

JPR

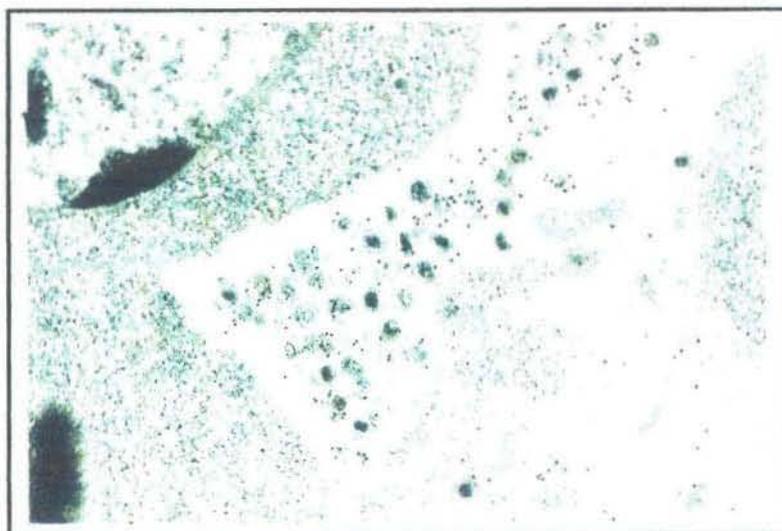
Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation
Décision d'Aide à la Recherche n° 95-07-01

RAPPORT INTERMEDIAIRE

Rédacteur : T. Renault

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMLADE

Février 1996



IFREMER

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales
B.P. 133 - 17390 La Tremblade

Tel : 46 36 98 36

Fax : 46 36 37 51



Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation
Décision d'Aide à la Recherche n° 95-07-01

RAPPORT INTERMEDIAIRE

Rédacteur : T. Renault

Février 1996

IFREMER

**Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales
B.P. 133 - 17390 La Tremblade**

Tel : 46 36 98 36

Fax : 46 36 37 51

Introduction

L'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales (Station IFREMER de La Tremblade) se propose dans le présent projet d'étudier le virus de type herpès observée chez les huîtres (pouvoir pathogène, conditions d'expression de l'infection, transmission, etc...) et de développer des réactifs permettant de réaliser un diagnostic rapide, sensible et fiable de l'infection qu'il occasionne. Les diagnostics proposés seront basés sur la détection directe du virus, soit au moyen de réactifs immunologiques spécifiques des antigènes viraux, soit par des techniques de biologie moléculaire permettant de détecter l'ADN viral (hybridation de sondes nucléiques et réaction PCR : Polymerase Chain Reaction).

Ce projet, proposé sur une durée de trois années (1995-1998), s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés, depuis 1992, au sein de l'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales.

L'avancée des travaux et tout particulièrement la mise au point d'un protocole de purification du virus au cours de l'été 1995, permet d'envisager à relativement court terme le développement d'outils de diagnostic spécifiques. Ces outils permettront d'étudier l'implication du virus de type herpès dans les phénomènes de mortalité observés chez les huîtres, de réaliser une étude épidémiologique précise (utilisation d'anticorps spécifiques et de sondes nucléiques en hybridation *in situ* et sur membrane) et de tenter de contrôler la maladie en détectant les animaux porteurs du virus en absence de mortalité par la technique de PCR. Cette dernière méthode est particulièrement intéressante, car elle pourrait permettre de sélectionner des animaux non porteurs du virus (contrôle des larves et du naissains avant commercialisation et contrôle des géniteurs ou des gamètes avant fécondation). De plus, l'obtention de virus purifié permet d'envisager de comparer cet agent à d'autres membres de la famille des *Herpesviridae*.

Rappels concernant les viroses décrites chez les mollusques bivalves marins

Parmi les maladies infectieuses des mollusques bivalves marins, les viroses sont souvent mal connues, en raison d'une certaine inadéquation des techniques d'identification et de diagnostic généralement mises en oeuvre lors de phénomènes de mortalité. En effet, la microscopie photonique a été et reste encore, dans de nombreux laboratoires travaillant sur les pathologies des mollusques, la technique de base pour l'analyse des échantillons. Cette technique reste insuffisante en cas de pathologie d'origine virale si elle n'est pas complétée par d'autres approches (microscopie électronique à transmission, recherche d'effets cytopathogènes sur cellules *in vitro*). Cependant, aucune lignée de mollusques bivalves n'est à l'heure actuelle disponible, et la recherche d'éventuels effets cytopathogènes dus à des virus de bivalves sur monocouches cellulaires en système homologue est donc impossible.

