

Master ICMV 1^{ère} année. TP UE S8

PRODUCTION ET SELECTION DE BACULOVIRUS RECOMBINANTS DANS DES CELLULES D'INSECTES EN CULTURE

Présentation générale : les baculovirus d'insectes, vecteurs d'expression de gènes étrangers

Les Baculovirus

Les Baculovirus constituent un groupe de virus très vaste. Ils sont présents uniquement chez les Arthropodes : ils ont été décrits chez plus de 600 espèces d'insectes ainsi que chez quelques crustacés. Ce sont des virus enveloppés en forme de bâtonnets, d'une longueur d'environ 350 nm et d'un diamètre moyen de 50 nm. Ils contiennent un génome constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire, circulaire, superenroulée dont la taille varie de 80 à 200 kpb. Un des baculovirus les plus étudiés aujourd'hui est celui qui a été originalement isolé des larves du papillon *Autographa californica*. Ce virus connu sous le sigle AcMNPV (pour *Autographa californica Multiple Nuclear Polyedrosis Virus*) se multiplie dans les noyaux des cellules de plus de 30 espèces différentes de lépidoptères.

Cycle de multiplication d'un baculovirus (voir Figure 1) :

Dans la nature les virus sont présents à l'intérieur de polyèdres, structures cristallines facilement observables en microscopie photonique, qui forment de véritables "corps d'inclusion". La matrice protéique de ces corps d'inclusion est constituée par la polyédrine qui est une protéine de 29 kDa codée par le génome viral. Le virus, protégé des facteurs de l'environnement par ce corps d'inclusion, est ainsi disséminé à la mort de l'insecte. Après ingestion par un autre insecte, les polyèdres sont dissous dans le suc intestinal, libérant les particules virales qui pourront pénétrer les cellules de l'épithélium intestinal par fusion membranaire ou endocytose. Après passage de l'épithélium intestinal, les virus infectent les tissus de l'hôte. Dans les cellules, la nucléocapside est amenée jusqu'au noyau où elle libère son ADN. La transcription des gènes viraux précoces peut alors commencer. La réplication de l'ADN commence environ 7 heures après l'infection et l'expression des gènes précoces est alors réprimée au bénéfice des gènes tardifs. Après environ 10 heures d'infection, des particules virales bourgeonnent à la surface des cellules. Plus tard, en fin d'infection, le gène codant la polyédrine est exprimé en très grande quantité grâce à la présence en amont d'un promoteur fort. La polyédrine est essentielle à la formation des corps d'inclusions permettant la dissémination des virus dans la nature. Cependant, en culture cellulaire *in vitro*, l'expression du gène de la polyédrine n'est pas indispensable pour obtenir un cycle de multiplication.

Utilisation des baculovirus comme vecteurs d'expression de gènes étrangers

Le principe de l'utilisation des baculovirus comme vecteurs de gènes étrangers consiste à remplacer la région du génome du baculovirus qui code pour la polyédrine par un gène qui code une protéine "étrangère" d'intérêt. Ainsi, un gène étranger cloné à la place de la polyédrine sera à son tour fortement exprimé.

La taille du génome du baculovirus ne permet pas le clonage direct du gène étranger. Ce clonage se fait par l'intermédiaire d'un plasmide de transfert (par exemple : pBlue Bac III) qui contient le promoteur de la polyédrine. Le plasmide de transfert recombinant et l'ADN du baculovirus sauvage linéarisé sont co-transfectés dans les cellules d'insecte. Le gène d'intérêt X et le gène *lacZ* sur le plasmide de transfert sont encadrés de séquences de recombinaison identiques à celles situées sur l'ADN du baculovirus sauvage. Il se produit alors une recombinaison homologue entre le plasmide recombinant et le génome du baculovirus ce qui permet la production de baculovirus recombinants (voir Figure2). Ainsi les cellules infectées par les baculovirus recombinants ne présentent plus de cristaux de polyédrine contrairement aux cellules infectées par les baculovirus sauvages. De plus, le gène *lacZ* étant transféré en même temps que le gène d'intérêt, il est possible de détecter les cellules infectées par le baculovirus recombinant : elles se colorent en bleu en présence de X-Gal. Il est alors possible de sélectionner les virus recombinants en prélevant les foyers des cellules colorées en bleu. Les baculovirus recombinants purifiés sont alors utilisés pour infecter des cellules afin de produire en grande quantité la protéine d'intérêt.

