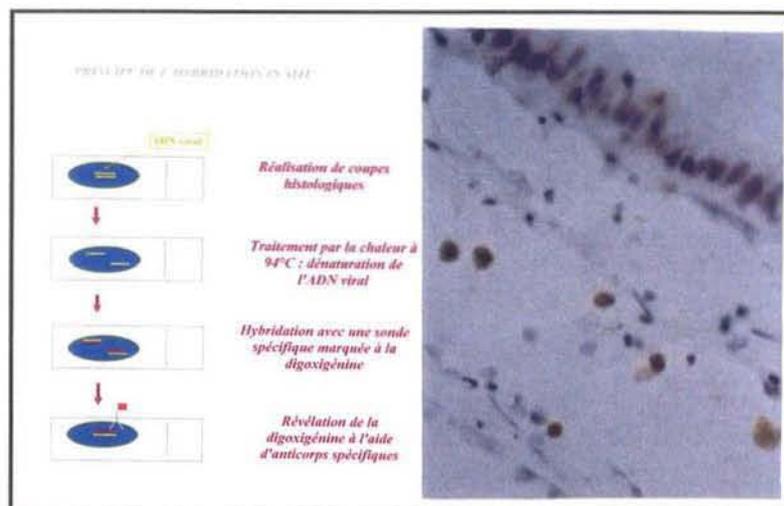


Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation
Décision d'Aide à la Recherche n° 95-07-01

RAPPORT INTERMEDIAIRE

Rédacteur : T. Renault

Février 1998



IFREMER

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie

B.P. 133 - 17390 La Tremblade

Tel : 05 46 36 98 36

Fax : 05 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 1998

IFREMER

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie

B.P. 133 - 17390 La Tremblade

Tel : 05 46 36 98 36

Fax : 05 46 36 37 51

Note liminaire

Le Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie (GAP) de la 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 outils de diagnostic développés sont 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). 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'équipe de Pathologie du GAP.

Les travaux concernant la mise au point d'un protocole d'hybridation *in situ* pour détecter le virus de type herpès sur coupes histologiques ainsi que des essais réalisés pour tenter de mettre au point un protocole reproductible d'induction de l'infection virale au stade naissant chez les huîtres sont rapportés dans ce document.

Objectifs et programme

Objectifs : Etude du virus de type herpès infectant les huîtres

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.

1. - Mise au point d'un protocole d'hybridation *in situ* pour la détection du virus de type herpès sur coupes histologiques de tissus d'huître

La collaboration, entamée en 1996 avec le Dr. A. Davison du Medical Research Council de Glasgow (Ecosse), a permis d'aboutir à l'obtention d'informations sur la séquence de fragments clonés d'ADN de virus de type herpès infectant les huîtres. Parmi les fragments séquencés, le fragment le plus long (1089 paires de bases) a été retenu pour construire de nouvelles amorces pour la PCR. Le fragment cloné retenu a été sélectionné sur la base de son absence d'homologie flagrante avec les séquences existantes dans les banques de données. Trois couples d'amorces ont été définis en utilisant un site sur le Web (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>), à partir de la séquence fournie par A. Davison : OHV1/OVH2 (taille du fragment attendu 765 pb), OHV3/OVH4 (taille du fragment attendu 896 pb) et OHV5/OVH6 (taille du fragment attendu 780 pb).

Le couple OHV3/OHV4 a été retenu pour préparer une sonde nucléique marquée à la digoxigénine dans la mesure où la bande détectée sur gel d'agarose pour 2500 génomes viraux était plus nettement lisible que pour les amorces OHV1/OHV2 et OHV5/OHV6 ainsi que pour les amorces A3/A4 et A5/A6 en nested PCR.

1. 1. - Obtention d'une sonde nucléique marquée à la digoxigénine par PCR

Une sonde marquée à la digoxigénine a été produite en utilisant des nucléotides particuliers (dUTP digoxigénine) dans une réaction de PCR utilisant les amorces OHV3/OHV4. 10^4 génomes viraux sont utilisés par tube de réaction.

