

20ème Journée d'Étude



2 Mars 1994

Evolution des méthodes de diagnostic du virus de la peste équine

Evolution of the diagnosis methods of African horse sickness virus

par : S. Zientara,
Corinne Sailleau et S. Moulay

CNEVA-Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, 22 rue Pierre Curie, 94703 Maisons-Alfort (France)

Résumé

Cet article décrit l'utilisation de la méthode combinée de transcription inverse et d'amplification en chaîne par polymérase pour la détection des ARN génomiques du virus de la peste équine à partir d'échantillons cliniques. Les ARN totaux ont été extraits à partir de 100 mg de 19 rates de chevaux infectés par le virus AHSV sérotype 4 (le virus a été isolé de chacune des rates) par la méthode d'extraction à l'isothiocyanate de guanidium. L'ARN a ensuite été dénaturé par l'hydroxyde de méthyle mercure. Dans un même tube et en une seule manipulation, l'ADN complémentaire du segment génomique 7 est synthétisé par la transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire et amplifié par la Taq polymérase. Les fragments génomiques amplifiés sont visualisés sur gel d'agarose (1179 pb) et leur spécificité vérifiée par l'analyse de leurs profils de restriction obtenus avec 8 enzymes. Aucun fragment n'a été amplifié à partir de rates de chevaux non infectées.

Mots-clés : cheval - peste équine - amplification en chaîne.

Summary

This paper describes a single tube reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) method for detection of African horse sickness virus (AHSV) in splenic tissues from infected horses. Double stranded RNA was extracted from infected organs of horses and used to produce complementary DNA (cDNA) with the two primers selected for the PCR. The 1179 bp amplified product (the segment 7 which encodes for VP 7), detected by electrophoresis on agarose gel and ethidium bromide staining, was hydrolysed with eight restriction endonucleases for characterization of the AHSV. Application of the RT-PCR method should improve detection and shorten the time required to confirm a clinical diagnosis of AHSV infection.

Key-words : horse - african horse sickness - polymerase chain reaction

INTRODUCTION

La peste équine est une maladie virale qui affecte les équidés et plus particulièrement les chevaux, dont elle provoque très fréquemment la mort. Le virus (AHSV ou African horse sickness virus) est transmis par l'intermédiaire d'insectes piqueurs, notamment les culicoïdes (du Toit, 1944) qui sont des vecteurs biologiques. Le virus appartient à la famille des Réoviridae et au genre Orbivirus (Verwoerd et al, 1979). Neuf sérotypes viraux ont, à ce jour, été décrits (Mc Instosh, 1958). En juillet 1987, l'Espagne fut déclarée infectée de peste équine (virus du sérotype 4). La maladie frappa aussi le Portugal en 1989 puis le Maroc la même année.

Le génome du virus équine est constitué de dix molécules d'ARN double-brin (Oellermann et al, 1970 ; Bremer, 1976). La capsid externe de ce virus nu est composée de deux protéines majeures (VP2 et VP5) qui portent les sites de fixation au récepteur cellulaire et les épitopes de neutralisation.

La capsid interne est composée de deux protéines majeures (VP3 et VP7) (Bremer et al, 1990 ; Chuma et al, 1992) et de trois protéines mineures (VP1, VP4 et VP6). Des protéines non-structurales (NS1, 2, 3 et 4) (Grubman et Lewis, 1992 ; Mizukoshi et al, 1992) sont aussi présentes dans les cellules infectées.

Les méthodes classiques de diagnostic direct de cette infection sont l'inoculation intracérébrale aux souriceaux nouveau-nés et l'infection aux cultures cellulaires (BHK1 ou cellules Vero). Le diagnostic sérologique repose sur la recherche des anticorps fixant le complément, qui est la méthode officielle.

Mais aucune de ces méthodes n'est suffisamment sensible et précoce pour détecter de faibles quantités de virus.

Nous décrivons l'utilisation de la méthode combinée de transcription inverse et d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR pour "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction") pour la détection des ARN génomiques viraux à partir d'échantillons cliniques.

