

Développement d'un test moléculaire d'amplification isothermale (LAMP) pour la détection rapide du virus de la Myxomatose

A. TEILLAUD^{1,2}, G. CROVILLE^{1,2}, C. CAMUS-BOUCLAINVILLE^{1,2}, J.-L. GUERIN^{1,2}, S. BERTAGNOLI^{1,2}

¹ INRA, UMR 1225, F-31076 Toulouse, France

² Université de Toulouse ; INP-ENVT ; F-31076 Toulouse, France

Résumé : La myxomatose est une maladie majeure du lapin européen, due à l'infection par un poxvirus (virus myxomateux), dont deux formes cliniques ont été identifiées. Le diagnostic clinique pour les formes dites "amyxomateuses" est souvent délicat, et la confirmation par des tests diagnostiques de laboratoire est souvent réalisée. Dans ce cadre, nous avons mis au point un nouveau test de diagnostic moléculaire, rapide et économique, fondé sur la technique d'amplification isothermale appelée LAMP. Pour cela, le gène codant pour la protéine majeure d'enveloppe M071L a été sélectionné, et divers extraits d'ADN issus soit de virus cultivés (souches myxomateuses, de fibrome de Shope, d'autres poxvirus), soit d'échantillons biologiques ont été testés. Ce test s'est révélé efficace et de bonne sensibilité et spécificité analytiques.

Abstract : Development of a loop-mediated isothermal amplification test for rapid detection of Myxoma virus. Myxomatosis is a major disease of the European rabbit caused by the *Myxoma* virus, a member of the *Poxviridae* family. Two forms of the disease have been identified to date: the nodular (classical) form and the amyxomatous (respiratory) form. In practice, the clinical diagnosis of the amyxomatous form is clearly more difficult than for the classical one. Therefore, the submission of samples to laboratory diagnosis becomes more important. In order to have a faster and more economical diagnostic tool, a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test was developed. We decided to amplify the M071L gene, coding for the major protein of Intracellular Mature Virus form, and LAMP reactions were performed on viral DNA extracted from infected cells (different myxoma virus strains, Shope fibroma virus strains or other poxviruses), or biological samples. The method developed here showed its efficiency for detection of MYXV DNA, with good analytical sensitivity and specificity.

Introduction

La myxomatose est une maladie majeure du lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) due au virus myxomateux (MYXV), un membre de la famille des *Poxviridae*. Chez ses hôtes naturels (lapins américains du genre *Sylvilagus*), le MYXV n'induit qu'un fibrome bénin, la maladie généralisée ne se produisant que chez les jeunes. Chez le lapin européen, deux formes de la maladie ont été décrites : la forme nodulaire (ou classique) et la forme amyxomateuse (respiratoire) (Bertagnoli *et al*, 2006). Dans la plupart des cas, le taux de létalité varie de 20 % à 100 % selon le pouvoir pathogène de la souche virale (Kerr, 2012). Le diagnostic s'appuie classiquement sur l'observation des signes cliniques (symptômes et lésions), et le contexte épidémiologique. Néanmoins, ce diagnostic clinique peut être rendu difficile en raison de la discrétion des symptômes induits par des souches virales atténuées, et du moindre tropisme cutané des souches amyxomateuses (Bertagnoli, 2008).

Même si les différentes techniques traditionnelles disponibles (isolement viral, IDG, IFI) varient dans leur capacité à détecter le MYXV dans les lésions myxomateuses typiques, l'œdème palpébral ou des organes génitaux, dans tous les cas, l'agent causal peut aussi être identifié par la mise en évidence du génome du MYXV par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) simple ou quantitative (Albini *et al*, 2012). Malgré leurs qualités certaines, ces techniques moléculaires nécessitent de disposer du matériel