De fortes mortalités sporadiques sont observées en France depuis 1991 sur des larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et d'huître plate, *Ostrea edulis*, et ont été associées à la détection en microscopie électronique à transmission d'un virus de type herpès chez les animaux malades. De la même façon, des épisodes de mortalités anormales ont également été observés sur des naissains des deux espèces en association avec la présence de virus de type

herpès. L'émergence d'une telle pathologie virale chez l'espèce *Crassostrea gigas* est préoccupante dans la mesure où cette espèce est la plus importante pour la production conchylicole mondiale et nationale et qu'en France elle représente un quasi monoélevage.

Objectifs et programme

Objectifs : Etude de l'herpès virus de l'huître

Programme : la recherche consiste à évaluer les effets et le rôle du virus dans les mortalités estivales et à évaluer la relation de ce virus avec les virus répertoriés pathogènes pour l'homme.

Ce programme comprend divers travaux :

- Propagation et purification du virus.
- Tests de réactifs immunologiques hétérologues.
- Préparation d'anticorps spécifiques.
- Clonage de l'ADN viral.
- Fabrication de sondes pour le diagnostic de l'infection.

Actions de recherche menées en 1995 dans le cadre de l'infection à virus de type herpès observé chez les huîtres

A - PROPAGATION ET PURIFICATION DU VIRUS

A 1 - Propagation du virus sur larves

A 2 - Etude de la transmission de l'infection au naissain et à des animaux adultes

A 3 - Purification du virus

B - DIAGNOSTIC DE L'INFECTION VIRALE PAR REACTIFS IMMUNOLOGIQUES

B 1 - Tests de réactifs immunologiques hétérologues (spécifiques d'autres herpèsvirus)

B 2 - Préparation d'anticorps spécifique à partir de particules virales purifiées

C - DIAGNOSTIC DE L'INFECTION VIRALE AU MOYEN DE SONDÉS NUCLEIQUES ET PAR PCR

C 1 - Extraction de l'ADN viral et clonage de fragments du genome viral

C 2 - Analyses des clones obtenus

C 3 - Etablissement de techniques de diagnostic

A - Propagation et purification du virus

A 1 - Propagation du virus sur larves

A 1 1 - Reproduction de mortalités sur larves axéniques inoculées avec du broyat de larves virosées ultrafiltré et détection de particules virales en MET sur les larves expérimentalement infectées

Objectifs :

- ❖ Confirmation de la pathogénicité du virus sur larves axéniques
- ❖ Confirmation de la conservation du pouvoir pathogène du virus après congélation à - 20°C
- ❖ Possibilité de reproduire la maladie au laboratoire au moment désiré

A 1 2 - Reproduction de mortalités sur larves conventionnelles, élevées en grand volume, inoculées avec larves axéniques vivantes virosées expérimentalement et détection de particules virales en MET sur les larves conventionnelles expérimentalement infectées

Objectifs :

- ❖ Reproduction de la maladie sur larves conventionnelles et confirmation du pouvoir pathogène du virus
- ❖ Démonstration que la transmission horizontale de l'infection est possible
- ❖ Obtention de plus grandes quantités de larves virosées

A 2 - Etude de la transmission de la maladie au naissain et à des animaux adultes

A 2 1 - Essai de reproduction de mortalités sur adultes par inoculation intra-cardiaque de broyat de matériel virosé

Objectifs :

- ❖ Reproduction de la maladie sur adultes et démonstration du pouvoir pathogène du virus pour ce stade de développement
- ❖ Disposer d'animaux infectés de grande taille pour effectuer les purifications

A 2 2 - Essai de reproduction de mortalités sur naissain par balnéation en présence de broyat de matériel virosé

Objectifs :

- ❖ Reproduction de la maladie sur le stade naissain et démonstration du pouvoir pathogène du virus pour ce stade de développement (démonstration que le virus de type herpès est bien l'agent responsable des mortalités observées sur le naissain)
- ❖ Disposer d'animaux infectés d'assez grande taille pour effectuer les purifications

A 3 - Purification du virus

Objectifs :

- ❖ Obtenir du matériel virosé en quantité suffisante afin de préparer des réactifs de diagnostic spécifiques, sensibles et fiables

Difficultés:

- ❖ Nécessité de travailler sur du matériel virosé frais (approvisionnement?) et donc de planifier les expériences
- ❖ Impossibilité de multiplier le virus sur cultures cellulaires homologues

B - Diagnostic de l'infection virale par réactifs immunologiques

B 1 - Tests de réactifs immunologiques hétérologues (spécifiques d'autres herpesvirus)

Objectifs :

- ❖ En l'absence de réactifs spécifiques et de la difficulté à purifier le virus jusqu'alors, utiliser des réactifs existants, spécifiques d'autres virus pour le diagnostic sur la base d'éventuelles réactions croisées

B 2 - Obtention de réactifs immunologiques spécifiques (anticorps polyclonaux et monoclonaux)

Objectifs :

- ❖ Développer des réactifs spécifiques par immunisation d'animaux de laboratoire avec des particules virales purifiées

C - Diagnostic de l'infection virale au moyen de sondes nucléiques et par PCR

C 1 - Extraction de l'ADN viral et clonage en plasmide

Objectifs :