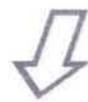
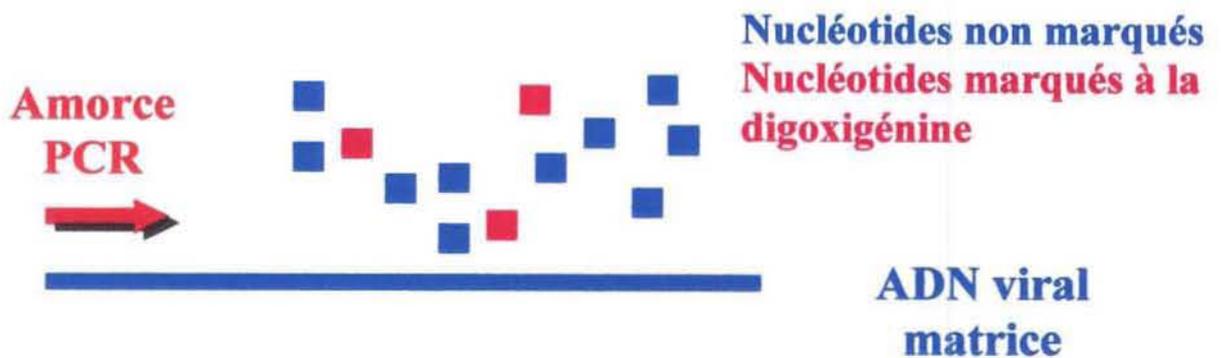
1. 2. - Test de spécificité en Southern blotting

La sonde ainsi obtenue a été testée en Southern blotting (transfert des ADNs sur membrane de Nylon) sur le fragment amplifié non marqué et produit en PCR à partir d'ADN viral extrait de particules purifiées et sur les fragments amplifiés à partir d'échantillons de larves infectées. Il est ainsi possible d'observer un marquage spécifique.

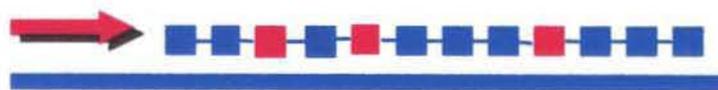
1. 3. - Mise au point d'un protocole d'hybridation *in situ*

La sonde marquée à la digoxigénine, préparée par PCR avec les amorces OHV3/OHV4, a été testée en utilisant un protocole d'hybridation *in situ*, mis au point au laboratoire de La Tremblade. Il est ainsi possible d'observer un marquage nucléaire et cytoplasmique de certaines cellules sur coupes histologiques d'animaux (naissain) infectés (contrôlés en microscopie électronique à transmission) : cellules des tissus conjonctifs du manteau, des palpes labiaux et de la glande digestive (figures 1 et 2). Ce sont ces cellules dans lesquelles les particules virales sont détectées en microscopie électronique à transmission.

