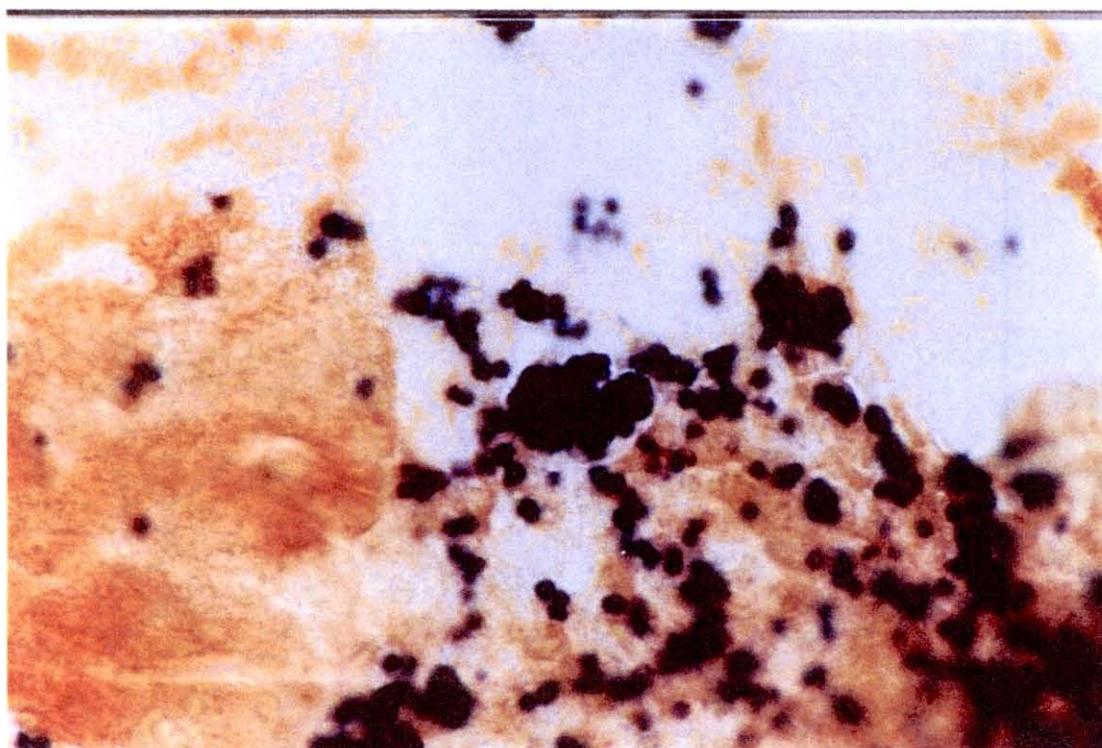


IFREMER  
BIBLIOTHEQUE  
LA TREMBLADE

**Contrat Région Poitou-Charentes 1999  
Convention 99/RPC-A-200 "Pathologie"**

**Outils de dépistage des pathogènes**

**T. Renault et N. Cochenec**



**Laboratoire Ifremer de Génétique et pathologie**

**BP 133 17390 LA TREMBLADE (FRANCE)**

**Tel. 05.46.36.98.36**

**Fax. 05.46.36.37.51**

# SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	2
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>3</b>
1.1. RÉSULTATS 1994-1998.....	3
1.2. OBJECTIFS ET ÉTUDES 1999 .....	3
<b>2. INFECTIONS A BONAMIA .....</b>	<b>4</b>
2.1. INTRODUCTION ET OBJECTIFS .....	4
2.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	5
2.2.1. <i>Purification du parasite Bonamia ostreae</i> .....	5
2.2.2. <i>Techniques de biologie moléculaire</i> .....	5
2.3. RÉSULTATS.....	6
2.3.1. <i>Séquencage du gène codant pour la petite sous unité de l'ARN ribosomal (18S)</i> .....	6
2.3.2. <i>Détection de Bonamia ostreae par amplification génique enzymatique (PCR)</i> .....	6
2.3.3. <i>Localisation tissulaire : histologie et hybridation in situ</i> .....	6
2.4. CONCLUSIONS – PERSPECTIVES .....	7
<b>3. INFECTIONS A VIRUS DE TYPE HERPES .....</b>	<b>9</b>
3.1. INTRODUCTION ET OBJECTIFS .....	9
3.2. DÉVELOPPEMENT ET UTILISATION DES OUTILS PCR .....	9
3.3. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES VIRUS DE TYPE HERPÈS .....	11
3.3.1. <i>PCR</i> .....	12
3.3.2. <i>PCR-RFLP</i> .....	13
3.3.3. <i>Hybridation moléculaire</i> .....	15
3.4. CONCLUSION .....	15
<b>IV. - BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>17</b>
V. 1. - PUBLICATIONS.....	19
V. 2. – COMMUNICATIONS.....	19
V. 3. - POSTERS .....	19

## 1. INTRODUCTION

Le Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP) de la station IFREMER de La Tremblade (Charente Maritime) est impliqué aux plans national et international dans l'étude des maladies affectant les mollusques bivalves marins d'intérêt économique et plus particulièrement les huîtres. Des travaux concernant le développement, la validation et l'utilisation d'outils de diagnostic spécifiques d'agents infectieux propres aux coquillages y sont ainsi menés.

### 1.1. Résultats 1994-1998

Dans le cadre du Plan Etat-Région 1994-1998, l'étude d'agents pathogènes chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, a été réalisée à La Tremblade. Les travaux ont porté sur la recherche de différents agents infectieux chez l'huître creuse.