adéquat et présentent un coût global non négligeable. Une alternative possible est l'emploi d'un autre type de technique d'amplification génique nommée LAMP pour « loop-mediated isothermal amplification » (ou technique d'amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle). Développée en 2000 (Notomi *et al.*, 2000), la technique LAMP permet d'amplifier la séquence d'ADN cible avec une haute sensibilité et spécificité, le tout dans des conditions isothermales et en une heure environ. C'est une méthode alternative à la PCR dont il existe plusieurs déclinaisons (la LAMP classique, la LAMP en temps réel, la RT-LAMP ou encore la RT-LAMP en temps réel), qui reste simple, ne nécessitant pas de matériel sophistiqué, ni de personnel particulièrement qualifié (Parida *et al.*, 2008). Dans le but de proposer un nouveau test moléculaire de diagnostic de la myxomatose fiable et bon marché, nous avons ainsi réalisé une étude de faisabilité de la méthode LAMP, fondée sur l'amplification d'un gène structural majeur du MYXV, le gène *M071L*.

1. Matériel et méthodes

1.1 Cellules, virus et échantillons

Les cellules RK13 (lignée de rein de lapin) ont été utilisées pour cultiver les souches de MYXV, de virus de fibrome de Shope, et de virus de la vaccine : SG33 (souche MYXV vaccinale), Toulouse 1 (souche MYXV sauvagerie classique), LH (souche MYXV sauvagerie amyxomateuse), Boerlage et Kasza (souches vaccinales de virus de fibrome de Shope),

Copenhague (virus de la vaccine). Le virus vaccinal contre la variole aviaire est issu d'une préparation commerciale (Nobilis variole, MSD). La souche vaccinale KS-1 de capripoxvirus a été préparée sur cellules primaires de muscle de moutons. Les échantillons biologiques testés sont issus soit de lapins infectés expérimentalement (souche LH) (écouvillons oculaires), soit de prélèvements post-mortem de lapins présentant des signes cliniques évocateurs de myxomatose (fragments de paupières).

1.2 Extraction d'ADN et construction du plasmide standard

L'ADN total des cellules infectées, du vaccin commercial contre la variole aviaire, et des prélèvements cliniques (écouvillons et fragments de paupières) a été extrait et purifié grâce au kit « High Pure PCR Template Preparation kit » (Roche) suivant les instructions du fournisseur. Le plasmide standard a été construit par clonage, après réaction PCR, de la partie 3' du gène *M071L* (450 pb), codant pour la protéine majeure d'enveloppe de la forme IMV (Virus Mature Intracellulaire), grâce au kit « Strataclone PCR cloning kit » (Agilent). Les préparations plasmidiques ont ensuite été diluées en série.

1.3 Réactions de PCR simple et semi-nichée

Les ADN purifiés ont été testés par PCR simple (amorces tkS1, tkAS, 35 cycles, 94°C, 52°C, 72°C) et semi-nichée (amorces tkS2, tkAS, 35 cycles, 94°C, 50°C, 72°C) ciblant le gène Thymidine kinase du MYXV (tkS1 : ggt gtt gga taa gga agt tac g ; tkS2 : gag gtc gct gtc gga gac g ; tkAS : acc tea tta tag gac cca). Les amplicons obtenus ont été révélés en gel d'agarose.

1.4 Amorces et milieu réactionnel LAMP

Tableau 1 : Noms et séquences des amorces employées pour la réaction LAMP

LAMP primers	Sequences (5'-3')
F3_M071L	CAAAACCGTTGGTGTGTC
B3_M071L	CCGCCAAACATAGTAGTTGT
FIP_M071L	GCCCTCTTCTTTTACATCGGGAAT AtttCGTCTACGTTATTCCCCTAA
BIP_M071L	CGATTTGCCGAGGTTAGCGAtttA GTAAAAGGATACTTTTGTAGGATC
FLP_M071L	CCTCGAACGGATCACGTTTCAG
BLP_M071L	GACGCTAAGCGGGAGGTA

F3 et B3 : amorces externes ; FIP et BIP : amorces internes ; FLP et BLP : amorces « boucles »

Les six amorces nécessaires à la réaction LAMP complète ont été choisies grâce au programme « Primer explorer V3 » (primerexplorer.jp/e) à partir de la séquence connue du gène *M071L* (tableau 1). Ces amorces permettent théoriquement d'amplifier un fragment initial de 185 pb. Le milieu réactionnel de base est composé de la façon suivante : dNTP 1,4mM, betaine 0,8M, Thermopol reaction buffer

(BioLabs)1X, amorces FIP et BIP 1,6µM, amorces F3 et B3 0,2µM, amorces Loop F et Loop B 0,6µM, BST DNA Polymerase large fragment (BioLabs) 8U, eau mQ qsp 25µl. Dans le cas de révélation visuelle directe, certains réactifs peuvent être ajoutés au milieu réactionnel. Les réactions ont été réalisées dans un thermocycleur à 60°C pendant une heure, puis 80°C pendant 5 minutes (étape de terminaison facultative).