MATERIEL ET METHODES

Echantillons cliniques

Deux groupes de 10 et 9 échantillons de rates de chevaux suspects d'être morts de peste équine nous ont été fournis par le Dr El-Harrack (Laboratoire Biopharma, Maroc) et par le Dr Hooghuis du laboratoire de référence communautaire d'Algete (Madrid). Un échantillon d'une rate prélevée sur un cadavre d'un cheval marocain d'une région non infectée par la peste nous a aussi été adressé. Dix rates non infectées prélevées sur des cadavres de chevaux français ont été utilisées aussi comme témoins négatifs (tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques (année et origine géographique) des échantillons spléniques analysés par RT-PCR

Echantillon N°	Origine	Année	Isolement viral	Résultats par PCR
1	Kenitra (Maroc)	1989	-	+
2	Ouarzazate (Maroc)	1989	+	+
3	Khounbga (Maroc)	1989	+	+
4	Taounate (Maroc)	1989	+	+
5	Boulaouane (Maroc)	1989	+	+
6	Missour (Maroc)	1989	-	+
7	Fes (Maroc)	1989	+	+
8	Agadir (Maroc)	1989	+	+
9	Tahla (Maroc)	1989	+	+
10	Oujda (Maroc)	1989	- (témoin négatif)	-
11	Espagne	1990	+	+
12	Espagne	1990	+	+
13	Espagne	1990	+	+
14	Espagne	1990	+	+
15	Espagne	1990	+	+
16	Espagne	1990	+	+
17	Espagne	1990	+	+
18	Espagne	1990	+	+
19	Espagne	1990	+	+
20 à 29	France	de 1990 à 1993	- (témoin négatifs)	-

Recherches virales

Les recherches virales ont été réalisées par inoculation par voie intracérébrale à des souris nouveau-nés et par inoculation à des cultures de cellules Vero (réf. ATCC* CCl 81) cultivées en boîtes de 175 cm² avec du milieu RPMI 1640 supplémenté par du sérum de veau foetal (8%), de la streptomycine (100 µl/ml) et de la pénicilline (100 UI/ml) (Laviada et al, 1992). Le sérotype est déterminé par la méthode de séroneutralisation (Reed et Muench, 1938).

Extraction des acides nucléiques

Les ARN totaux sont extraits de 100 mg de prélèvements de rates (infectées ou non infectées) par la méthode de Chominczynski et Sacchi (1987) à l'isothiocyanate de guanidium.

100 mg de tissu splénique sont broyés et homogénéisés en présence d'une solution D (d'isothiocyanate de guanidium 4M, 25 mM citrate de sodium, pH 7, sarcosyl 0,5%, β -mercaptoéthanol 0,5M). Après extraction au phénol-chloroforme isoamylalcool (24:1), la solution obtenue est centrifugée à 13 000 tours/minute à 4°C.

Vingt unités de RNAsin (40 U/ μ ; Boehringer-Mannheim, Meylan, France) sont ajoutées à la phase aqueuse récupérée et qui contient les ARN. Les ARN sont précipités par l'isopropanol à -20°C pendant une nuit. Le culot obtenu après centrifugation (13 000 tours/minute, pendant 10 minutes) est repris dans 150 μ l de la solution D et précipité par l'isopropanol 2 heures à -20°C. Après centrifugation, le culot est resuspendu dans 1 ml d'éthanol à 75%, précipité, séché sous vide et repris dans 10 μ l d'eau traitée par le diéthylpyrocarbonate (DEPC).

Le même protocole est employé pour préparer les acides nucléiques extraits de cultures cellulaires infectées et non-infectées utilisées comme témoins positifs et négatifs.

* American Type Culture Collection

Amplimères

Les amplimères ont été sélectionnés à partir de la séquence publiée (Roy et al, 1991) du segment 7 du virus AHSV-4 (souche isolée en Espagne en 1987). Les oligonucléotides choisis permettent l'amplification entière du gène 7 (Zientara et al, sous presse).

La taille du segment génomique est de 1179 pb et le poids moléculaire de $7,7 \cdot 10^5$ Da (Roy et al, 1991). Les séquences des deux oligonucléotides sont respectivement : 5'GTAAAATTTCGGTTAGGATG3' et 5'GTAAGTGTATTCGGTATTGA3'.