*PRINCIPE DE PRODUCTION D'UNE SOND
MARQUEE A LA DIGOXIGENINE PAR PCR*

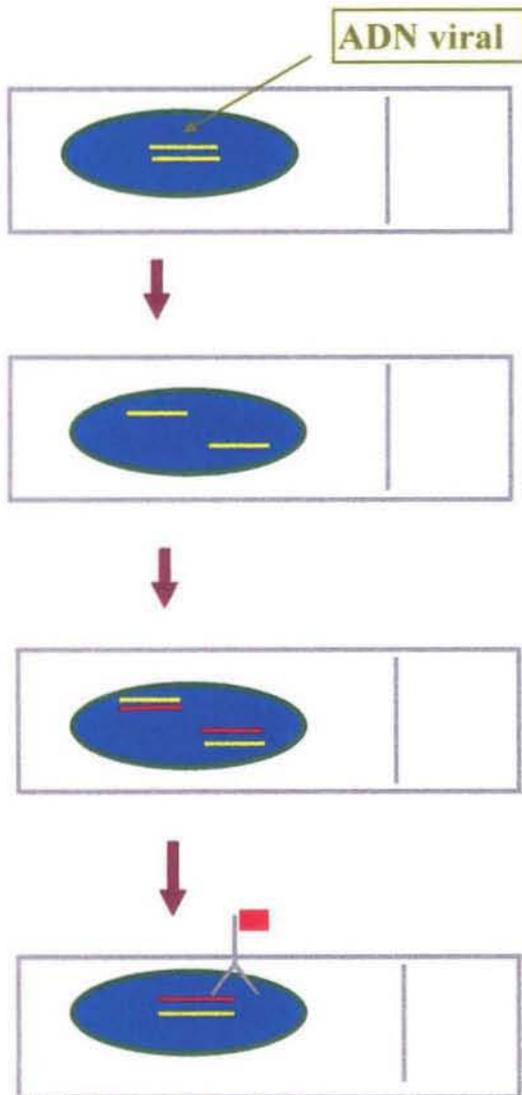


Action de l'ADN polymérase



Obtention d'une sonde nucléique spécifique marquée à la digoxigénine

PRINCIPE DE L'HYBRIDATION IN SITU



Réalisation de coupes histologiques

Traitement par la chaleur à 94°C : dénaturation de l'ADN viral

Hybridation avec une sonde spécifique marquée à la digoxigénine

Révélation de la digoxigénine à l'aide d'anticorps spécifiques

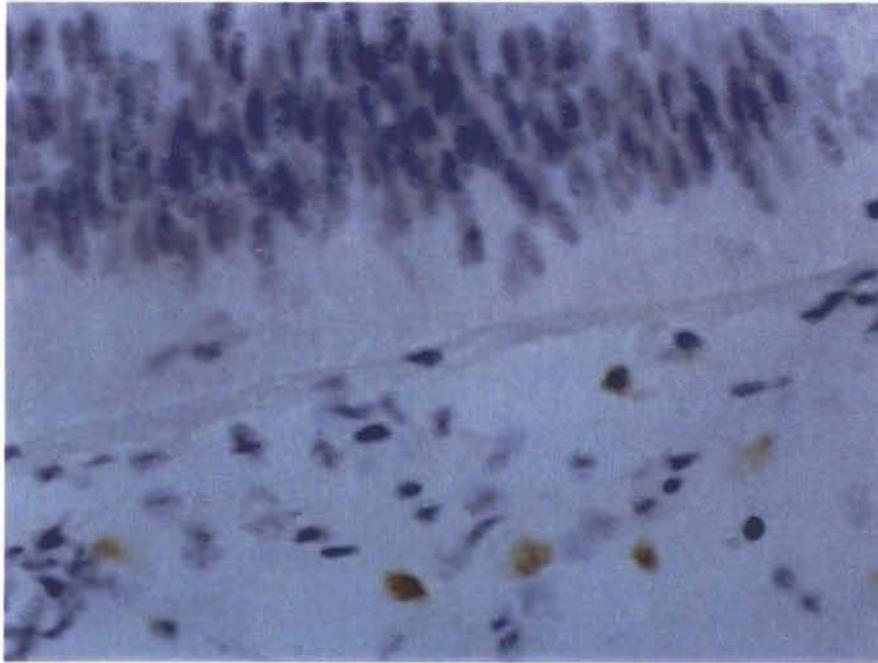


Figure 1 - Glande digestive d'huître creuse infectée par le virus de type herpès. Réaction d'hybridation *in situ*. Marquage brun de cellules infectées dans le tissu conjonctif. Coloration de fond au bleu de UNNA. G x 800.