Un grand nombre de lignées de cellules d'insecte est aujourd'hui disponible pour étudier la multiplication des baculovirus et produire des protéines étrangères. Dans le cas du baculovirus d'*Autographa californica*, se sont essentiellement les cellules Sf21 (ou Sf9) qui proviennent de tissu ovarien de larves du lepidoptère *Spodoptera frugiperda*.

Avantages de l'utilisation des baculovirus

Les protéines exprimées dans les cellules d'insectes présentent, dans la grande majorité des cas, des activités biologiques semblables à celles des protéines natives : activité enzymatique, antigénicité, immunogénicité...

Les cellules d'insectes possèdent les équipements enzymatiques leur permettant d'effectuer les modifications post-traductionnelles semblables à celles des Vertébrés.

TRAVAUX PRATIQUES

Le but de ce TP est d'obtenir des baculovirus recombinants exprimant le gène étranger *Cap52*, qui code pour une protéine de capsid du papillomavirus de type 16. Nous réaliserons la transfection puis la sélection des baculovirus recombinants. D'autre part, les cellules Sf21 seront infectées par le baculovirus recombinant AcMNPV-*Cap52* déjà sélectionné afin de vérifier la production de la protéine recombinante *Cap52*.

La production en grande quantité de la protéine *Cap52* permettra peut-être de développer un vaccin anti-papillomavirus. Le papillomavirus est considéré comme étant un facteur de risque important dans le développement du cancer du col de l'utérus (voir article en Annexe).

Afin de contrôler toutes les étapes du système, les manipulations suivantes vont être réalisées :

- **Infection** de cellules Sf21 par un baculovirus AcMNPV sauvage produisant des inclusions de polyédrine
- **Cotransfection** des cellules Sf21 avec l'ADN d'AcMNPV sauvage et du vecteur de transfert pBlue Bac III-*Cap52*
- **Sélection** des baculovirus recombinants par la méthode de coloration au X-Gal et par PCR (polymerase chain reaction).
- **Production** de la protéine recombinante *Cap52* en cellules Sf21 par infection des cellules avec le baculovirus recombinant AcMNPV-*Cap52*

Organisation générale du TP

Première séance

- Repiquage des cellules Sf21
- Cotransfection de l'ADN AcMNPV et de l'ADN de pBlue Bac III-*Cap52*
- Infection des cellules par le baculovirus sauvage AcMNPV
- Infection des cellules par le baculovirus recombinant AcMNPV-*Cap52*

Deuxième séance

- Observation des cellules infectées
- Sélection des baculovirus recombinants (méthode de coloration au X-Gal)
- Sélection des baculovirus recombinants par dilutions limites

Troisième séance

- Suite de la sélection des baculovirus recombinants par la méthode de PCR
- Vérification de la présence de baculovirus recombinants

Quatrième séance

- Analyse des protéines produites en cellules d'insecte après infection par le baculovirus *AcMNPV-Cap52*

REALISATION PRATIQUE

PREMIERE SEANCE

1) Repiquage de cellules Sf21 dans une boîte de culture P6 à partir d'une boîte à confluence

Vous disposez d'une boîte de culture P6 :

- deux puits seront destinés à la cotransfection
- deux puits seront destinés à l'infection avec le baculovirus AcMNPV sauvage
- deux puits seront destinés à l'infection avec le baculovirus recombinant AcMNPV-Cap52
 - Mettre 2 ml de milieu de Grace dans chaque puit de la boîte P6.
 - Vous disposez d'une boîte de culture avec un tapis de cellules (12 ml) :
Enlever le milieu de culture (les cellules Sf21 restent attachées).
 - Mettre 13 ml de milieu de Grace dans la boîte de culture
 - Détacher les cellules Sf21 par pipettages successifs jusqu'à ce que toutes les cellules soient remises en suspension.
 - Mettre 1 ml de cette suspension cellulaire dans chaque puit de la boîte P6 pour une dilution finale des cellules au 1/3 (équivalent à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml).
 - Laisser adhérer les cellules pendant 30 mn dans une étuve à 27°C.
 - Observer les cellules Sf21 sous le microscope en phase inversée.