RT-PCR

Les ARN db, repris sous un volume de 2,5 μ l, sont dénaturés par l'addition d'un volume égal d'hydroxyde de méthyle mercure 0,02 M et laissés 10 minutes à température ambiante (Wade-Evans et al, 1990).

Après réduction de l'hydroxyde de méthyle mercure par addition de 1 μ l de β -mercaptoéthanol 0,7 M, 2 μ l de RNAsin sont ajoutés (5 minutes à température ambiante).

Tous les réactifs nécessaires à la transcription inverse et à l'amplification en chaîne par polymérase sont ajoutés simultanément dans le même tube Eppendorf (0,5 ml) et les deux réactions sont effectuées pendant le même cycle de programmation dans le thermocycleur (Sellner et al, 1992b).

4 μ l du mix sont ajoutés à 100 μ l de Tris, pH 8,8, 50 mM KCl, 200 μ l de chaque dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml de gélatine, 10 pmol de chaque paire d'amplimères. Dix unités de la transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire (AMV-RT, Appligène, Illkirch, France) et 7 unités de la Taq polymérase (Boehringer-Mannheim) sont ajoutées dans chaque tube. Le rapport RT-Taq est inférieur à 3:2 comme le recommandent Sellner et al (1992a). Après addition de 100 μ l d'huile minérale, les tubes sont incubés dans un thermocycleur PTC 100/60 (Prolabo). Le protocole des cycles thermiques est le suivant : 1 heure à 37°C, 5 minutes à 95°C, 40 cycles à 55°C pendant 1 minute, 70°C pendant 2 minutes et 95°C pendant 1 minute puis une étape d'extension terminale à 70°C pendant 8 minutes.

Analyse des produits de la PCR

10 μ l du produit d'amplification de chaque réaction sont déposés sur un gel d'agarose à 2% (1% Nu-sieve/1% Sea-kem) (Nalgène, Tebu), dans un tampon Tris-borate EDTA 1 X. La migration s'effectue pendant 2 heures à 100 V. Après trempage dans du bromure d'éthidium, le gel est observé au transilluminateur. La migration des fragments viraux amplifiés est comparée à celle d'ADN marqueurs de poids moléculaires (marqueur de Boehringer-Mannheim, cat. n° 10662590).

Analyse par polymorphisme des profils de restriction

Des aliquotes de 10 μ l des produits d'amplification obtenus à partir des ARN génomiques de chaque sérotype sont hydrolysés par des enzymes de restriction (10 U par réaction) : *Asn* I, *Bam*H I, *Hinf* I, *Pvu* II, *Sac* I, *Sph* I, *Cfo* I (Boehringer-Mannheim) et *Hph* I (Ozyme) sous un volume total de 20 μ l à 37°C pendant 2 heures.

Les fragments de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (Zientara et al, sous presse).

Résultats

Recherches virales

Le virus de la peste équine a été isolé à partir de tous les échantillons suspects (rates espagnoles et marocaines) à l'exception des rates marocaines n°1 (Kenitra) et 6 (Missour). Les tests de neutralisation ont confirmé que les virus (souches espagnoles et marocaines) appartenaient au sérotype 4.

RT-PCR

Un seul segment de 1179 pb est observé sur gel d'agarose après amplification à partir d'acides nucléiques extraits de cultures cellulaires infectées (Fig. 1, puits 2), de cerveaux de souris infectés (Fig. 1, puits 3 à 5) et d'échantillons spléniques (Fig. 2A-2B, puits 10).

La figure 3 représente l'électrophorèse des fragments obtenus après digestion de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène 7 du virus AHSV-4 de la souche marocaine par huit enzymes de restriction pour vérification de la spécificité du produit d'amplification. Le profil de restriction obtenu est identique à celui de l'ADNc du gène 7 de la souche espagnole du virus AHSV-4 (données personnelles ; Zientara et al, sous presse).