Ainsi, un virus de type herpès a été identifié chez les larves et les juvéniles. Ce virus n'a pas été jusqu'alors observé chez les animaux adultes. Après purification de cet agent infectieux, il a été ainsi possible de préparer des outils de diagnostic spécifiques : anticorps polyclonaux, amorces de PCR et sondes nucléiques marquées. Ces outils ont été utilisés à plusieurs reprises lors de l'analyse de phénomènes de mortalités chez les huîtres.

### 1.2. Objectifs et études 1999

Faisant suite aux résultats obtenus, les objectifs pour 1999 étaient de mettre au point différents outils moléculaires spécifiques d'agents infectieux observés chez les mollusques (parasites protozoaires et virus) et de les utiliser à des fins de diagnostic.

Ainsi des outils ont été développés et utilisés pour rechercher et étudier des parasites appartenant aux genres *Bonamia* et *Marteilia* ainsi que des virus de type herpès.

## 2. INFECTIONS A BONAMIA

### 2.1. Introduction et objectifs

Des mortalités massives, parfois observées dans les élevages de mollusques bivalves marins, sont associées au développement rapide des activités aquacoles. L'étiologie des principales épidémies qui ont affecté les activités conchylicoles (Kinne, 1983) met le plus souvent en cause des protozoaires du phylum des *Asctospora* (Levine, 1980). Celui-ci regroupe les genres *Marteilia*, *Haplosporidium*, *Minchinia* et *Bonamia*.

Ces protozooses, par leur caractère initialement épidémique puis endémique, se traduisent pas des chutes de production et des pertes économiques notables. L'élevage de l'huître plate, *Ostrea edulis*, est à cet égard parfaitement représentatif (Grizel, 1985). En effet, après avoir subi l'impact d'une première parasitose due à *Marteilia refringens* (Grizel *et al.*, 1974), cette activité ostréicole a été considérablement réduite en France par une deuxième protozoose, la bonamiose provoquée par *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980). La production annuelle d'huître plate, qui était dans les années 1970 de 30 000 tonnes est aujourd'hui limitée à 1500 tonnes.

Un des moyens de lutte contre ces maladies est la mise en place de mesures zoosanitaires. Ces mesures sont basées sur une réglementation des échanges entre les différentes zones d'élevage. Différentes directives ont été aussi établies instituant les mesures communautaires minimales de contrôle de la Bonamiose. A l'heure actuelle, pour réaliser ces contrôles, le diagnostic nécessite obligatoirement des examens histologiques ou cytologiques (Bachère *et al.*, 1982). Ces techniques lourdes à mettre en œuvre sont inapplicables pour la quantification des infections en raison de la difficulté à traiter un grand nombre d'échantillons rapidement mais surtout elles sont inadaptées à la détection des faibles niveaux d'infection. Elles sont de ce fait insuffisantes pour la mise en place et la définition de règles de prophylaxie qui visent à réduire l'incidence de la maladie et à réglementer les procédures d'échange entre pays.

Un des thèmes de recherche développés au Laboratoire de Génétique et Pathologie de la Tremblade consiste à la mise au point de nouveaux outils de diagnostic sensibles et rapides du parasite *Bonamia ostreae*. L'obtention de suspensions de parasites purifiés (Mialhe *et al.*, 1988) a permis de développer des anticorps monoclonaux spécifiques (Rogier *et al.*, 1991). L'un deux couplé à une enzyme (phosphatase alcaline) a été utilisé pour mettre au point un immunodiagnostic enzymatique (Cochennec *et al.*, 1987) disponible sous forme de kit. Cependant la commercialisation de ce kit, confrontée aux coûts de production en petites séries et à l'absence de structures institutionnelles ou privées suffisamment dynamiques pour promouvoir ce type de diagnostic, a été arrêtée. Des techniques complémentaires de diagnostic et d'identification sont donc encore nécessaires. L'utilisation de la biologie moléculaire semble pouvoir compléter ces analyses, par l'étude, par exemple, de gènes d'intérêt phylogénique comme le gène 18S.

Nous nous sommes attachés à la préparation d'outils de détection spécifique du parasite *Bonamia ostreae* puis à leur utilisation en PCR (amplification génique enzymatique) et en hybridation in situ.

## 2.2. Matériel et méthodes

### 2.2.1. Purification du parasite *Bonamia ostreae*

Il est important de préciser qu'à l'heure actuelle il n'existe pas de lignées cellulaires de mollusques bivalves marins permettant de cultiver, *in vitro*, le parasite *Bonamia ostreae*. Ceci conditionne la réalisation d'une étape initiale supplémentaire de purification du parasite à partir d'huîtres fortement infectées afin de disposer de suspensions purifiées et concentrées de parasites. Ces suspensions sont obtenues en suivant un protocole établi par Mialhe et al. (1988) optimisé par Cochenec (1997).

### 2.2.2. Techniques de biologie moléculaire

#### *Extraction de l'ADN*

Après la purification, le culot de parasite (120.107 parasites) est repris dans 1200 µl de tampon de lyse (10mM EDTA, 10mM Tris à pH 7.6, 100mM NaCl, 0.2% SDS). La suspension parasitaire est ensuite incubée après l'adjonction de protéinase K (0.1mg/ml) pendant une nuit à 37°C. Les acides nucléiques sont extraits en ajoutant un volume égal de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Le mélange est homogénéisé pendant quelques secondes par inversion répétée du tube. Après séparation des phases par une centrifugation (1000g, 10 min, 4°C), la phase aqueuse surnageante contenant les acides nucléiques est récupérée. Les acides nucléiques sont alors précipités après ajout de 1/10ème de volume d'acétate de sodium (3M) et de deux volumes d'éthanol absolu. Après centrifugation (1000g, 10 min, 4°C), les culots sont séchés et re-suspendus en eau bi-distillée.