1.4 Révélation des produits d'amplification

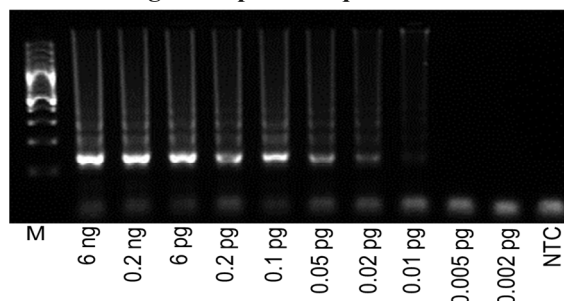
Les résultats d'amplification ont été révélés par migration des échantillons sur gel d'agarose 1,5 ou 2% (en présence de SYBER Safe 1X, Invitrogen), à 80 volts pendant 60min, et observation sur transilluminateur. Une visualisation directe des produits de la réaction LAMP a également été réalisée par ajout préalable dans le milieu réactionnel soit de calcéine 0,025mM et MnCl₂ 0,5mM, soit de HNB (Bleu d'hydroxynaphtol) 0,05mM.

2. Résultats

2.1 Sensibilité et spécificité analytiques de la réaction

Dans un premier temps, l'efficacité et la spécificité de la réaction LAMP fondée sur l'amplification d'une portion du gène codant la protéine d'enveloppe *M071L* du MYXV ont été évaluées. Pour cela une gamme d'un plasmide contenant la partie 3' du gène *M071L* (pSC-A-M071L) a été préparée et soumise à la réaction d'amplification LAMP-MYXV, dont les produits ont été révélés sur gel d'agarose (figure 1).

Figure 1 : Gel d'électrophorèse (agarose 2%) permettant de révéler les amplicons issus de l'ADN extrait de la gamme plasmidique.



M : marqueur de poids moléculaire (« GeneRuler 100pb plus », Fermentas) ; NTC : témoin négatif sans matrice ; autres pistes : quantités de plasmide par réaction.

Les signaux obtenus sont conformes à ceux classiquement observés lors de réactions par la méthode LAMP, de type « échelle » (une bande monomérique de faible taille, et des formations agrégées multimériques). Sur cette base, le seuil de détection a été défini aux alentours de 0,01-0,005 pg de plasmide pSC-A-M071L, soit environ 1000 à 2000 copies du gène cible. Pour compléter cette analyse, une gamme d'ADN extrait d'une production de MYXV (souche LH) préalablement titrée sur cellules RK13 a aussi été soumise au test LAMP-MYXV. Le signal d'amplification était encore bien détecté pour une quantité de virus correspondant au titre viral de 50 UFP (Unité Formant Plage)/ml. Nous avons pu en

déduire un seuil de détection compris entre 0,1 et 0,02 UFP par réaction. Pour vérifier la spécificité analytique de l'amplification LAMP-MYX, divers ADN issus de préparations virales variées ont été testés. Seuls les ADN provenant de lysats de cellules infectées par du virus myxomateux (types vaccinal SG33 ou sauvage Toulouse 1 et LH) ont pu être amplifiés. Aucune réaction croisée n'a été détectée, que ce soit avec un leporipoxvirus proche (virus du fibrome de Shope), ou avec un poxvirus d'un autre genre (virus de la variole aviaire, virus de la vaccine, capripoxvirus). Ceci souligne la grande spécificité de ce test diagnostique.