2) Cotransfection de l'ADN du baculovirus sauvage AcMNPV et du vecteur de transfert pBlue Bac III-Cap52

- Mettre dans un microtube : 1 μg d'ADN d'AcMNPV sauvage
3 μg d'ADN plasmidique pBlue Bac III-Cap52
- Ajouter 1 ml de tampon de transfection
- Enlever les 2 x 3 ml de milieu de Grace de 2 puits de la boîte P6
- Mettre 500 μl de la solution de transfection sur les cellules des deux puits
- Ajouter 500 μl de milieu de Grace
- Laisser incubé à 27°C pendant 1 à 2 heures
- Ajouter 2 ml de milieu de Grace
- Laisser incubé 7 jours à 27°C

3) Infection des cellules Sf21 avec les particules virales d'AcMNPV sauvages Infection des cellules Sf21 avec les particules d'AcMNPV-Cap52

- Dans 2 puits de la boîte P6 ajoutez 100 μl de particules virales d'AcMNPV sauvage
- Dans les 2 derniers puits de la boîte P6 ajoutez 100 μl de particules virales d'AcMNPV-Cap52
- Laisser incubé 7 jours à 27 °C

DEUXIEME SEANCE

1) Observation des boîtes P6 infectées au microscope

2) Sélection des particules virales recombinantes AcMNPV-Cap52

Préparation des cellules :

- Enlever le milieu des cellules Sf21 non infectées
- Reprendre les cellules par pipettages successifs dans 14 ml de milieu de Grace
- Répartir dans une plaque multipuits (P24) 500 μ l de cellules par puit (dans 24 puits)
- Laisser adhérer les cellules pendant 30 min à 27 °C

Récupération du surnageant de cotransfection :

- A l'aide d'une pipette, remettre en suspension les cellules infectées par pipettages successifs et les transférer dans un tube de 14 ml
- Centrifuger à 2000 rpm, à 4°C, pendant 10 minutes
- Transférer les surnageants dans de nouveaux tubes de 14 ml

Préparation de dilutions

- Réaliser des dilutions du surnageant de cotransfection, du surnageant du virus sauvage et du surnageant du virus recombinant (*cap52*) de 10^{-1} à 10^{-5} dans un volume de 500 μ l

Sélection (voir Figure 3) :

Première méthode : technique des dilutions limites (12 premiers puits)

- Une fois que les cellules ont adhéré, retirer 450 μ l du milieu de Grace
- Mettre 200 μ l de la dilution « 0 » du surnageant de cotransfection dans le premier puit, 200 μ l de la dilution 10^{-1} du surnageant de cotransfection dans le deuxième puit et ainsi jusqu'au puit numéro six.
- Comme contrôles :
 - Dans les puits 7 et 8 mettre respectivement 200 μ l d'une dilution « 0 » et 10^{-1} de surnageant contenant du baculovirus sauvage
 - Dans les puits 9,10, et 11 mettre respectivement 200 μ l d'une dilution « 0 », 10^{-1} et 10^{-2} de surnageant contenant du baculovirus recombinant (*cap52*)
 - Dans le puit 12 ne pas ajouter de surnageant contenant du virus. Ajouter 200 μ l de milieu de Grace
- Incuber à température ambiante pendant une heure
- Ajoutez 400 μ l de milieu de Grace contenant du X-Gal (50 mg/ml) de façon à avoir une solution à 240 μ g/ml.
- Laisser incuber 7 jours à 27°C