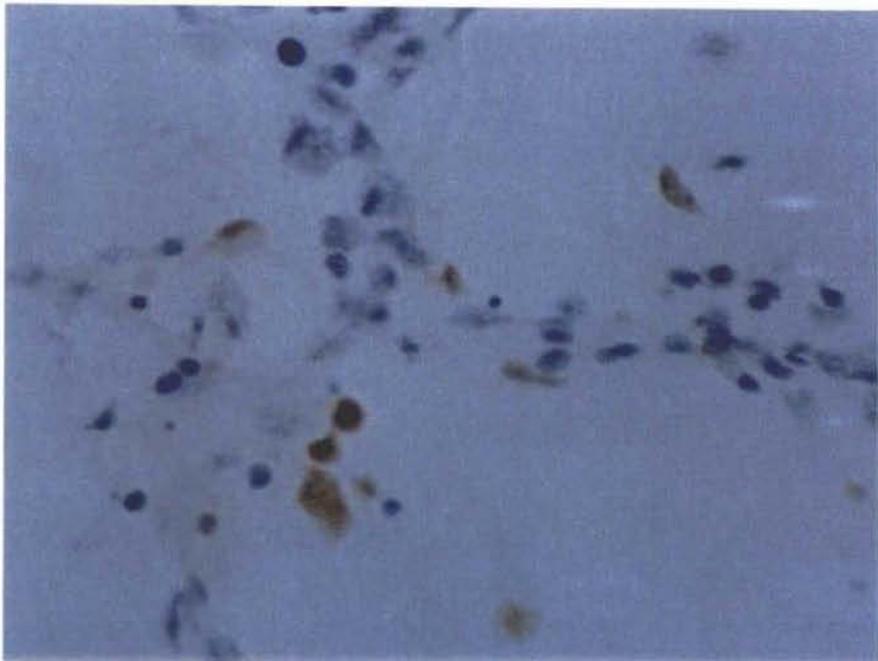


Figure 2 - Manteau d'huître creuse infectée par le virus de type herpès. Réaction d'hybridation *in situ*. Marquage brun de cellules infectées dans le tissu conjonctif. Coloration de fond au bleu de UNNA. G x 800.

2. - Essais de transmission de l'infection à virus de type herpes chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, au stade naissain

2. 1. - Reproduction de l'infection sur larves axéniques

Cinq essais ont été réalisés. Les oeufs fécondés obtenus après fécondation en conditions stériles sont répartis dans des fioles ou des ballons contenant de l'eau de mer filtrée stérile. Après 24 heures, un ultrafiltrat de broyat de larves infectées est inoculé dans les fioles ou les ballons à infecter et on ajoute le même volume d'eau de mer filtrée stérile dans les fioles ou les ballons servant de témoins négatifs.

Les larves sont observées régulièrement, elles sont récupérées et analysées en PCR. Le tableau I reprend les différents essais réalisés. L'observation régulière des larves n'a pas montré de différence évidente entre les élevages infectés et les élevages servant de témoins négatifs. En particulier, aucune différence nette n'a été constatée en ce qui concerne la sédimentation des larves et les anomalies du velum. Seuls les essais 3 et 5 ont conduit à la réalisation d'analyses en PCR.

Essai 3

Les surnageants obtenus après centrifugation des élevages à 3500 tours par minute pendant 15 minutes à 8°C et les surnageants obtenus après rinçage des larves avec de l'eau de mer filtrée stérile sont analysés en PCR. De même, les larves sont récupérées et traitées de façon à être examinées en PCR. Sur les trois fioles infectées, une seule présente des résultats positifs en PCR, et ceci pour les larves comme pour les surnageants. Les autres prélèvements, provenant des autres fioles infectées et des fioles non infectées, sont négatifs en PCR.

Essai 5

Les larves des trois ballons sont récupérées et traitées afin d'être analysées en PCR. Les résultats sont tous négatifs.

TABLEAU I

	ESSAI 1	ESSAI 2	ESSAI 3	ESSAI 4	ESSAI 5
Fécondation					
Géniteurs	2 femelles 1 mâle	2 femelles 1 mâle	2 femelles 1 mâle	1 femelle 1 mâle	2 femelles 2 mâles
Volume de spermatozoïdes	10 ml	15 ml	20 ml	20 ml	10 ml
Matériel utilisé					
Larves infectées	10 fioles 200 ml	20 fioles 200 ml	3 fioles 200 ml	2 ballons 5 l	2 ballons 2,2 l
Témoins négatifs	5 fioles 200 ml	10 fioles 200 ml	3 fioles 200 ml	1 ballon 5 l	1 ballon 2,2 l
Densité de larves	50 larves/ml	50 larves/ml	50 larves/ml	50 larves/ml	100 larves/ml
Conditions d'élevage	Bain-marie 24°C	Bain-marie 24°C	Bain-marie 24°C		Antibiotiques
Ultrafiltrat					
Quantité de larves Infectées broyées	50 mg lot 95-201.2	50 mg lot 95-201.2	60 mg lot 95-201.2	LARVES MORTES	Préparation de deux ultrafiltrats (U1 et U2) : 50 mg écloserie et 95-201.2 20 ml - 8 ml de U1 dans un ballon, 8 ml de U2 dans l'autre
Volume final	11 ml	11 ml	20 ml		
Volume inoculé	0,5 ml/fiole	0,5 ml/fiole	5 ml/fiole		
Réinfection éventuelle	100 mg du lot 95-201.2 dans 11 ml inoculation : 1 ml 48 h après 1 ^{ère} infection		50 mg de larves écloserie* dans 20 ml inoculation : 5 ml 7 jours après 1 ^{ère} infection		