- ❖ Extraire l'ADN à partir des particules virales purifiées de façon à pouvoir le cliver ensuite par des enzymes de restriction et intégrer les fragments obtenus en plasmides (multiplication des fragments après intégration)

C 2 - Analyses des clones

Objectifs :

- ❖ Contrôle de la spécificité des clones obtenus par hybridation sur membrane

C 3 - Etablissement de technique de diagnostic spécifiques : en cours

Principaux résultats 1995

Les travaux concernant le virus de type herpès, observé chez les huîtres, ont été poursuivis en 1995 et ont été couronnés de succès. En effet, les efforts concertés de l'ensemble du personnel de l'URPPIG, en 1995, ont permis d'aboutir à **la mise au point d'un protocole de purification du virus**, malgré l'ensemble des difficultés rencontrées (impossibilité de reproduire le virus sur lignées cellulaires, dépendance vis à vis des professionnels pour l'approvisionnement en matériel infecté et difficulté de planifier les expériences de ce fait).

Purification

Il a été possible de purifier à plusieurs reprises des particules virales à partir de larves virosées fraîches (Figure 1).

Cependant, le même protocole (Figure 2) testé sur des lots de naissains présentant des mortalités anormales n'a pas permis d'aboutir à un résultat probant. Il a, en effet, été possible d'observer quelques particules virales pour certains lots. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que certains des essais ont été réalisés à partir d'animaux pour lesquels il n'y avait pas d'infection, mais seulement des mortalités non liées à la présence du virus (confirmation *a posteriori* de l'absence de suspicion d'infection virale par les analyses histologiques) Une autre hypothèse à retenir est un effet de dilution des virions par le biais de la quantité de tissus utilisée pour la purification dans ce cas.

Par ailleurs, les essais effectués à partir de larves ou de naissains virosés conservés congelés à -20°C, ont été infructueux.

Extraction de l'ADN viral et clonage

Les quantités de virus purifiés ainsi obtenues ont permis d'entreprendre divers travaux :

- De réaliser l'extraction de l'ADN viral et d'effectuer une première caractérisation de ce matériel par digestion avec des enzymes de restriction et électrophorèse en gel d'agarose. Il a été ainsi possible de démontrer que les particules virales purifiées contiennent un acide nucléique de type ADN, double brin. Cet ADN a une taille d'environ 180 Kpb (Figure 3). Ce résultat étaye l'hypothèse de l'appartenance de ce virus à la famille des *Herpesviridae*, virus à ADN double brin dont la taille du genome varie de 120 à 220 Kpb.

- De cloner des fragments de l'ADN extrait des particules virales purifiées, après digestion par l'enzyme EcoRI. Le clonage a été réalisé en plasmide Bluescript II KS (-). Le choix d'un clonage en plasmide et non en phage a été dicté par des raisons pratiques. En effet, ce type de clonage permet d'obtenir relativement rapidement des sondes nucléiques adéquates pour réaliser des outils spécifique de diagnostic.

Les plasmides recombinants ont été produits en bactéries *E. coli* XL1 Blue, ils sont au nombre de 300 environ. Quatre de ces fragments clonés ont été choisis en fonction de leur longueur différente, afin de vérifier leur spécificité. Les premiers essais d'hybridation sur membrane ont donné des résultats très positifs. En effet, les quatre fragments testés donnent un marquage net sur les ADN extraits de larves et de naissains virosés et pas de marquage sur de l'ADN extrait d'huîtres creuses adultes saines.

Séquençage et dessin d'amorces pour la PCR

Suite à ces résultats, le séquençage de ces quatre fragments clonés a été entrepris en collaboration avec C. Delsert (IFREMER - Sète), afin de pouvoir définir des zones propices à la construction de couples d'amorces pour la PCR. Nous disposons à l'heure actuelle d'amorces qui nous permettent d'obtenir une amplification claire sur ADN viral purifié, sur ADN extraits de larves virosées, sur broyats de larves et de naissains infectés et une absence d'amplification sur ADN d'huîtres adultes saines (Figures 4 et 5).

Obtention d'anticorps spécifiques du virus

Trois souris BalbC ont été immunisées avec du virus purifié. Les sérums et les ascites (contenant des anticorps spécifiques) ont été récupérés après sacrifice des animaux. L'une des ascites montre une réactivité claire sur coupes histologiques de tissus d'huîtres infectées (Figure 6).

Tests d'anticorps hétérologues

Il a été possible de mettre en évidence une communauté antigénique possible (Figure 7) avec l'herpèsvirus du poisson chat (intérêt phylogénique), mais une absence de réaction croisée avec les autres réactifs testés (anticorps dirigés contre le Cytomégalo virus humain, les herpes simplex 1 et 2 humains et un herpès de salmonicidé). Les réactifs spécifiques de l'herpès virus de poisson chat ne sont cependant pas utilisables à des fins diagnostiques, car ils doivent être utilisés très concentrés pour donner une réaction positive (impossibilité d'utiliser ces réactifs pour un diagnostic de routine de l'infection à virus de type herpès observée chez les huîtres). Cependant, ces réactifs permettent d'étudier l'herpèsvirus des huîtres d'un point de vue phylogénique.