Comparaison RT-PCR et recherches virales

Le tableau 1 résume les résultats respectifs de l'amplification génique RT-PCR et des recherches virales à partir des échantillons biologiques. Dix-huit échantillons spléniques (n°1 à 9 et n°11 à 19) se sont avérés être positifs par RT-PCR. De seize d'entre eux, le virus a pu être isolé par inoculation aux cultures cellulaires et des échantillons n°1 et 6, aucun virus n'a pu être isolé.

1 2 3 M 4 5 6 7

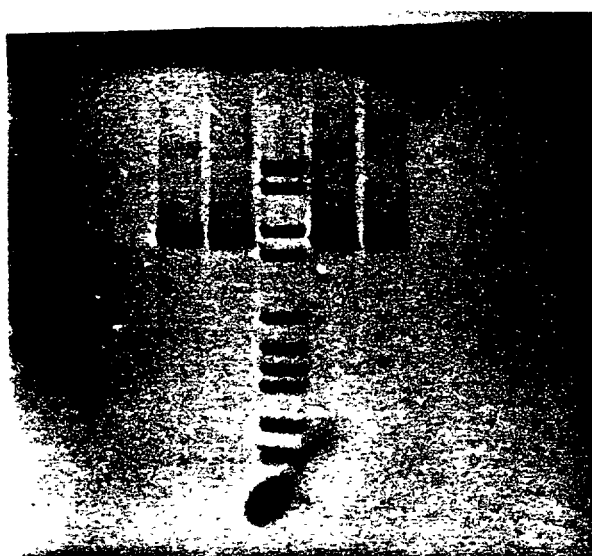
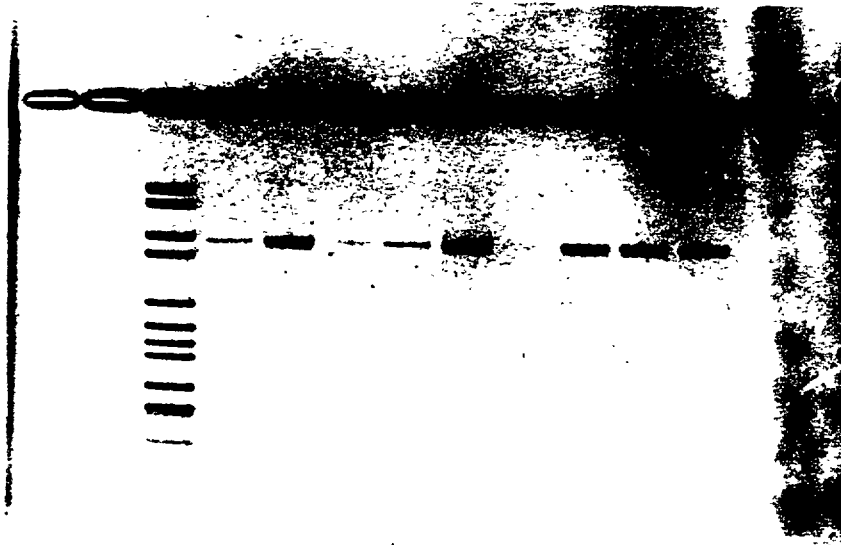


Figure 1 : produits d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose. Puits 1 : cellules Vero non infectées ; puits 2 : cellules infectées par AHSV-4 ; puits 3 à 5 : cerveaux de souriceaux nouveau-nés infectés par AHSV-4 ; puits 6 et 7 : cerveaux de souriceaux non infectés. Le marqueur de poids moléculaire (M) est le plasmide de pBR 328 digéré par *Bgl* I et *Hinf* I.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

A



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M

B



Figure 2 : produits d'amplification obtenus après RT-PCR à partir de rates infectées prélevées sur des chevaux marocains (A) et espagnols (B). A : puits 1 à 9 : rates de chevaux infectés ; puits 10 : rate de cheval marocain non infecté. B : puits 1 à 9 : rates de chevaux infectés ; puits 10 : rate non infectée ; puits 11 : témoin négatif (absence d'ADNc). Le marqueur de poids moléculaire (M) est le plasmide digéré par le *Bgl* I et *Hinf* I.