* larves fraîches provenant de l'écloserie de IFREMER La Tremblade, contrôlées positives en PCR

2. - Essais de reproduction de l'infection sur naissain

Avant les essais d'infection, un "**Point Zéro**" a été établi. Au terme de la période d'acclimatation, on prélève cinq huîtres par bac. Les animaux provenant d'un bac sont regroupés et servent à la préparation d'un échantillon qui est analysé en PCR. Les analyses sont négatives pour l'ensemble des lots d'animaux (cinq).

Quatre essais d'infection ont été tentés sur les mêmes animaux. Chaque essai comprend une fécondation en conditions stériles, l'infection des larves axéniques par inoculation d'ultrafiltrat de broyat de larves infectées, une ponte de larves conventionnelles et leur infection par inoculation des larves axéniques infectées. Enfin, la réussite de l'infection des larves conventionnelles conditionne la dernière étape, à savoir l'infection du naissain après sa mise en contact avec les larves conventionnelles infectées. A chaque étape des animaux infectés et des témoins négatifs sont utilisés : deux ballons de cinq litres d'eau de mer filtrée stérile pour les larves axéniques infectées et un ballon servant de témoin négatif ; deux bacs cylindro-coniques pour les larves conventionnelles infectées et un bac cylindro-conique servant de témoin négatif. Le déroulement de ces essais est repris dans le tableau suivant (tableau II).

TABLEAU II

	ESSAI 1	ESSAI 2	ESSAI 3	ESSAI 4	ESSAI 5
Fécondation axénique Géniteurs Matériel Conditions d'élevage Densité larvaire	2 femelles et 1 mâle 3 ballons de 5 l Antibiotiques ¹ Rinçage des ovules ² 40 larves/ml	2 femelles et 1 mâle 3 ballons de 5 l Antibiotiques ¹ Rinçage des ovules ² 40 larves/ml	2 femelles et 1 mâle 3 ballons de 5 l Antibiotiques ¹ Rinçage des ovules ² 50 larves/ml	2 femelles et 1 mâle 3 ballons de 5 l Antibiotiques ¹ Rinçage des ovules ² 50 larves/ml	1 femelle et 1 mâle 3 ballons de 5 l Antibiotiques ¹ Rinçage des ovules ² 50 larves/ml
Infection des larves axéniques Quantité de larves infectées broyées Volume final Volume inoculé	J3 50 mg du lot 95-201.2 20 ml 9 ml	J3 100 mg lot 95-201.2 100 mg larves éclosion 20 ml pour chaque lot 7,5 ml des 2 ultrafiltrats	J2 50 mg lot 95-201.2 (autre échantillon ³) 20 ml 8 ml	J3 600 mg du lot 95-201.2 30 ml 11 ml	J2 150 mg de 4 lots ⁴ différents (600mg) 20 ml 6,5 ml
Ponte de larves conventionnelles Géniteurs Densité larvaire Infection	3 femelles et un mâle 180 larves/ml J3	Larves de l'éclosion IFREMER 40 larves/ml J4	2 femelles et 1 mâle 55 larves/ml J2	Larves de l'éclosion IFREMER 50 larves/ml J3 Traitement particulier ⁵	Larves de l'essai 4 réutilisées
Infection naissain Larves conventionnelles	J5	PAS DE MISE EN CONTACT	J6	PAS DE MISE EN CONTACT	
Date et durée des essais	23/05/97 au 12/06/97	16/06/97 au 01/07/97	01/07/97 au 08/07/97	19/07/97 au 24/07/97	24/07/97 au 09/08/97

Remarques

Essai 1 - Les antibiotiques utilisés sont les suivants : Pénicilline-Streptomycine - Fluméquine.