Essais de reproduction de l'infection virale

Divers essais ont été menés au cours de l'année 1995, afin de reproduire la maladie au laboratoire.

Il a été ainsi possible de reproduire comme les années précédentes, l'infection chez des larves axéniques par inoculation dans les ballons d'élevage de broyats de larves virosées. Ce résultat est intéressant dans la mesure où il montre qu'il est possible, grâce à la congélation de matériel virosé, de reproduire la maladie à tout moment. De plus, il a été possible d'infecter expérimentalement des larves conventionnelles, en inoculant dans les bacs d'élevage des larves axéniques virosées expérimentalement. Ce type d'infection permet d'obtenir de plus grandes quantités d'animaux virosés. En effet, cette approche a été développée dans le but de disposer de quantités de matériel biologique suffisantes pour entreprendre des essais de purification.

Quelques essais ont été également réalisés sur naissains et adultes. Dans ce cas, aucune mortalité n'a été observée chez les animaux ayant subi les essais. Dans ce cadre, il est nécessaire de poursuivre les travaux en entreprenant de nouvelles expériences.

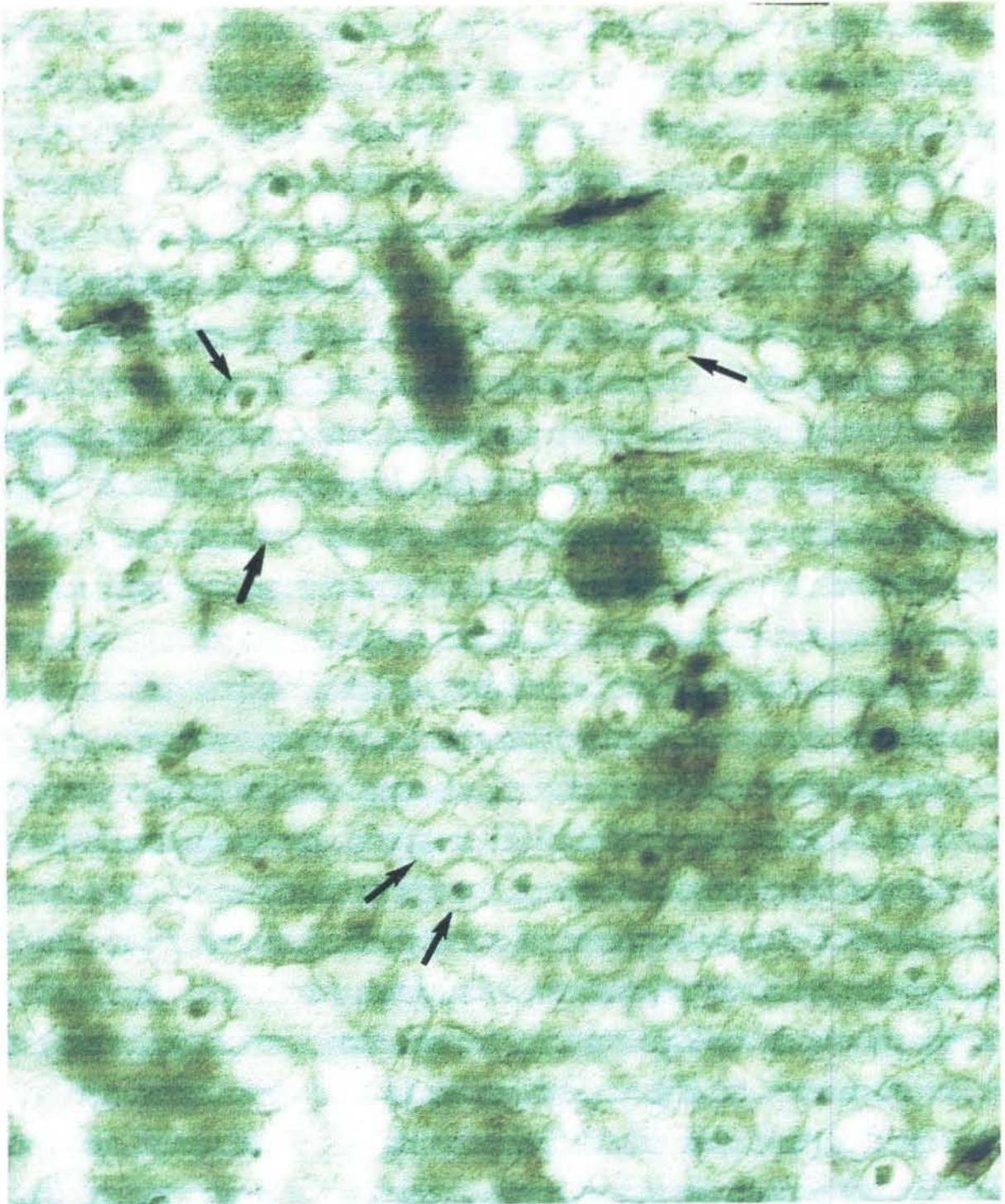
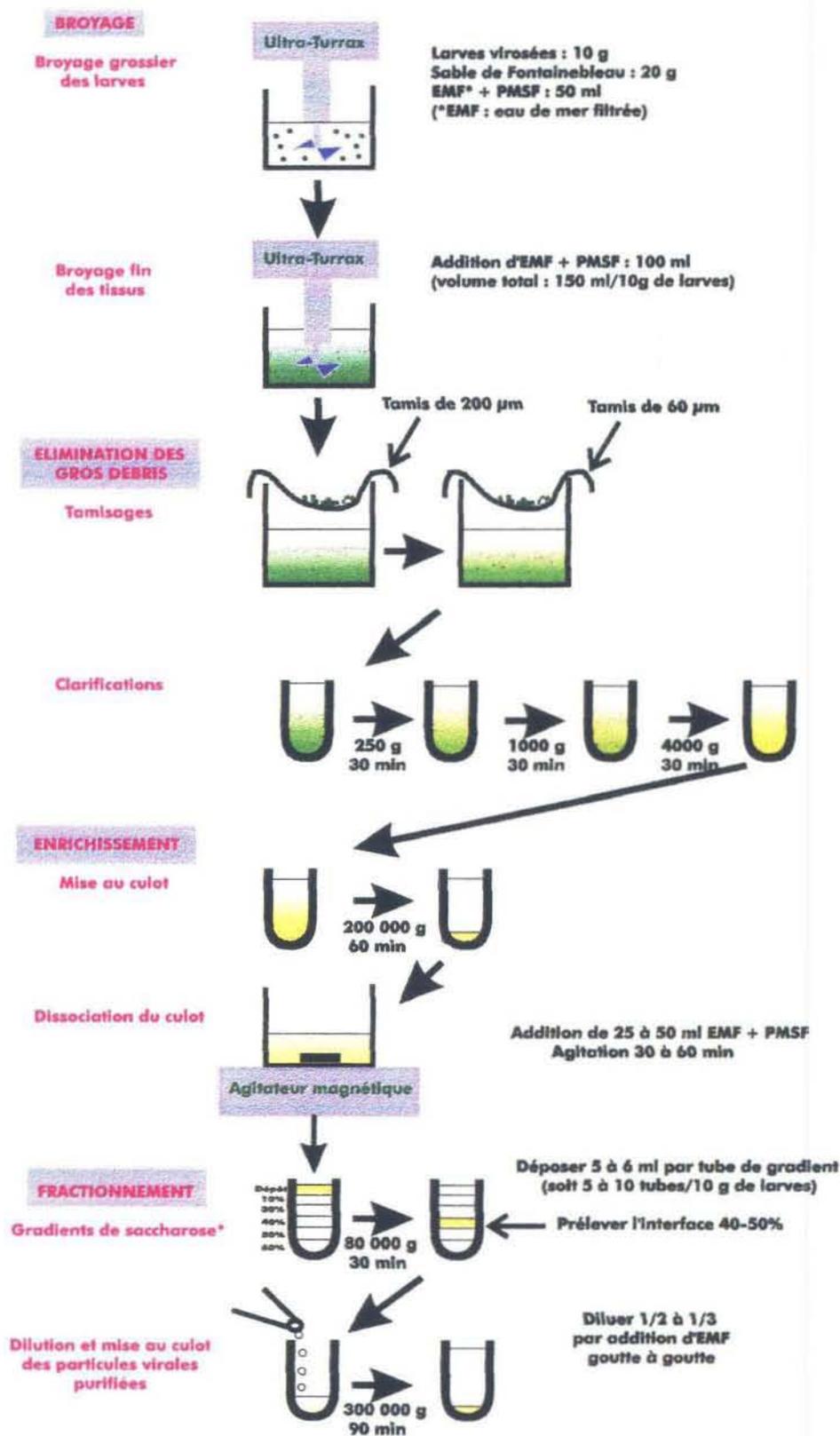


Figure 1 : Particules virales purifiées à partir de larves virosées d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Cliché de microscopie électronique à transmission.

