

Protocole d'extraction de l'ADNe et de l'ARNe de virus à partir d'échantillons d'eau de mer (EL et EAA)

Les prélèvements d'eau large (EL 1 litre) et d'eaux apports anthropiques (EAA 1 litre) arrivent congelés et sont stockés à -20°C avant analyses.

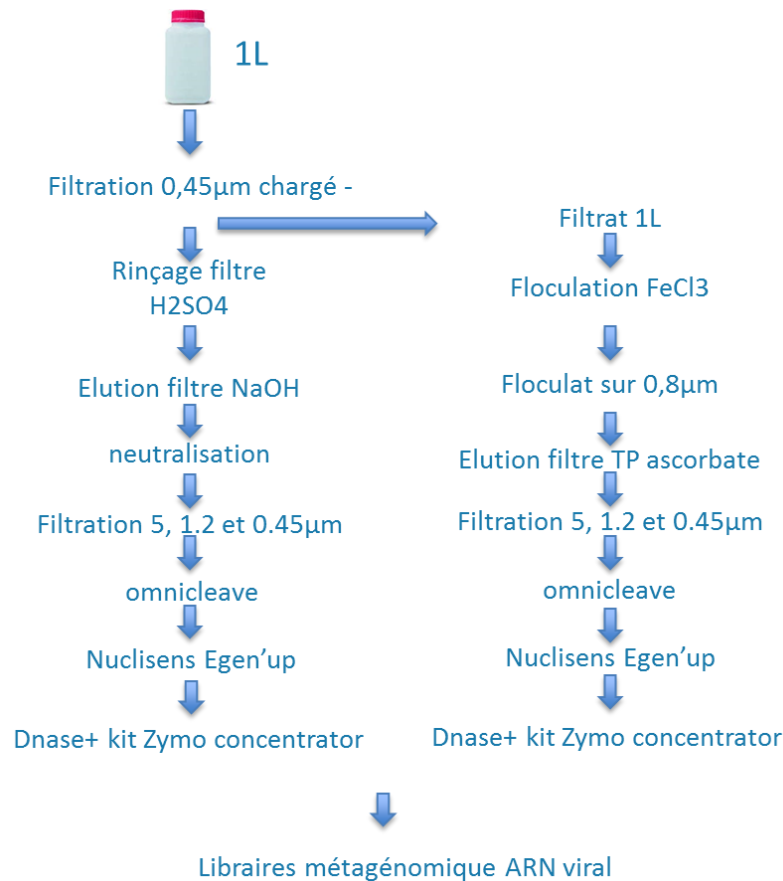
Kit Nuclisens (Biomérieux ref 200293)

Avant la filtration, chaque échantillon est décongelé dans un bain marie à 56°C pendant 30 min, puis stocké à 4°C jusqu'à la filtration.

- L'échantillon d'eau est filtré par aspiration à l'aide d'une pompe à vide, sur filtre de 0,45 µm MCE type HA (47mm). Le filtrat est conservé dans un flacon stérile à 4°C en vue de la floculation au chlorure de fer (FeCl). Le filtre est rincé sur le porte-filtre par le passage de 100 ml de H₂SO₄ 0.5 mM.
- Avec une pince stérile, le filtre de 0,45 µm MCE type HA est placé dans un tube de 50 ml, puis 2ml de NaOH 1mM et une bille céramique stérile sont ajoutés. L'élution se fait grâce à une agitation forte à 4°C pendant 30 min. L'éluat est neutralisé par l'ajout de 20µl de H₂SO₄ 50mM et 20µl de TE 100X, et conservé à 4°C avant l'extraction des acides nucléiques viraux.
- Pour la floculation, 200 µl de FeCl 10g/L sont ajoutés au filtrat obtenu lors de la première étape, et agité doucement pendant 2H à 12°C. Les floculats sont récupérés sur un filtre de 0,8µm (polycarbonate 47mm) placé sur une fiole à vide. L'élution se fait dans un tube de 50ml, sous agitation forte, avec 2ml de tampon ascorbate et 1 bille de céramique stérile. L'éluat est conservé à 4°C avant l'extraction des acides nucléiques viraux.

Afin d'éliminer les ADN et ARN libres (non encapsidés), 2 étapes sont ajoutées.

- En premier, les éluats obtenus après les 2 méthodes (filtration +floculation) sont filtrés sur un empilement de filtres de 5µm, 1,2µm et 0,45µm montés sur une seringue de 10mL. Puis 20µl d'endonucléase (Omnicleave, Lucigen ref OC7850K) ainsi que 200µl de MgCl₂ 100mM sont ajoutés. Après 1h d'incubation, 2ml de tampon de lyse (Nuclisens bio Mérieux) sont ajoutés.
- Après une incubation de 10 min, la silice magnétique (Nuclisens), permettant de capter les acides nucléiques présents, est ajoutée, puis incubée 10min. Les étapes de lavages sont réalisées grâce à l'Egen'up (Bio Mérieux). 100µl d'extrait d'acides nucléiques sont obtenus à la fin. Après un traitement DNASE (TurboDNASE, Invitrogen AM2238), l'extrait est purifié par un kit RNA Clean & Concentrator (Zymo ref R1015). Les extraits d'acide nucléique obtenus sont conservés à -80°C.



Publications de référence :

Desdouits, M., Piquet, J.-C., Wacrenier, C., Le Mennec, C., Parnaudeau, S., Jousse, S., Rocq, S., Bigault, L., Contrant, M., Garry, P., Chavanon, F., Gabellec, R., Lamort, L., Lebrun, L., Le Gall, P., Meteigner, C., Schmitt, A., Seugnet, J.L., Serais, O., Peltier, C., Bressolette-Bodin, C., Blanchard, Y., Le Guyader, F.S., 2021. Can shellfish be used to monitor SARS-CoV-2 in the coastal environment? *Sci. Total Environ.* 778, 146270. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146270>

Alberti, A., Poulain, J., Engelen, S., Labadie, K., Romac, S., Ferrera, I., Albini, G., Aury, J.-M., Belser, C., Bertrand, A., Cruaud, C., Da Silva, C., Dossat, C., Gavory, F., Gas, S., Guy, J., Haquelle, M., Jacoby, E., Jaillon, O., Lemainque, A., Pelletier, E., Samson, G., Wessner, M., Genoscope Technical Team, Acinas, S.G., Royo-Llonch, M., Cornejo-Castillo, F.M., Logares, R., Fernández-Gómez, B., Bowler, C., Cochrane, G., Amid, C., Hoopen, P.T., De Vargas, C., Grimsley, N., Desgranges, E., Kandels-Lewis, S., Ogata, H., Poulton, N., Sieracki, M.E., Stepanauskas, R., Sullivan, M.B., Brum, J.R., Duhaime, M.B., Poulos, B.T., Hurwitz, B.L., Tara Oceans Consortium Coordinators, Pesant, S., Karsenti, E., Wincker, P., 2017. Viral to metazoan marine plankton nucleotide sequences from the Tara Oceans expedition. *Sci. Data* 4, 170093.

John, S.G., Mendez, C.B., Deng, L., Poulos, B., Kauffman, A.K.M., Kern, S., Brum, J., Polz, M.F., Boyle, E.A., Sullivan, M.B., 2011. A simple and efficient method for concentration of ocean viruses by chemical flocculation. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 195–202. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00208.x>

Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S., 2002. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1033–1039. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1033-1039.2002>