2.2 Evaluation sur échantillons de terrains

Divers échantillons biologiques issus soit d'infections expérimentales (écouvillons oculaires), soit de prélèvements post-mortem de lapins domestiques suspects de myxomatoses (fragments de paupières) ont été testés par PCR simple et semi-nichée, et par la technique LAMP (tableau 2). Les résultats obtenus concordent sauf pour l'échantillon 10-19, pour lequel le test PCR simple présente un défaut de sensibilité.

Tableau 2 : Comparaison des tests PCR simple, nichée, et LAMP-MYXV réalisés sur divers échantillons biologiques. Les amplicons ont été révélés par électrophorèse en gel d'agarose.

	LAMP	PCR	PCR semi-nichée
Ecouvillon 3 jours post-infection	-	-	-
Ecouvillon 13 jours post-infection	+	+	+
Paupière 06 01 10	+	+	+
Paupière 10-19	+	-	+
Paupière 10-20	+	+	+
Paupière 10-21	-	-	-
Paupière 11.1.328	-	-	-
Paupière 11.1.329	-	-	-
Paupière 38487	+	+	+
Paupière 4204	+	+	+

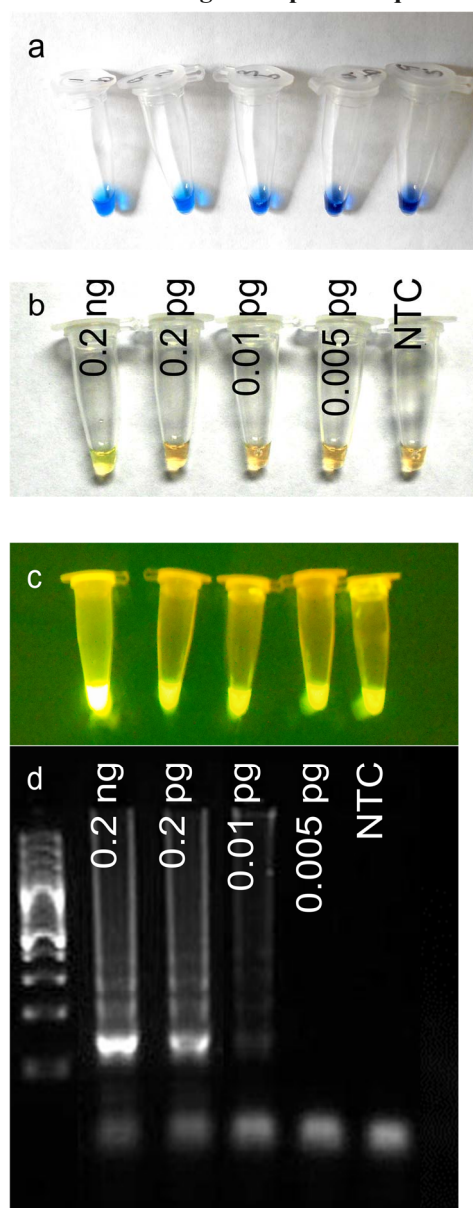
2.3 Evaluation des méthodes de révélation

Il est possible de révéler les produits réactionnels visuellement et directement sans migration sur gel d'agarose. Pour cela, nous avons testé deux méthodes : d'une part la coloration au bleu d'hydroxynaphtol, et d'autre part celle à la calcéine. Des dilutions du plasmide standard pSC-A-M071L ont ainsi été amplifiées, puis directement observées soit à la lumière du jour, soit à la lumière bleue d'un transilluminateur. Systématiquement, les amplifications ont aussi été vérifiées par électrophorèse en gel d'agarose (figure 2).

Nous avons pu détecter un changement de couleur pour les deux méthodes colorimétriques. Dans le cas de la coloration au bleu d'hydroxynaphtol, le témoin

négatif (NTC) reste violet, tandis qu'une couleur bleu ciel apparaît lors d'une réaction positive (figure 2, a). Lors de l'emploi de la calcéine, à la lumière du jour, le témoin négatif orange tranche sur une réaction positive de couleur jaune-vert (figure 2, b). Lors de l'exposition à la lumière bleue du transilluminateur, la fluorescence signale une réaction positive (figure 2, c). Néanmoins, dans notre cas, ces méthodes visuelles (i) ne permettent pas une différenciation aussi nette entre échantillons positifs et négatifs (cas du bleu d'hydroxynaphtol), (ii) présentent une moindre sensibilité analytique (cas de la calcéine avec un seuil de détection entre 0,2pg et 0,2ng) par rapport à révélation en gel d'électrophorèse (figure 2, d).