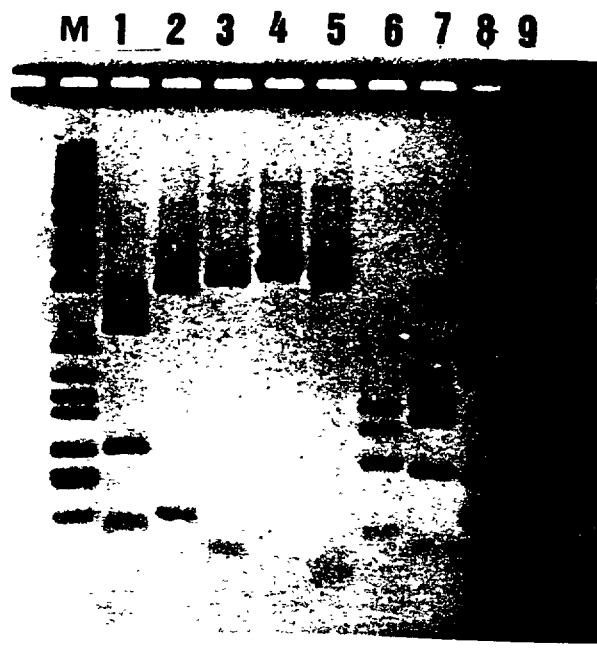


Figure 3 : vérification de la spécificité du produits d'amplification après RT-PCR du segment génomique 7 de la souche marocaine du virus AHSV-4 par polymorphisme de restriction. Puits 1 : *Sac* I ; puits 2 : *Hinf* I, ; puits 3 : *Bam*H I ; puits 4 : *Pvu* II ; puits 5 : *Sph* I ; puits 6 : *Asn* I ; puits 7 : *Hph* I ; puits 8 : *Cfo* I et puits 9 : ADNc amplifié non digéré. M : marqueur de poids moléculaire.

Discussion

La mise au point d'une technique RT-PCR effectuée en une seule étape pour la détection du virus de la peste équine est décrite. La transcription inverse ("reverse transcription") suivie d'une amplification en chaîne par polymérase ("polymerase chain reaction" ou PCR) des ARN db génomiques du virus équine par l'emploi d'amplimères spécifiques, associées à une analyse du polymorphisme de restriction, constitue une méthode sensible et relativement rapide pour la détection et l'identification du virus AHSV à partir d'échantillons cliniques.

La technique RT-PCR détecte moins de 600 DCP₅₀ (doses cytopathogènes 50%) (à partir de cultures cellulaires infectées) alors que l'ELISA sandwich n'en détecte que $2,5 \times 10^3$ DCP₅₀ (Laviada et al, 1992). Mais les DCP₅₀ ne sont qu'une mesure du pouvoir infectieux et leur corrélation avec le nombre de particules virales et donc de génomes viraux n'est pas nécessairement proportionnelle. Bien que la RT-PCR se soit révélée positive, aucun virus n'a pu être isolé à partir des deux échantillons 1 et 6. Ces résultats divergents peuvent s'expliquer par une très faible quantité de particules virales dans l'échantillon clinique ou par une inactivation du virus équine à cause d'un délai trop long entre la mort de l'animal et le prélèvement biopsique ainsi que les mauvaises conditions de conservation de l'échantillon. Par contre, les ARN génomiques ont pu être amplifiés.

Le diagnostic de laboratoire dans le cas d'une suspicion d'épizootie de peste équine ne doit pas être uniquement basé sur des analyses sérologiques (car un grand nombre d'animaux infectés peuvent mourir avant que les anticorps ne soient décelables) (Rodriguez et al, 1993) mais sur la détection du virus dans les échantillons cliniques (rates, sang, coeur...) prélevés sur cadavres. La technique d'amplification en chaîne par polymérase est une méthode de détection spécifique, sensible et rapide (les résultats sont obtenus en moins de 48 heures alors que plusieurs jours sont parfois nécessaires pour l'isolement viral). Mais de par l'emploi de quelques réactifs parfois dangereux qu'elle nécessite et de par les contraintes de locaux et les précautions que cette technique impose afin d'éviter les contaminations, la PCR reste encore réservée à des laboratoires spécialisés.