#### *Amplification génique enzymatique (Polymerase Chain Reaction)*

L'amplification en PCR du gène codant pour la petite sous unité de l'ARN ribosomal (18S) a été réalisée en utilisant des amorces universelles du gène 18S dessinées par Le Roux et al. (1999). L'ADN génomique est amplifié en suivant les conditions ci-après :

1er cycle : dénaturation 94°C, 4 min

2ème au 30ème cycle : dénaturation 94°C, 1 min ; hybridation 55°C, 1 min ;  
élongation 72°C 1 min.

Un dernier cycle d'élongation à 72°C de 10 min achève la réaction d'amplification.

#### *Clonage des produits PCR*

Le clonage permet l'insertion d'un fragment d'ADN dans un élément génétique capable d'auto-réplication. Ce sont ensuite des bactéries qui servent d'hôte pour l'amplification de cet élément. Le clonage comporte deux étapes : la ligation du fragment d'ADN dans le plasmide et la transformation des bactéries qui consiste à insérer le plasmide recombinant dans ces bactéries.

#### *Séquençage*

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'enchaînement des nucléotides qui le constitue. Il est réalisé d'après la méthode enzymatique de Sanger (Sanger et al., 1977). Il constitue l'étape ultime de l'analyse du génome viral.

## 2.3. Résultats

### 2.3.1. Séquençage du gène codant pour la petite sous unité de l'ARN ribosomal (18S)

Le couple d'amorces universelles utilisé (CS1 – CAS2) a permis d'amplifier un fragment de 1325 pb. Ce fragment a été séquencé et la comparaison de cette séquence avec d'autres séquences connues de microorganismes a montré des similarités avec les séquences de parasites du genre Haplosporidium (*H. nelsoni*, *H. costale*) respectivement 90 et 89%.

### 2.3.2. Détection de *Bonamia ostreae* par amplification génique enzymatique (PCR)

L'obtention de la séquence du 18S de *B. ostreae* et sa comparaison avec les séquences connues d'*H. nelsoni* et *H. costale* ont également permis de définir des portions de séquences variables entre les différents parasites. Ces portions de séquences ont permis de dessiner des amorces spécifiques du parasite *Bonamia ostreae*. Un couple d'amorces nommées Bo et BoAS a permis l'amplification d'un fragment de 300 pb. Ces amorces ont permis la détection par PCR du parasite *B. ostreae* dans différents échantillons d'ADN d'huîtres infectées.

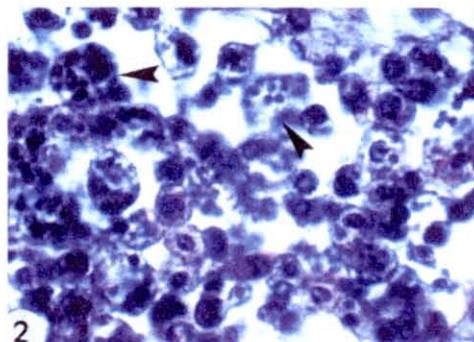


**Figure 1** : Gel d'agarose illustrant les résultats de PCR avec le couple d'amorce (Bo-Boas). Pistes 1 et 7 : marqueur de taille. Pistes 2-3-4 : ADN d'huîtres faiblement, moyennement et fortement infectées par *Bonamia ostreae*. Piste 5 : ADN d'huître non infectée. Piste 6 : ADN d'huître infectée par *Marteilia refringens*.

Ces amorces ont également permis de réaliser une sonde ADN par PCR marquée par une molécule : la digoxigénine. Cette sonde utilisée en hybridation in situ révèle la localisation des parasites sur coupes histologiques.

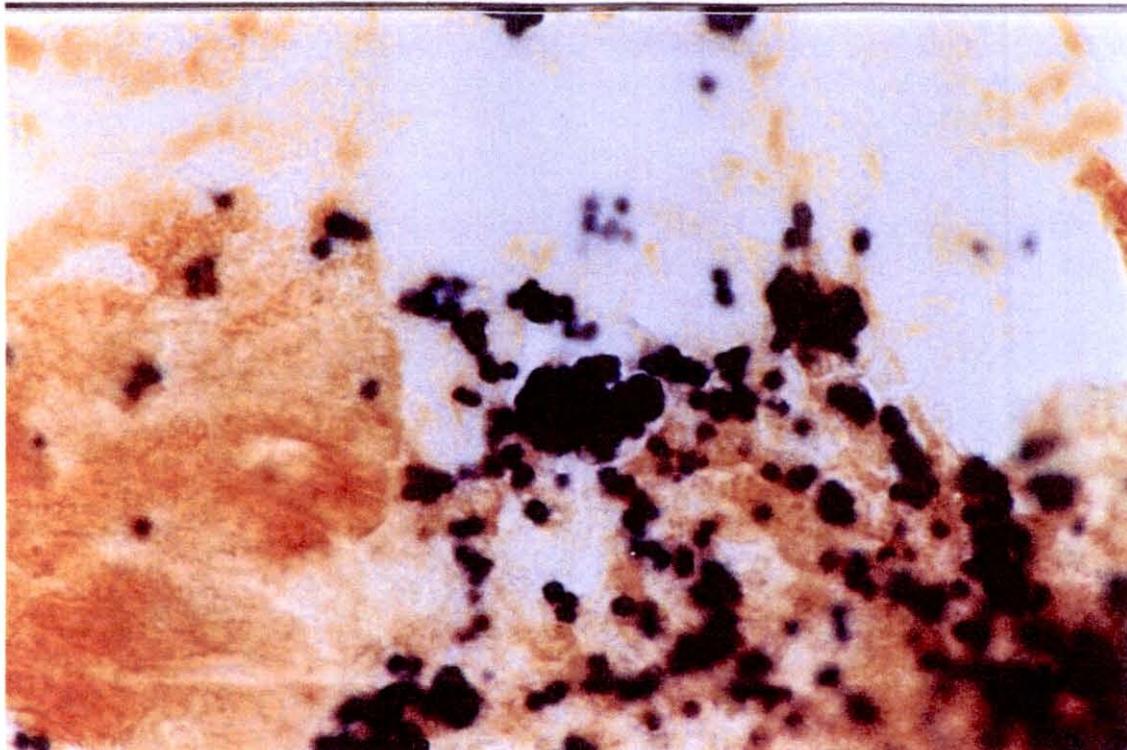
### 2.3.3. Localisation tissulaire : histologie et hybridation in situ