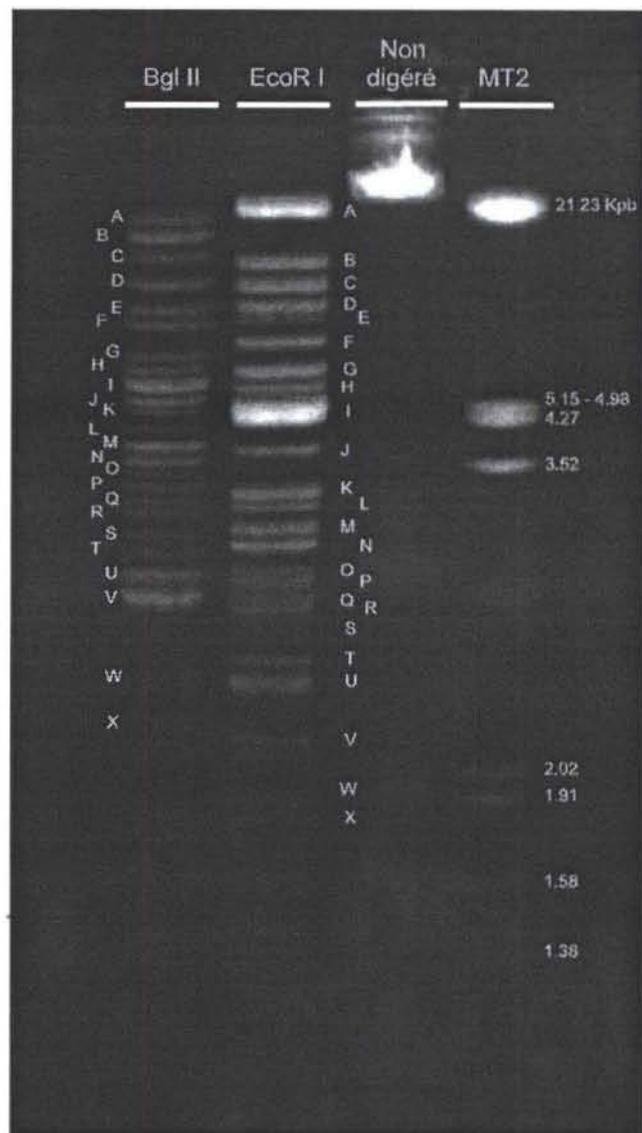
Figure 2 : Protocole de purification du virus de type herpès observé chez les huîtres.



* Préparation des solutions de saccharose :
60% : 60 g de saccharose + 40 ml EMF
50% : 50 g saccharose + 50 ml EMF
etc...

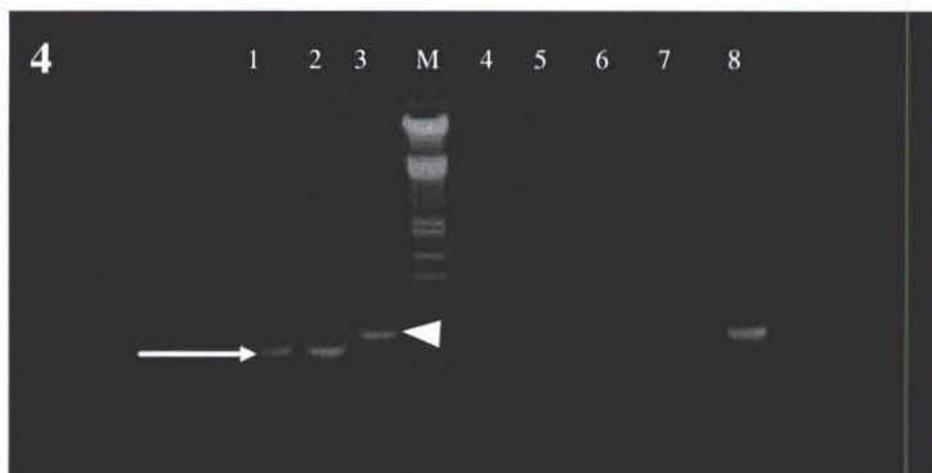
Figure 3 : ADN extrait de particules virales purifiées - Analyse en gel d'agarose.

Bgl II, EcoR I : Profils électrophorétiques obtenus après digestion de l'ADN viral respectivement par les enzymes de restriction EcoR I et Bgl II. Non digéré : Profil électrophorétique de l'ADN viral non digéré. MT2 : Marqueur de taille MT2, Eurogentech.



Figures 4 et 5 : Analyses d'échantillons en PCR.

M : Marqueur de taille 2, Eurogentech. Flèche : Fragment amplifié après la première PCR. Tête de flèche : Fragment amplifié après la deuxième PCR. 4 à 7 : Echantillons de larves saines. 8 : Echantillons de larves virosées.



M : Marqueur de taille 2, Eurogentech. 1, 2, 3, 4 et 12 : Echantillons sains. 5 à 11 : Echantillons virosés.