Essai 2 - Afin de limiter l'introduction de bactéries dans le milieu de fécondation, le surnageant des ovules est éliminé après sédimentation de ces derniers. Les ovules sédimentés sont alors transvasés dans un Erlen Meyer contenant 300ml d'eau de mer filtrée stérile.

Essai 3 - Les larves infectées du lot 95-201.2 ont été réparties dans plusieurs flacons, l'échantillon utilisé dans l'essai 3 n'avait encore jamais été testé.

Essai 4 - Les quatre lots utilisés sont les suivants :

95R159

95R186-1

95R186-2

95R201.2.

Essai 5 - Au cours de l'essai 5, l'un des bacs de larves conventionnelles infectées est traité de la même façon que sont conduits les élevages larvaires de l'écloserie d'IFREMER La Tremblade. Le contenu du bac cylindro-conique est filtré sur des tamis dont la maille augmente proportionnellement à la taille des larves, l'eau d'élevage est ainsi renouvelée le lundi, le mercredi et le vendredi. La densité larvaire est alors ajustée. A chaque renouvellement, des antibiotiques sont ajoutés à l'eau d'élevage (erythromycine à la posologie de 10mg/l). Des algues phytoplanctoniques sont apportées tous les jours. Entre chaque renouvellement d'eau le bac est désinfecté et rincé.

Pour chaque essai, différents prélèvements ont été réalisés et analysés en PCR.

Essai 1

Au cours de l'expérience, le naissain des bacs 6 et 7 a présenté des mortalités sur la période du premier essai (entre le 23/05/1997 et le 12/06/1997). L'analyse en PCR après traitement des individus ne permet pas de détecter de l'ADN viral. Les analyses en PCR n'ont été positives que pour le surnageant non ultrafiltré et ultrafiltré à 0,45µm de broyat de larves infectées du lot 95-201.2.

Essai 2

Le surnageant ultrafiltré de broyat de larves infectées du lot 95-201.2 est positif en PCR, tandis que non ultrafiltré,, de même que les prélèvements réalisés dans les ballons de larves axéniques et dans les bacs cylindro-coniques avant et après contact avec les larves axéniques. Cependant, les larves récupérées après filtration du contenu des bacs cylindro-coniques A et B apparaissent positives. Les larves conventionnelles n'ont pas été mises au contact du naissain pour cette expérience. Au cours de cette essai, aucune mortalité n'a été cependant observée dans les différents bacs de naissain.

Essai 3

Les analyses en PCR montrent que ni le surnageant de broyat de larves infectées utilisées, ni les autres prélèvements réalisés ne sont positifs. Entre le 01/08/1997 et le 08/07/1997, aucune mortalité dans les bacs contenant le naissain n'a été observé. Aucune analyse n'a donc été réalisée en PCR.

Essai 4

Les prélèvements réalisés dans les ballons de larves axéniques comme dans les bacs cylindro-coniques sont négatifs en PCR. Le surnageant de broyat de larves infectées du lot 95-201.2 non filtré et filtré à $0,45\mu\text{m}$ apparaît quant à lui, positif. Par ailleurs, des mortalités de naissain ont été observées au cours de cet essai dans le bac 9. Les analyses réalisées en PCR sont négatives.

Des travaux réalisés au laboratoire IFREMER de La Tremblade (Charente Maritime) ont montré qu'il était possible de reproduire expérimentalement l'infection à virus de type herpès sur des larves axéniques d'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Le Deuff *et al.*, 1994). Dans cette étude, 48 heures après inoculation d'un ultrafiltrat de broyat de larves infectées, l'ensemble des larves axéniques sédimente et présente des anomalies de velum (hypertrophie et détachement des cellules du velum). Les élevages infectés présentent alors 100% de mortalité tandis que les témoins négatifs ne présentent que 3% de mortalité.