L'observation de coupes histologiques permet de mettre en évidence une infection massive du tissu conjonctif d'une huître plate. De nombreux parasites *B. ostreae* sont retrouvés à l'intérieur des cellules hémocytaires (Flèches).



**Figure 2** : Photographie d'une coupe histologique de tissu conjonctif d'une huître plate infectée par *Bonamia ostreae* (X1000).

Après hybridation in situ ces parasites sont colorés en brun violet. Cette coloration met en évidence l'hybridation de la sonde marquée sur l'ADN des cellules parasitaires. Il est intéressant de noter l'absence de bruit de fond qui atteste de la spécificité de la sonde pour les parasites *B. ostreae*.



**Figure 3** : Photographie d'une hybridation in situ d'une coupe histologique d'un tissu d'huître infectée. Les nombreux parasites sont colorés en brun violet (X1000).

#### 2.4. Conclusions – Perspectives

Dans le but de définir des réactifs spécifiques du parasite *Bonamia ostreae*, nous avons choisi d'étudier le gène codant pour la petite sous unité de l'ARN ribosomale (18S). En effet, ces gènes sont de plus en plus utilisés pour la mise au point d'outils diagnostique (PCR et/ou hybridation in situ) de microorganismes pathogènes. En effet, les ARN ribosomiques sont codés par des gènes qui sont souvent présents en de très nombreuses copies dans l'organisme ce qui facilite ainsi leur détection.

Nous avons pu, à partir de cette séquence, définir des amorces spécifiques du parasite *Bonamia ostreae*. Ces amorces ont été dessinées après avoir comparé la séquence de *B. ostreae* aux séquences qui présentaient le plus d'homologie : *Haplosporidium nelsoni* et *Haplosporidium costale*. Les amorces ainsi définies ont permis la détection du parasite par PCR dans de nombreux échantillons positifs. Leur spécificité a été vérifiée par l'absence d'amplification d'échantillons d'ADN d'huîtres non infectées ou infectées par un autre parasite *Marteilia refringens*. Elles ont également été utilisées pour préparer une sonde marquée par la digoxigénine. Cette sonde a permis en hybridation in situ, d'une part de confirmer que la séquence amplifiée correspondait bien à celle du parasite *B. ostreae* et d'autre part de localiser de manière précise le parasite dans des tissus d'huîtres fortement et faiblement infectées.

Ces résultats sont intéressants car ils vont permettre l'utilisation de ces outils à des fins de diagnostic. A l'heure actuelle le diagnostic de *B. ostreae* est réalisé par des examens en microscopie photonique. Bien que progressivement ce diagnostic ait été simplifié en substituant l'examen de coupes histologiques par celui d'apposition de tissus cardiaque, il reste lourd à mettre en œuvre et nécessite une bonne connaissance des tissus de mollusques et des parasites, notamment dans le cas de faibles infections.

Le parasite *B. ostreae* fait partie d'un groupe de parasites associés à des maladies regroupées sous le nom de « *microcell* ». Ces parasites sont tous unicellulaires, de petites tailles et présentent des similitudes en microscopie électronique (taille, présence d'haplosporosomes). Parmi ces parasites on peut citer *Bonamia* sp. qui affecte l'huître *Ostrea chilensis* en Nouvelle Zélande et *Ostrea angasi* en Australie, *Mikrocytos roughleyi*, agent infectieux impliqué dans « Australian winter mortality » et qui affecte *Saccostrea commercialis* sur les côtes australiennes et *Mikrocytos mackini* responsable de la maladie de Denman Island et qui affecte *Crassostrea gigas*. Tous ces parasites sont difficiles à diagnostiquer notamment lors de faibles infections et il n'est pas possible à partir d'examens des coupes histologiques ou cytologiques seuls, de les identifier avec certitude. Ceci soulève le problème des introductions (frauduleuses ou non) d'animaux de pays tiers où l'une ou l'autre des maladies sont présentes. Les outils moléculaires définis dans cette étude vont permettre de disposer d'un diagnostic spécifique des parasites du genre *Bonamia*. Des études complémentaires de mise au point d'outils de diagnostic et d'identification des autres parasites sont indispensables afin de compléter ce travail.

L'hybridation in situ présente un intérêt tout particulier car cette technique est utilisable sur des coupes histologiques préparées « classiquement ». Elle permettra de compléter les analyses réalisées dans les cellules de veille zoosanitaire, qui sont chargées de la surveillance des animaux d'élevage. En effet, l'examen de coupes histologiques est aujourd'hui encore la technique de référence au niveau international pour le diagnostic de la plupart des agents pathogènes décrits. L'hybridation in situ pourra à moyen terme être utilisée comme technique de confirmation de détection et d'identification de parasites dans le cas de diagnostic de suspicion d'infection. Ceci est capital dans le cas d'importation d'animaux de pays tiers dont la situation zoosanitaire est peu ou pas connue.