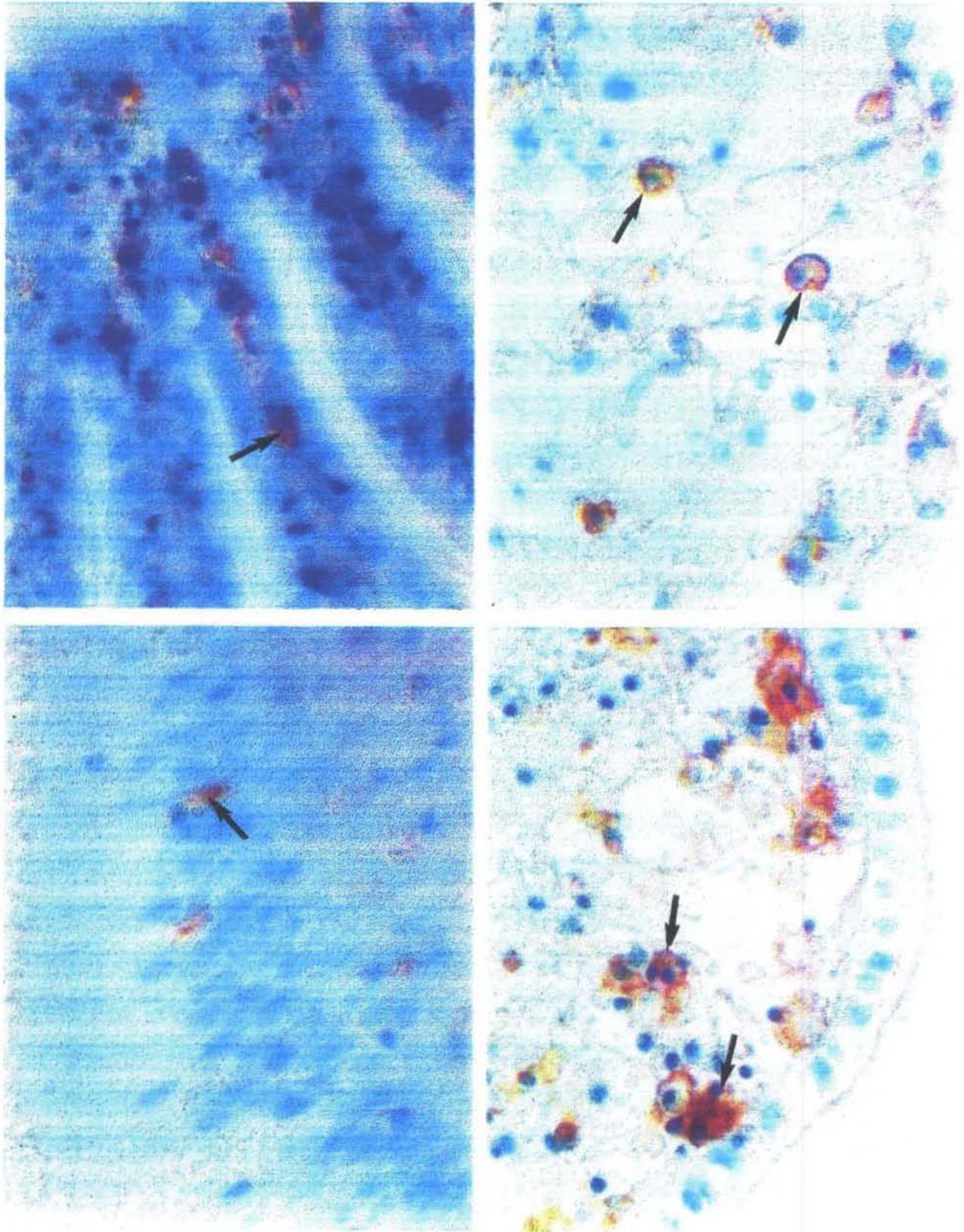


Figure 6 : Immunomarquages (immunoperoxidase) sur coupes paraffine d'animaux infectés.