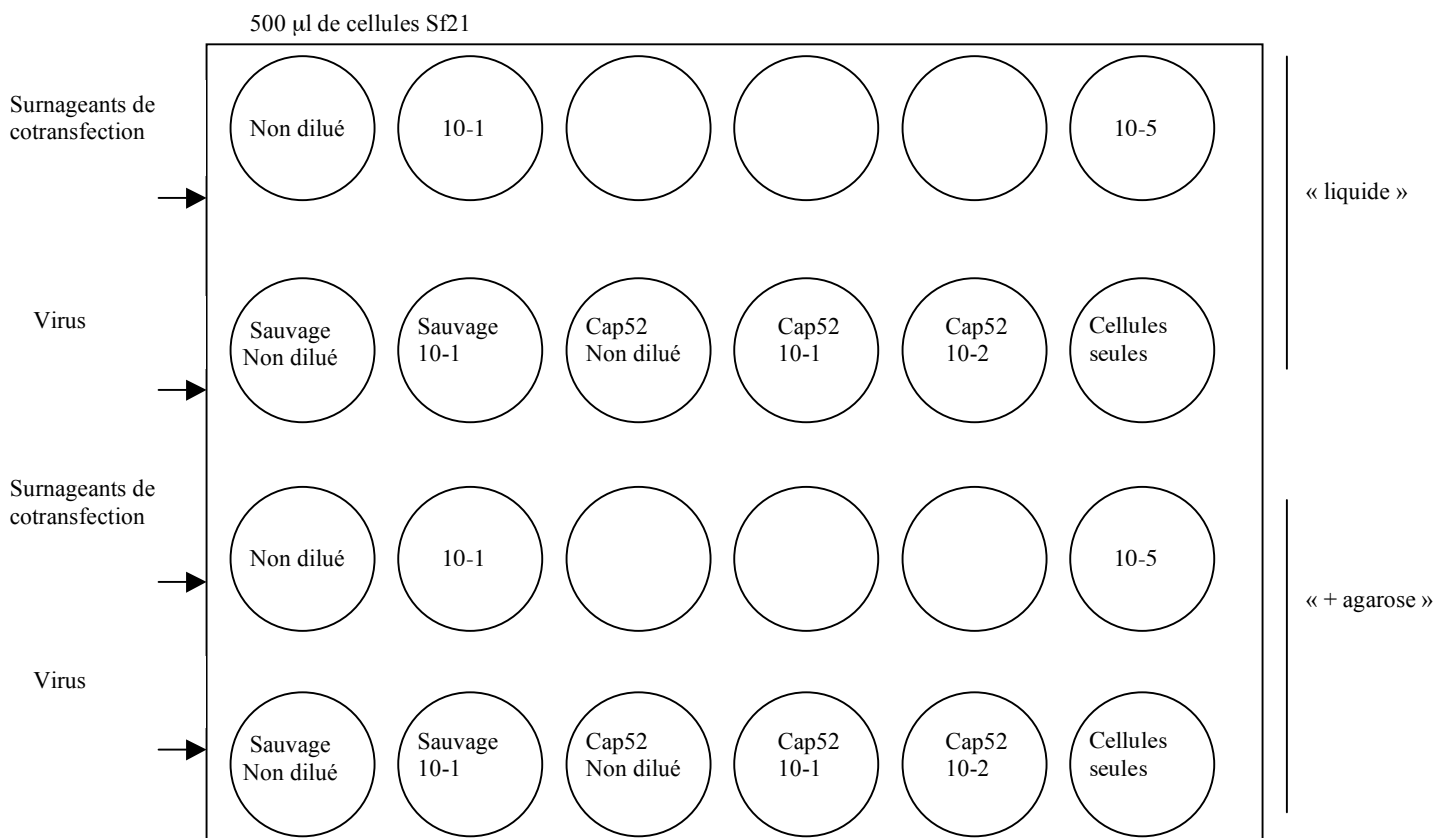
Deuxième méthode : technique utilisant l'agarose et l' X-Gal (12 derniers puits)

Infection des cellules :

