
i) Aucun	-	-	+
ii) Tampon de lyse (NaCl : 300 mM; EDTA : 5 mM ; TrisHCl pH8 : 20 mM ; SDS 1%) 10 mn à 37°C	-	-	NT
iii) Protéinase K : 100 µg/ml ; SDS : 0,5% 1 h à 55°C	-	-	NT
iv) Tampon de lyse (ii) + Pase K (iii)	-	-	NT
v) Tampon de lyse (ii) + Pase K (iii) + extraction phénolchloroforme	-	-	NT
vi) 115°C 10 min + Pase K (iii) + adsorption sur fibres de verre	NT	+	NT

ST : sperme total ; SN : fraction séminale ; SZ : spermatozoïdes ; + : présence d'une bande de 262 paires de bases ; - : absence de bande ; NT : non testé.

Les essais ultérieurs ont donc été réalisés avec la fraction liquide de la semence (SN) contaminée par SHV1. Les traitements enzymatiques par la protéinase K et le SDS ont conduit à des résultats négatifs. L'extraction de l'ADN viral a alors été envisagée. La concentration du virus par ultracentrifugation a été écartée en raison du lourd investissement en matériel qu'elle demande.

Les extractions chimiques par le phénol et le chloroforme étaient longues, fastidieuses et susceptibles de générer elles-mêmes, comme il est apparu ici, des inhibiteurs de l'amplification.

Seule la purification de l'ADN sur fibres de verre, après traitement enzymatique par la protéinase K, a permis de resuspendre l'ADN extrait dans un milieu neutre pour l'amplification de gène, et a donné des résultats satisfaisants.

Dans les années passées, la technique d'amplification de gène a été employée avec succès sur des échantillons cellulaires, frottis ou cellules sanguines. Cependant, lorsqu'elle était employée sur des prélèvements fécaux (Xu *et al*, 1990) ou urinaires (Demmler *et al*, 1988 ; Yamagushi *et al*, 1992), l'existence de facteurs inhibiteurs a

été démontrée. Chez le verrat, le volume de l'éjaculat est très important, et les sécrétions séminales en constituent la part principale. Les composants en sont multiples (sels minéraux, enzymes,...) et l'existence d'un facteur inhibiteur parmi eux est plausible. Sa caractérisation reste toutefois délicate. L'extraction de l'ADN viral à partir de la fraction séminale du sperme semble donc constituer une solution intéressante.

La sensibilité de la méthode est ici d'environ 370 particules virales par µl d'échantillon testé, soit 60 fg d'ADN, ce qui est cohérent avec les résultats publiés par d'autres auteurs (Lokensgard *et al*, 1991 ; Maes *et al*, 1990). Le système de détection employé ici, le bromure d'éthidium, ne permet toutefois pas de mettre en évidence sur le gel après amplification moins de 50-100 ng d'ADN. L'utilisation d'un système de détection plus sensible, tel qu'une sonde ADN marquée par une enzyme et révélée par un substrat chemoluminescent, devrait permettre, sans trop alourdir le protocole, de détecter de plus petites quantités d'ADN. Elle permettrait dans le même temps de s'assurer de la spécificité du fragment amplifié.

Parmi les autres méthodes de diagnostic, l'isolement du virus sur culture cellulaire pré-

sente la plus grande sensibilité, une seule particule virale infectante pouvant être détectée. Cependant, lors des phases de latence, les particules virales ne peuvent être mises en évidence. Les autres techniques, immunofluorescence, immunopéroxydase ou sonde ADN, souffrent d'un manque de sensibilité (Wongwatcharadumrong *et al*, 1992). Une sonde ADN employée pour la détection du BHV1 dans le sperme de Bovin ne détecte que  $10^4$  particules environ par dot blot (Pacciarini *et al*, 1988).

Les avantages du protocole décrit ici sont multiples. L'emploi de la technique PCR permet la multiplication du nombre de séquences d'ADN viral et augmente ainsi la sensibilité. Relativement rapide, la méthode permet d'obtenir un diagnostic en quelques heures, quelle que soit la viabilité des particules virales. Le procédé d'adsorption sur fibres de verre est simple, rapide et ne demande aucun équipement sophistiqué. Il permet d'utiliser la technique d'amplification de gène sur des échantillons de sperme de verrat initialement inhibiteurs. La sensibilité de la méthode est satisfaisante mais mériterait d'être associée à un système de détection plus performant. Il serait également souhaitable de vérifier les résultats obtenus ici sur des échantillons de sperme provenant de verrats naturellement contaminés par le virus de la maladie d'Aujeszky.

En conclusion, malgré l'activité inhibitrice de la fraction liquide de sperme de verrat sur l'amplification génique, la combinaison d'un prétraitement enzymatique et d'une extraction de l'ADN viral sur une matrice de verre permet le recours à la PCR et la détection d'une contamination du sperme de verrat par une faible quantité de virus de la maladie d'Aujeszky.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené grâce à l'aide précieuse de MM Adama Diallo (CIRAD-IEMVT) et Paul Tchen (université Paris-VII).

## RÉFÉRENCES

- Belak S, Ballagi-Pordany A, Flensburg J, Virtanen (1989) Detection of pseudorabies virus DNA sequences by the polymerase chain reaction. *Arch Virol* 108, 279-286
- Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA (1988) Detection of cytomegalovirus on urine from newborns using PCR DNA amplification. *J Infect Dis* 158, 117-1184
- Guerin C, Harlay T, Guerin B, Thibier M (1993) Distribution of BHV1 in fractions of semen from a naturally infected bull. *Theriogenology* 40, 997-1002
- Jestin A, Foulon T, Pertuiset B, Blanchard P, Labourdet M (1990) Rapid detection of pseudorabies virus genomic sequences in biological samples from infected pigs using polymerase chain reaction DNA amplification. *Vet Microbiol* 23, 317-328
- Lokensgard JR, Thawley DG, Molitor TW (1991) Enzymatic amplification of the latent pseudorabies virus nucleic acid sequences. *J Virol Methods* 34, 45-55
- Maes RK, Beisel CE, Spatz SJ, Thacker BJ (1990) Polymerase chain reaction amplification of pseudorabies virus DNA from acutely and latently infected cells. *Vet Microbiol* 24, 281-295
- Medveczky I, Szabo I (1981) Isolation of Aujeszky's disease virus from boar semen. *Acta Vet Acad Sci Hung* 29, 29-35
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, États-Unis
- Pacciarini M, Agresti A, De Simone F, Poli G, Torretta E, Siccardi AG, Meneverini R, Ginelli E (1988) Detection of bovine herpes virus 1 semen infections by a dot blot hybridization assay. *Br Vet J* 144, 55-63
- Vannier P, Guegen B (1979) Excrétion du virus de la maladie d'Aujeszky par les voies génitales mâles du porc. Persistance du virus dans la semence de verrat. *Journ Rech Porcine Fr* 401-406
- Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 76, 615-619
- Wongwatcharadumrong R, Kunavongkrit A, Neumüller M, Linné T (1992) Comparison of virus isolation, immunofluorescence and DNA probe hybridization for detection of pseudorabies virus in experimentally infected pigs. *J Vet Med* 39, 91-96
- Xu L, Harbour D, McCrae MA (1990) The application of the PCR to the detection of rotaviruses in faeces. *J Virol Methods* 27, 29-38
- Yamagushi Y, Hironaka T, Kajiwara M, Tateno E, Kita H, Hirai K (1992) Increased sensitivity for detection of human cytomegalovirus in urine by removal of inhibitors for the PCR. *J Virol Methods* 37, 209-218