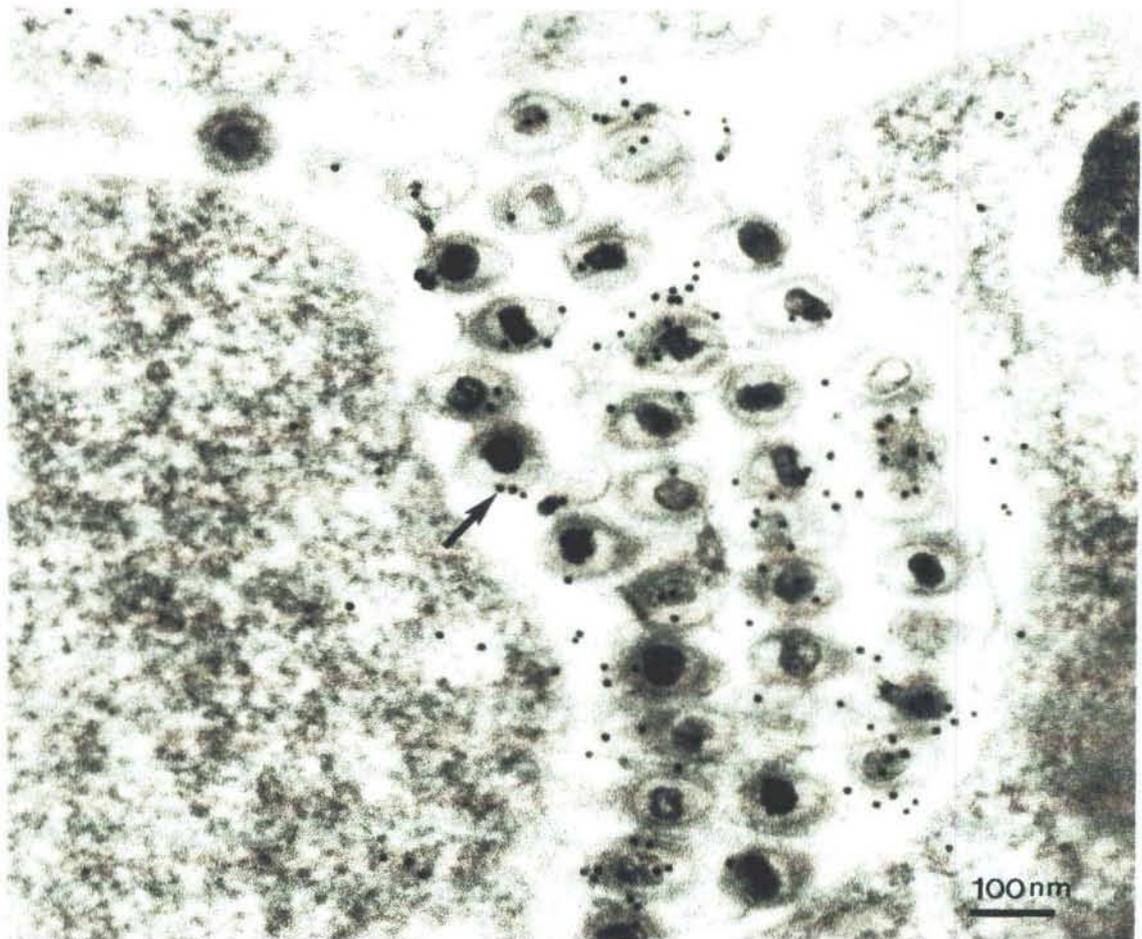


Figure 7 : Marquages obtenus sur tissu de larves d'huître creuse (*Crassostrea gigas*) virosées au moyen d'un anticorps monoclonal spécifique de l'herpèsvirus du poisson chat. Cliché de microscopie électronique à transmission et technique de marquage à l'or colloïdal.

Publications virus de type herpès - 1995

Reuves à comité de lecture

- Le Deuff R.M., Renault T. and Cochenec N.**, 1995. Antibodies specific for channel catfish virus cross-react with Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, herpes-like virus. *Vet. Res.*, 26 : 526-529.
- Le Deuff R.M., Renault T. and Gérard A.**, 1996. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. aquat. Org.*, 24 : 149-157.
- Renault T., Flaujac G. and R.M. Le Deuff**, 1995. Isolation and culture of heart cells from the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Meth. Cell Sci.*, 17 : 199-205.
- Renault T., Le Deuff R.M., Cochenec N., Chollet B. and Maffart P.**, 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* : a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res.*, 26 : 53

Communications Colloques

- Le Deuff R. M., Renault T., Cochenec N., Chollet B. et Maffart P.**, 1995. Virus apparentés aux Herpes, associés à des mortalités de larves et de naissains d'huître japonaise, *Crassostrea gigas* : étude comparative et reproductin expérimentale de la maladie sur des larves de *C. gigas* axéniques. Séminaire franco-canadien sur les maladies et les problèmes environnementaux liés à l'aquaculture des mollusques, Arcachon, France, 12 et 13 septembre 1995.

Posters

- Le Deuff R.M., Renault T. and Cochenec N.**, 1995. Antibodies specific for channel catfish virus cross-reactive with Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, herpes-like virus. INRA, Third International Symposium on viruses of Lower Vertebrates, Jouy en Josas, 14-17mars 1995.
- Renault T., Le Deuff R.M., Cochenec N., Chollet B. and Maffart P.**, 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* : comparative study, thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of disease in axenic larvae. INRA, Third International Symposium on viruses of Lower Vertebrates, Jouy en Josas, 14-17 mars 1995.

Thèse

Le Deuff R.M., 1995. Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux *Iridoviridae* et aux *Herpesviridae*. Thèse pour le Doctorat de l'Université de Bordeaux II, U.F.R. de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Mention Sciences Biologiques et Médicales, Option Biologie-Santé, Thèse N° 389 : 1-235.

Destinataires :

S. MICHAUX IFREMER Nantes DA/FI 1 (2)

Y. HARACHE DRV/RA/D

J.P. FLASCH IFREMER La Tremblade

A. GERARD IFREMER La Tremblade

H. GRIZEL IFREMER Palavas

J. MAZURIE IFREMER La Trinité