Outre leur intérêt dans la mise au point d'outils de détection, l'étude du gène 18S peut permettre l'étude des relations taxonomiques de ce parasite avec les parasites de genre proche et les parasites du groupe « *microcell* ». L'identification de ces différents parasites reposait jusqu'alors sur des observations en microscopie électronique. La présence d'organites intracellulaires, les haplosporosomes, et l'absence de spores a entraîné une controverse dans la position taxonomique des parasites du genre *Bonamia*. Plusieurs classifications se sont succédées, en 1980 Levine les classe dans le phylum des Ascetospora et la classe Paramyxea, en 1988 Perkins révisé cette classification sur la base des propositions de Corliss et replace le genre *Bonamia* dans la classe des *Haplosporida*. Nos résultats montrent des homologies de séquence importantes avec les parasites *Haplosporidium nelsoni* et *Haplosporidium costale* rapprochant les parasites du genre *Bonamia* aux parasites du genre *Haplosporidium*.

Afin de supporter cette hypothèse ces résultats préliminaires devront être complétés par l'étude des parasites *Bonamia* sp.

### 3. INFECTIONS A VIRUS DE TYPE HERPES

#### 3.1. Introduction et objectifs

Des infections impliquant des virus de type herpès ont été décrites chez plusieurs espèces de mollusque bivalve d'intérêt économique dans différentes régions du globe. Ainsi, le premier cas d'infection à virus de type herpès chez les bivalves marins a été rapporté en 1972 aux Etats-Unis chez des adultes d'huître américaine, *Crassostrea virginica* (Farley *et al.*, 1972). Des mortalités massives, associées à la détection d'un virus apparenté à la famille des *Herpesviridae* ont été décrites depuis 1991 en France sur des larves et des juvéniles d'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Nicolas *et al.*, 1992 ; Renault *et al.*, 1994a) et d'huître plate, *Ostrea edulis* (Comps et Cochenec, 1993 ; Renault, communication personnelle). Un virus similaire a également été décrit en Nouvelle Zélande chez des larves des espèces *C. gigas* et *Tiostrea chilensis* (Hine *et al.*, 1992 ; Hine *et al.*, 1998). De plus, des particules virales de type herpès ont été observées dans des hémocytes d'huîtres adultes de l'espèce *O. angasi* en Australie (Hine et Thorne, 1997). En 1997 et en 1998, des analyses de larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* et de larves de palourdes européennes, *R. decussatus* présentant de fortes mortalités et provenant d'une éclosion privée française ont permis de mettre en évidence un virus de type herpès (Renault, 1998 ; Renault, communication personnelle). Ces descriptions multiples reflètent le caractère ubiquiste des virus apparentés à cette famille chez les bivalves marins. Cependant, la plupart des travaux concernant ces virus correspondent à des études descriptives et à des analyses réalisées en histologie et en microscopie électronique à transmission. Il est donc délicat, en se basant sur ces critères épidémiologiques et structuraux, de définir s'il existe plusieurs virus différents (Renault *et al.*, 1994b), spécifiques d'espèce ou un seul virus capable d'infecter plusieurs espèces de bivalve.

Les objectifs du programme proposé étaient :

- de développer, d'améliorer et d'utiliser des techniques moléculaires pour diagnostiquer les infections à virus de type herpès ;
- d'utiliser les outils mis au point pour étudier s'il existe une diversité génétique chez les virus de type herpès observés chez les huîtres.

#### 3.2. Développement et utilisation des outils PCR

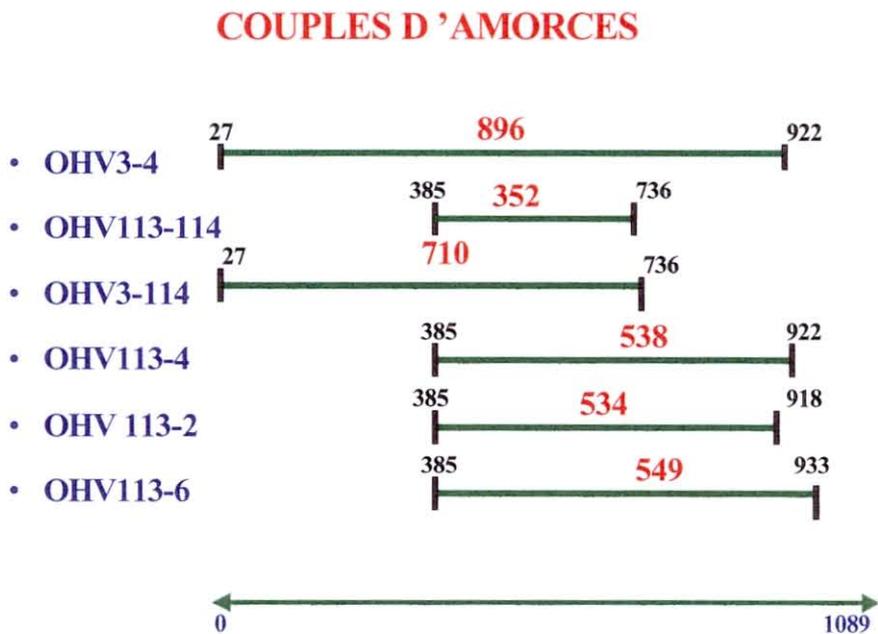
La purification de particules virales à partir de larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, infectées a permis en 1995 d'extraire de l'ADN viral (Le Deuff et Renault, 1999). Cet ADN, dont la taille a été estimée à 180 kpb, a été cloné dans un plasmide, sous forme de fragments de 1 à 4 kpb (Le Deuff et Renault, 1999). Parmi ces fragments, certains ont été partiellement séquencés. Des séquences cibles pour l'amplification par PCR ont été choisies parmi ces séquences d'ADN viral, puis plusieurs couples d'amorces ont été dessinés en fonction de ces séquences cibles (Renault *et al.*, 1997). Le but de cette mise au point était avant tout d'utiliser ces amorces dans le cadre du diagnostic de l'infection chez des larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, présentant ou non des mortalités. Cependant, l'utilisation de différents couples d'amorces permet d'explorer des fragments du génome viral et ainsi de détecter s'il existe des variations au sein de celui-ci. Une fois qu'un polymorphisme est mis en évidence certaines amorces peuvent être choisies pour détecter des différences comme dans le cadre du