Remerciements

Nous tenons à remercier le Dr Hooghuis du laboratoire de référence communautaire (Madrid) et le Dr El-Harrack (laboratoire Biopharma à Rabat) pour les échantillons qu'ils nous ont adressés. Ce travail a été financé par la Communauté Economique Européenne (projet 8001-CT 91-0211).

Bibliographie

- Bremer C.W. (1976). A gel electrophoretic study of the protein and nucleic acid components of African horsesickness virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 43, 193-200.
- Bremer C.W., Huismans H., Van Dijk A.A. (1990). Characterization and cloning of the African horsesickness virus genome. *J. Gen. Virol.*, 71, 793-799.

- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). A single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
- Chuma T., Le Blois H., Sanchez-Vizcaino J.M., Diaz-Laviada M., Roy P. (1992). Expression of the major core antigen VP7 of the African horsesickness virus by a recombinant baculovirus and its use as a group-specific diagnostic reagent. *J. Gen. Virol.*, 73, 925-931.
- Du Toit R.M. (1944). The transmission of bluetongue and horse sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 50, 536-541.
- Grubman M.J., Lewis S.A. (1992). Identification and characterization of the structural and nonstructural proteins of African horsesickness virus and determination of the genome coding assignments. *Virology*, 186, 444-451.
- Laviada M.D., Babib M., Dominguez J., Sanchez-Vixcaino J.M. (1992). Detection of African horsesickness in infected spleens by a sandwich ELISA using two monoclonal antibodies specific for the VP7. *J. Virol. Methods*, 38, 229-242.
- Mc Intosh B.M. (1958). Immunological types of horsesickness virus and their significance in immunization. *Onderstepoort, J. Vet. Res.*, 27, 465-538.
- Mizukoshi N., Sakamoto K., Iwata A., Tsuchiya T., Ueda S., Watanabe T., Kamada M., Fukusho A. (1992). The complete sequence of African horsesickness virus serotype 4 (vaccine strain) RNA segment 5 and its predicted polypeptide compared with NS 1 of bluetongue virus. *J. Gen. Virol.*, 73, 2425-2428.
- Oellermann R.A., Els H.J., Erasmus B.J. (1970). Characterization of African horsesickness virus. *Arch. Gesamte Virusforsch*, 29, 163-174.
- Reed L.J., Muench H. (1938). Simple method of estimating 50 percent end points. *Am. J. Hyg.*, 27, 493.
- Rodriguez M., Hooghuis H. and Castano M. (1993). Current status of the diagnosis and control of African horsesickness. *Vet. Res.*, 24, 189-197.
- Roy P., Hirasawa T., Fernandez M., Blinov V.M., Sanchez-Vixcaino R. (1991). The complete sequence of the group-specific antigen, VP 7, of African horsesickness disease virus serotype 4 reveals a close relationship to bluetongue virus. *J. Gen. Virol.*, 72, 1237-1241.
- Sellner L.N., Coellen R.J. and Mackenzie J.S. (1992a). Reverse-transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucl. Acids Res.*, 20, 1487-1490.
- Sellner L.N., Coellen R.J. and Mackenzie J.S. (1992b). A one-tube, one manipulation RT-PCR reaction for detection of Ross River Virus. *J. Virol. Methods*, 40, 255-264.

Verwoerd D.W., Huismans H., Erasmus B.J. (1979). Orbiviruses. In : Comprehensive Virology, 14 (Fraenkel-Conrat H., Wagner R.R. eds) Plenum Press, New York, 285-345.

Wade-Evans A.M., Mertens P.P.C., Bostock C.J. (1990). Development of the polymerase chain reaction for the detection of bluetongue virus in tissue samples. J. Virol. Methods, 30, 15-24.

Zientara S., Sailleau C., Moulay S. and Crucière C. (1993). Diagnosis and molecular epidemiology of the African horsesickness virus by the polymerase chain reaction and restriction patterns. Vet. Res., in press.