Figure 2 : Révélation comparée après réactions réalisées sur une gamme plasmidique.



En a : coloration au bleu d'hydroxynaphtol ; b : coloration à la calcéine à la lumière du jour ; c : coloration à la calcéine à la lumière bleue ; en d : gel d'électrophorèse (agarose 2%)

3. Discussion

Depuis la première description par Notomi et al (2000), la méthode LAMP a été très largement employée pour la détection d'agents bactériens, viraux et parasitaires dans un cadre diagnostique. Néanmoins, jusqu'ici, elle a été assez peu appliquée aux maladies poxvirales (seulement pour les poxviroses des ruminants, des camélidés et le monkeypox). Nous avons fondé le test LAMP-MYXV sur l'amplification de la partie 3' du gène M071L, codant pour une protéine majeure d'enveloppe du MYXV. Ce gène, spécifique des Leporipoxvirus, est très conservé entre souches de MYXV, et présente une identité de 85% avec son homologue du virus du fibrome de Shope (SFV), autre représentant du genre. Ainsi, la réaction LAMP-MYXV permet elle de détecter spécifiquement le génome du MYXV, aucune réaction croisée n'ayant été observée avec les autres poxvirus testés, ni d'ailleurs avec le SFV. La sensibilité analytique est inférieure à celle obtenue avec le test de PCR quantitative développé au laboratoire (au moins d'un facteur 5), mais supérieure à celle mesurée pour la PCR conventionnelle simple (d'au moins un facteur 10). Ceci peut être néanmoins suffisant pour une application diagnostique de terrain, le test LAMP-MYXV ayant permis de détecter du MYXV à partir de prélèvement de tissus post-mortem, ou d'écouvillons oculaires. Il est également envisageable d'amplifier du génome viral à partir d'un prélèvement réalisé sur papier FTA (résultats non montrés). Enfin, même si cela reste encore à perfectionner, il est possible de révéler visuellement la réaction d'amplification en ajoutant dans le milieu réactionnel des composés (HNB, calcéine) se complexant spécifiquement avec les ions magnésium produits.

Conclusion

La méthode LAMP fondée sur l'amplification d'une partie du gène *M071L* présente une bonne efficacité de détection de l'ADN du MYXV présent dans divers échantillons biologiques. La spécificité analytique est excellente et la sensibilité analytique, bien qu'inférieure à celle obtenue avec un test PCR quantitatif, est bonne (meilleure qu'avec un test PCR simple). Issu d'une technique simple et peu coûteuse, ce test LAMP-MYXV peut être une alternative économique et rapide aux méthodes diagnostiques de laboratoire traditionnelles de la myxomatose. La détection visuelle de l'amplification est plus aisée lors de l'emploi de la calcéine, même s'il semble que dans notre cas cela s'accompagne d'une diminution significative de sensibilité analytique (ce point restant à étudier et améliorer).

Références

- ALBINI S., SIGRIST B., GÜTTINGER R., SCHELLING C., HOOP R.K.VÖGTLIN A. 2012. Development and validation of a Myxoma virus real-time polymerase chain reaction assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 135-137
- BERTAGNOLI S. 2008. Myxomatosis, in *Manuel of diagnostic tests and vaccine for terrestrial animals*, Volume II, Sixth edition, OIE
- BERTAGNOLI S., MESSUD-PETIT F., MARLIER D. 2006. Myxomatosis, in *Recent advances in rabbit sciences*, Maertens L. and Coudert P. Editors. pp 139-146.
- KERR P.J. 2012. Myxomatosis in Australia and Europe: a model for emerging infectious diseases. *Antiviral Res.* 93(3):387-415.
- NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28 (12):E63.
- PARIDA M, SANNARANGAIAH S, DASH PK, RAO PV, MORITA K. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 18, 407-21.