typage du papillomavirus humain (HPV) ou encore pour différencier les virus de l'immunodéficience humaine (HIV) de type 1 et de type 2.

Un premier protocole de PCR a été mis au point. Il correspond à une PCR gigogne ou nested PCR (Renault *et al.*, 1996 ; Renault *et al.*, 2000). Les produits amplifiés en présence du couple d'amorces A3-A4 lors d'une première réaction de PCR sont utilisés pour réaliser une seconde amplification en présence du couple d'amorces A5-A6. Cette méthode de PCR gigogne ou nested PCR permet d'augmenter la sensibilité de la détection du virus dans des échantillons et permet d'assurer une grande spécificité à la réaction. La taille des fragments attendus à la fin de la deuxième réaction est de 940 paires de bases.

Puis, un nouveau protocole a été établi. Il consiste en une PCR simple (Renault *et al.*, 1997 ; Renault and Lipart, 1998). Un seul couple d'amorces (OHV3-OHV4) est alors utilisé afin d'amplifier des séquences cibles connues. Ce protocole permet de limiter les risques de contamination (réaction unique d'amplification) et de limiter l'utilisation des réactifs. Les fragments attendus ont une taille de 896 paires de bases.

D'autres amorces ont été dessinées au niveau de cette zone du génome. Il s'agit des amorces OHV2, OHV6, OHV113 et OHV114. La figure 1 représente la position de ces différentes amorces sur le fragment d'ADN viral de séquence connue de 1089 paires de bases. L'utilisation du couple d'amorces OHV3/OHV114 permet d'abaisser le seuil de détection de l'ADN viral dans l'échantillon (Renault *et al.*, 1997) de manière significative.



**Figure 4** : Position relative des amorces sur le fragment d'ADN viral de 1089 paires de bases

Différents échantillons de larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, présumés infectés par le virus de type herpès et utilisés pour des expériences d'infection expérimentale, ont été contrôlés en PCR. Les différents lots analysés sont répertoriés dans le tableau suivant (Tableau I). Ils sont désignés par des numéros, de 1 à 27. Ils proviennent d'écloseries privées et ont été prélevés entre 1995 et 1999. Ils ont été conservés à - 20°C.

Selon le protocole de PCR utilisé, les résultats obtenus peuvent être différents, c'est le cas pour les échantillons 6, 15, 16, 18 et 23 (Tableau I), soit 18,5 % de résultats discordants. Cependant, ces différences ne sont pas orientées en fonction des couples d'amorces utilisés. En effet, 22 échantillons sur 27 analysés sont trouvés positifs lorsque le protocole de nested PCR (amorces A3-A4 et A5-A6) est utilisé, et 23 sur 27 pour le protocole de simple PCR (amorces OHV3-OHV4). Les résultats discordants pourraient s'expliquer d'une part, par un seuil de détection plus bas pour les amorces OHV3 et OHV4, et, d'autre part, par l'existence d'une diversité au sein des virus de type herpès infectant les huîtres creuses. Des délétions ou substitutions dans le génome viral sembleraient exister et contrarier la reconnaissance de celui-ci particulièrement pour les amorces OHV3 et OHV4.

Tableau I - Résultats des analyses en gel d'agarose à 1% des produits de PCR simple et de nested PCR de lots de larves d'huître creuse

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
OHV3-OHV4	+	+	+	+	+	-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
A3-A4 et A5-A6	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+

- : échantillons négatifs

+ et +/- : échantillons positifs (+/- ou + selon l'intensité des bandes observées en gel d'agarose)

### 3.3. Diversité génétique des virus de type herpès

L'utilisation d'outils moléculaires pour explorer la structure du génome viral a été privilégiée dans la mesure où ces outils existaient déjà au laboratoire IFREMER de La Tremblade.

De façon générale, tout génome est soumis à une série d'événements moléculaires qui le font changer continuellement. Ces événements, mutations, sont une nécessité de la vie qui n'aurait pas pu s'adapter, sans cela, à un environnement changeant au cours du temps. Cette nécessité se heurte à une autre nécessité, l'exigence d'un fonctionnement correct de l'ensemble du génome et, par conséquent, d'une grande stabilité de l'information génétique. C'est pourquoi, les processus de réplication de l'ADN sont fidèles et comportent des systèmes de correction des erreurs qui se sont produits inévitablement. Soumis, de plus à un environnement parfois mutagène (produits chimiques, rayonnement de natures diverses), le génome ne peut réparer toutes les modifications de nucléotides, délétions ou additions qui en

résultent, d'où un certain taux de mutations. Ces mutations ne sont cependant pas le résultat exclusif de ce type d'erreur. Elles sont également la conséquence de mécanismes moléculaires qui apparaissent comme nécessaires à l'évolution du monde vivant. Dans le contexte de notre étude, il s'agit de déterminer s'il existe ou non des variations du génome, constantes selon l'espèce infectée, l'origine géographique de l'hôte ou l'environnement dans lequel se trouve ce dernier.