- Une fois que les cellules ont adhéré, retirer 450 μ l du milieu de Grace
- Mettre 200 μ l de la dilution « 0 » du surnageant de cotransfection dans le puit 13, et 200 μ l de la dilution 10^{-1} du surnageant de cotransfection dans le puit 14 et ainsi jusqu'au puit numéro 18.
- Comme contrôles :
 - Dans les puits 19 et 20 mettre respectivement 200 μ l d'une dilution « 0 » et 10^{-1} de surnageant contenant du baculovirus sauvage
 - Dans les puits 21, 22 et 23 mettre respectivement 200 μ l d'une dilution « 0 », 10^{-1} et 10^{-2} de surnageant contenant du baculovirus recombinant (*cap52*)
 - Dans le puit 12 ne pas ajouter de surnageant contenant du virus. Ajouter 200 μ l de milieu de Grace
- Incuber à température ambiante pendant une heure

Préparation de l'agarose contenant le X-Gal :

- Chauffer de l'agarose 4% à 60°C puis ramener à 47°C
- Ajouter du milieu de Grace de façon à avoir une solution à 1 %
- Ajouter du X-Gal (50 mg/ml) de façon à avoir une solution à 240 $\mu\text{g/ml}$
- Maintenir à 47°C
- Enlever le surnageant d'infection et couler 1 ml d'agarose sur les cellules
- Placer la plaque multipuits dans une boîte humide à 27°C



3) Analyse des protéines produites dans les cellules infectées soit par le baculovirus sauvage, soit par le baculovirus AcMNPV-Cap52

Récupération des cellules infectées et du surnageant de culture :

- A l'aide d'une pipette, remettre en suspension les cellules infectées par pipettages successifs et les transférer dans un tube de 14 ml
- Centrifuger à 2000 rpm, à 4°C, pendant 10 minutes
- Transférer les surnageants dans de nouveaux tubes de 14 ml
- Placer le culot sur de la glace

Préparation des échantillons à déposer :

- Lysér le culot de cellules en ajoutant 100 µl d'une solution PBS-NP40 0,5 %
- Laisser incuber pendant 15 min dans la glace en mélangeant plusieurs fois
- Centrifuger pendant 15 min à 12000 rpm, à 4°C
- Enlever le surnageant
- Reprendre le culot dans 30 µl de PBS 1X
- Ajouter 10 µl de tampon de charge 4X
- Faire bouillir l'échantillon pendant 5 min afin de dénaturer les protéines
- Congeler les échantillons, ils seront analysés au cours de la quatrième séance

TROISIEME SEANCE

1) Vérification de l'obtention de particules virales recombinantes AcMNPV-Cap52 (méthode X-Gal)

- Observer les plaques multipuits contenant de l'agarose et du X-Gal

2) Vérification de l'obtention de particules virales recombinantes AcMNPV-Cap52 (méthode des dilutions limites et PCR)

Extraction d'ADN des particules virales :

- Observer les plaques multipuits contenant les dilutions limites
- Choisir un puit ne présentant pas de cellules contenant de la polyédrine
- Prélever 600 µl du surnageant de ce puit
- Prélever également 600 µl de surnageant d'infection par le baculovirus sauvage, 600 µl de surnageant d'infection par le baculovirus recombinant et 600 µl de surnageant de cellules non infectées
- Centrifuger à 2000 rpm pendant 10 min à 4°C, récupérer le surnageant
- Ajouter 600 µl d'une solution de NaCl 1 M PEG 10%
- Laisser 15 minutes à température ambiante
- Centrifuger à 15000 rpm pendant 10 min
- Remettre le culot en suspension dans 300 µl d'une solution contenant 1 mg/ml de protéinase K
- Incuber 1 heure à 55°C
- Extraire l'ADN par ajout de 300 µl de Phénol/Chloroforme
- Récupérer la phase aqueuse et précipiter l'ADN par ajout de 800 µl d'éthanol et 80 µl d'acétate de sodium 3M
- Centrifuger à 15000 rpm pendant 15 min à 4°C
- Laver le culot avec 100 µl d'éthanol 70 %
- Centrifuger à 15000 rpm pendant 10 min à 4°C
- Laisser sécher le culot et remettre en suspension dans 5 µl d'eau pure

Vérification de la présence de baculovirus recombinant par PCR :

- Réaliser 5 réactions de PCR avec les 4 ADN obtenus précédemment et avec de l'ADN du plasmide pBlue Bac III-Cap52 (contrôle positif).