Les cinq essais réalisés dans la présente étude n'ont pas permis d'obtenir de tels résultats. Des lésions du velum sont visibles tant sur les larves axéniques des ballons infectés que sur les larves des ballons non infectés. De plus, aucun phénomène de sédimentation n'a pu être clairement observé. Parmi les analyses en PCR réalisées, seule une fiole infectée de l'essai 5 présente des résultats positifs. Cependant, il est difficile de savoir si l'ADN viral détecté provient des larves elles-mêmes ou de l'inoculum (broyat ultrafiltré) présent dans l'eau résiduelle qui entoure les larves. En effet, l'ADN viral est détecté en PCR dans l'échantillon de larves, mais également dans les différents surnageants récupérés après centrifugation et rinçages des élevages. On ne peut donc pas affirmer que ces larves axéniques étaient réellement infectées.

Les résultats obtenus peuvent s'expliquer par une perte de virulence du lot de larves 95-201.2 utilisé pour réaliser les contaminations. Cet échantillon a été contrôlé positif en PCR avant d'entreprendre les essais. Cependant, la technique de PCR permet de détecter l'ADN viral, mais ne permet pas d'apprécier le pouvoir infectieux du virus : ADN contenu dans des particules virales intègres ou ADN libéré à partir de virions dégradés. De plus, le protocole de PCR utilisé ne permet d'obtenir qu'un résultat qualitatif et non pas quantitatif. Les décongélations et recongélations successives du lot de larves infectées 95-201.2 ont pu altérer le virus et lui faire perdre son pouvoir infectieux.

Par ailleurs, la suspicion de l'existence de substances dans les fioles de culture cellulaire pouvant induire une inhibition de la PCR a conduit à l'utilisation de ballons en verre. Cependant, aucune différence significative n'a pu être observée entre les deux types d'élevage.

Enfin, la qualité des gamètes conditionnant l'obtention des larves en bon état et donc le succès de l'infection, le choix des géniteurs est primordial. Il a été possible d'observer la présence de grandes quantités de bactéries au niveau des gamètes pour l'ensemble des géniteurs utilisés. De ce fait, la nature axénique réelle des larves obtenues pourrait être remise en cause et expliquer ainsi l'absence de transmission de l'infection virale. En effet, tous les essais d'infection de larves conventionnelles réalisés jusqu'alors ont échoués lorsqu'un surnageant de broyat d'animaux contaminés était utilisé.

Les travaux entrepris en 1995 consistaient à infecter du naissain par balnéation en présence de broyats ultrafiltrés de larves et de naissain contaminés, conservés congelés à -20°C. En outre, des essais d'infection d'adultes avaient été tentés par inoculation intracardiaque de ces mêmes broyats. Aucun phénomène de mortalité n'avait pu être observé au cours de ces essais. Il faut noter que dans ce cas, les particules virales présentes chez les animaux infectés sont libérées par dissociation mécanique des tissus et peuvent, de ce fait, être altérées. Au vu de ces résultats, les essais ultérieurs d'infection de naissain d'huître ont été réalisés en utilisant un support biologique vivant (contact avec des larves infectées expérimentalement vivantes). De cette façon, des particules virales infectieuses sont produites par les larves infectées et libérées dans le milieu extérieur à mesure que l'infection se poursuit. Différents essais réalisés en 1996, en utilisant ce schéma, avaient abouti à l'observation de mortalités différentielles significatives entre des bacs de naissain contrôle et des bacs de naissain mis au contact de larves conventionnelles expérimentalement infectées pour une expérience. De plus, les analyses en PCR montraient la présence d'ADN viral pour le naissain mis au contact des larves infectées, alors qu'elles étaient négatives pour les animaux témoins négatifs.

L'objectif de la présente étude était de reprendre les expériences initiées en 1996 et de tenter d'établir un protocole reproductible pour transmettre expérimentalement l'infection à virus de type herpès à des huîtres au stade naissain. L'ensemble des essais réalisés n'a pas permis d'aboutir à des mortalités sur le naissain. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les larves axéniques utilisées comme premier maillon dans l'obtention de matériel vivant contaminé n'étaient pas infectées. Les essais seront poursuivis afin de vérifier et de démontrer que le virus de type herpès est bien l'agent pathogène responsable des mortalités de naissain.