### 3.3.1. PCR

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) est un moyen d'amplifier un fragment d'ADN de façon spécifique à partir d'une séquence du génome viral. Cette spécificité peut être exploitée pour détecter l'existence d'un polymorphisme. Dans ce cas, on dessine des amorces qui hybrident en différentes régions du génome, ces régions pouvant varier selon les types ou les souches de virus. Ainsi, si la séquence cible présente une délétion ou une addition de nucléotides, on peut obtenir un fragment plus petit ou plus long que celui habituellement obtenu en PCR. Cependant si la délétion ou l'addition est trop importante, si elles se situent au niveau de la zone d'accrochage des amorces, ou s'il s'agit d'une substitution de nucléotides, on n'obtient aucun fragment amplifié alors que l'ADN viral est bien présent. La discrimination de séquences virales variables par cette méthode est fréquemment utilisée, en particulier pour identifier les différents types du papillomavirus humain (HPV) dans l'analyse des biopsies du col de l'utérus (Nuovo *et al.*, 1991 ; Chow *et al.*, 1990) ou encore pour différencier les virus de l'immunodéficience humaine (HIV) de type 1 et de type 2 (Rayfield *et al.*, 1988).

Les échantillons qui présentent des résultats différents selon la technique d'analyse utilisée doivent être étudiés plus précisément en utilisant d'autres couples d'amorces. En effet, il s'agit de déterminer si ces résultats « discordants » résultent d'une insuffisance d'une des techniques de détection utilisée ou s'il existe effectivement une diversité au sein du génome viral. Ainsi, en juin 1997, des mortalités ont pu être observées dans une éclosure française, simultanément chez des larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas* et des larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, âgées de 10 à 13 jours.

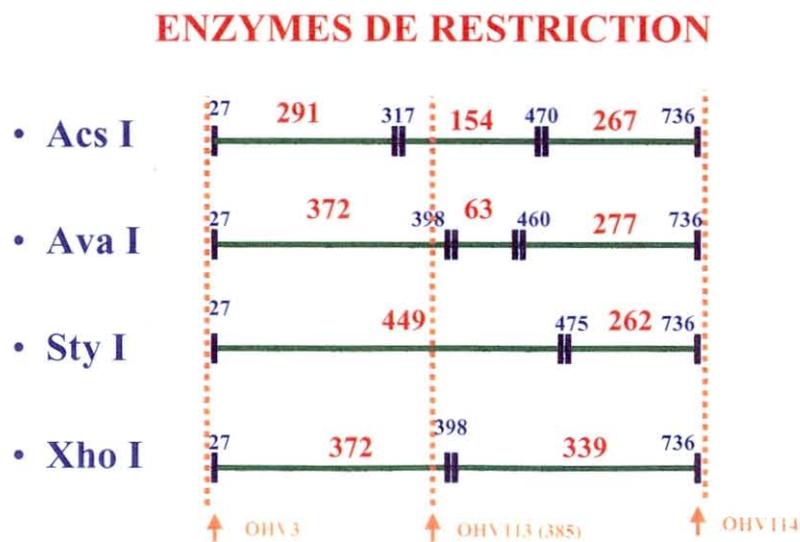
L'analyse en nested PCR (A3-A4 et A5-A6) de trois échantillons de larves des deux espèces a révélé la présence d'ADN viral. Cependant, d'autres analyses effectuées en utilisant le protocole de PCR simple et le couple d'amorces OHV3-OHV4, n'ont pas mis en évidence la présence d'ADN viral chez les larves. Au vu de ces discordances, des analyses en microscopie électronique à transmission ont été réalisées et ont permis de détecter des particules virales chez les larves des deux espèces de bivalve. Ces différences de résultats selon le couple d'amorces utilisé laissent suspecter la présence d'une diversité au sein du génome viral. D'autres amorces ont donc été utilisées afin d'affiner l'étude du génome au niveau du fragment présentant un doute. Il s'agit des amorces OHV113, OHV114, OHV2 et OHV6 présentées sur la figure 1. Les résultats des analyses en PCR sont observés après électrophorèse en gel d'agarose à 1%. L'utilisation des couples d'amorces OHV113-OHV114 et OHV3-OHV114 nous permet d'obtenir des fragments dont la taille est inférieure (environ 100 nucléotides) à la taille du fragment habituellement obtenu. En revanche, aucun fragment n'est obtenu lorsque les couples OHV3-OHV4 et OHV113-OHV4 sont utilisés. D'après ces résultats, il semble qu'il existe une délétion au niveau de la zone entre les amorces OHV113 et OHV114, que l'on retrouve donc au niveau de OHV3-OHV114. De plus, la zone d'accrochage de l'amorce OHV4 doit présenter trop de modifications pour que celle-ci puisse s'y hybrider. Afin de confirmer cette dernière hypothèse, les couples OHV113-OHV2 et OHV113-OHV6 ont été utilisés. Aucune amplification n'est obtenue avec le couple OHV113-

OHV6 alors que deux échantillons sur trois de chaque espèce analysés en présence du couple OHV113-OHV2 laissent apparaître une bande de faible intensité en gel d'agarose. Il existe probablement une variation du génome au niveau de la zone d'accrochage de l'amorce OHV6 qui chevauche de 8 nucléotides le site d'accrochage de l'amorce OHV4. De plus, la faible intensité des bandes observées en gel d'agarose pour les échantillons analysés avec le couple OHV113-OHV2 nous permet également de penser que le site de reconnaissance et d'accrochage de l'amorce OHV2 est modifié. Or ce site présente 16 nucléotides communs avec la zone d'accrochage de OHV4. Nous confirmons ainsi l'existence d'une modification du génome aux environs du site d'accrochage de l'amorce OHV4. Cependant, nous ne pouvons déterminer pour l'instant la nature de cette modification (addition, substitution, délétion de nucléotides).