- Pour une réaction PCR (volume de 50 µl):

ADN	5 µl	
amorce 1	2 µl	(10 à 50 pmole final)
amorce 2	2 µl	(10 à 50 pmole final)
dNTP (10 mM)	1 µl	(0,2 mM final)
Taq pol (5U/µl)	0,5 µl	(2 Unités final)
MgCl ₂ (25 mM)	6,25 µl	(3mM final)
Tampon 10X	5 µl	(1X final)
Eau pure	28,25 µl	

Les amorces choisies vont amplifier spécifiquement un fragment de 500 pb du gène *Cap52*

- Placer les tubes dans la machine PCR et programmer les cycles :

Dénaturation :	94 °C 1 min	1 cycle
Dénaturation :	94 °C 30 sec	
Hybridation :	56°C 1 min	30 cycles
Extension :	72°C 1min	
Extension finale :	72°C 5 min	1 cycle

QUATRIEME SEANCE

1) Vérification de l'obtention de particules virales recombinantes AcMNPV-Cap52 (méthode des dilutions limites et PCR)

- Préparation du gel d'agarose à 1 %
- Déposer ensuite 20 µl de chaque réaction PCR (troisième séance) sur un gel d'agarose à 1%
- (20 µl de la réaction PCR et 2 µl de tampon de charge 10X)

2) Analyse des protéines :

Préparation des gels d'acrylamide (2 gels par séance) : recettes pour un gel

1) Running gel (10%) :

Eau pure	4 ml
Acrylamide 30 % - Bisacrylamide 0,8 %	3,3 ml
1,5 M Tris-HCl pH8,8	2,5 ml
SDS 10 %	100 µl
APS 10 %	100 µl
Temed	4 µl

Couler le gel entre les deux plaques de l'appareil d'électrophorèse
Laisser polymériser pendant 30 minutes

2) Stacking gel (5%):

Eau pure	2,7 ml
Acrylamide 30 % - Bisacrylamide 0,8 %	0,67 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,5 ml
SDS 10 %	40 µl
APS 10 %	40 µl
Temed	4 µl

Couler le gel à la surface du " Running gel " polymérisé et laisser polymériser pendant 30 minutes

Dépôt des échantillons et migration :

- Déposer 30 µl d'échantillon sur le gel d'acrylamide 10 %
- Faire migrer environ 1 heure à 100 Volts

- Colorer le gel pendant 1 heure en solution de Blue de Coomassie
- Mettre le gel dans une solution d'acide acétique 10 % et laisser décolorer pendant la nuit

ANNEXE**Solutions utilisées**

Milieu de culture des cellules	Milieu de Grace 10% Sérum de veau fœtal
Tampon de transfection	25 mM Hepes pH 7,1 140 mM NaCl 125 mM CaCl ₂
PBS 1X (pH 7,3)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄
Bleu de Coomassie	0,25 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 A dissoudre dans 45 ml EtOH 100 % 45 ml H ₂ O 10 ml d'acide acétique glacial
Solution de décoloration	10 % acide acétique glacial 45 % EtOH 45 % H ₂ O
Tampon de charge des protéines (2X)	0,125 M TrisHCl pH 6,8 4 % SDS 20 % glycérol 10 % Bmercaptoethanol 0,01% Bleu de Bromophénol
Tris-HCl pH 8,8 4X	1,5 M Tris pH 8,8 avec HCl
Tris-HCl pH 6,8 4X	0,5 M Tris pH 6,8 avec HCl
Tampon d'électrophorèse de protéines (5X)	15,1 g Tris 72 g Glycine 5 g SDS pour 1 litre volume final