Nous avons démontré l'existence d'un polymorphisme au niveau de l'ADN viral présent dans les échantillons analysés. Cependant, pour être plus complet, il nous reste à approfondir l'étude de la zone aux environs du site d'accrochage de l'amorce OHV4 et surtout il nous faut séquencer les fragments délétés.

### 3.3.2. PCR-RFLP

Le polymorphisme peut également être appréhendé par digestion de produits de PCR par des enzymes de restriction, des endonucléases. Celles-ci ne peuvent digérer un fragment d'ADN que si celui-ci présente des sites de restriction. On obtient alors un profil de restriction pour chaque enzyme. Si des substitutions, des délétions ou des additions de nucléotides se produisent le fragment n'est pas digéré ou le profil est différent de celui habituellement obtenu. L'analyse par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) est largement utilisée pour le typage des virus et pour explorer l'hétérogénéité de séquence qui peut exister entre des variants séparés épidémiologiquement ou géographiquement. Cette méthode est utilisée par exemple pour différencier les variants du cytomégalovirus humains (CMV) (Zaia *et al.*, 1990) ou les variants du virus Epstein Barr (EBV) (Cen *et al.*, 1991).



**Figure 5** : Position relative des sites de restriction des enzymes utilisées pour la digestion du fragment amplifié par le couple d'amorces OHV3-OHV114

Différentes enzymes ont donc été choisies en fonction des sites de restriction qu'elles reconnaissent dans des fragments du génome du virus de type herpès infectant les bivalves marins. La figure 2 reprend les sites de restriction des enzymes choisies pour digérer le fragment OHV3-OHV114.

Cette technique, la PCR-RFLP, a été choisie plutôt qu'une RFLP réalisée directement sur les ADN génomiques natifs provenant de virus purifié. En effet, la RFLP sans amplification préalable nécessite des quantités importantes d'ADN purifié. Or, il n'existe pas à l'heure actuelle de lignée cellulaire de bivalve, il est donc impossible de cultiver le virus *in vitro* et il est d'autant plus difficile d'obtenir des quantités importantes de particules virales. Même si un protocole de purification a été mis au point (Le Deuff et Renault, 1999), le travail d'obtention d'ADN purifié est lourd et la technique de digestion après amplification par PCR a été préféré.

En ce qui concerne l'hypothèse de la délétion détectée avec les couples OHV113-OHV114 et OHV3-OHV114, des enzymes qui présentent des sites de restriction au niveau des fragments semblant être délétés (figure 2) ont été utilisées. Il s'agit des enzymes XhoI, StyI et AcsI. Pour chaque enzyme un échantillon de chaque espèce, *Crassostrea gigas* et *Ruditapes philippinarum* a été analysé. Les résultats visualisés en gel d'agarose à 1% sont présentés sur la figure 5. Pour chaque enzyme, quelle que soit l'espèce, on obtient au moins un fragment attendu ainsi qu'un fragment de taille inférieure à la taille du fragment attendu. Le tableau II résume les résultats de la digestion du fragment OHV3-OHV114. La délétion semble donc se situer au delà de la position « 475 » qui correspond au site de restriction de l'enzyme StyI. De plus, le fait d'obtenir au moins un fragment de taille attendue permet de confirmer la spécificité des fragments « plus petits » obtenus par amplification avec les couples OHV3-OHV114 et OHV113-OHV114.

	<b>Acs I</b>	<b>Ava I</b>	<b>Sty I</b>	<b>Xho I</b>
<b>Huître</b>	291-154- <267	372	448- <262	372- <339
<b>Palourde</b>	291-154- <267	/	448- <262	372- <339
<b>Témoin</b>	291-154- 267	372-63- 277	449-262	372-339

**Tableau II :** Taille en paires de bases des fragments obtenus par digestion des produits d'amplification par OHV3-OHV114 des échantillons d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, présentant un polymorphisme et d'un témoin.

### 3.3.3. Hybridation moléculaire

Le principe général de la méthode de l'hybridation moléculaire repose essentiellement sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des acides nucléiques et en particulier sur la spécificité de la formation de la structure double brin. Ainsi, une séquence nucléotidique définie peut être utilisée pour identifier un virus avec une très grande spécificité. Toutefois cette spécificité peut varier en fonction des conditions de la réaction d'hybridation. Plus les conditions sont strictes, et plus la spécificité de la réaction est importante. Lorsque les conditions sont optimales, il est possible de distinguer des séquences qui ne diffèrent que par une base (Richman *et al.*, 1991). Ainsi, l'utilisation de sondes préalablement marquées permet de prospector des fragments du génome viral. L'hybridation moléculaire permet également de confirmer ou non la spécificité de fragments obtenus en PCR, par exemple en utilisant la technique de Southern blot (Southern, 1975). La technique d'hybridation *in situ* introduite par les travaux de Gall et Pardue (Gall et Pardue, 1969) repose également sur l'utilisation de sondes marquées spécifiques. Son originalité est d'hybrider directement la sonde avec les acides nucléiques dans les tissus infectés. L'intégrité cellulaire étant conservée, cette technique permet donc de détecter l'agent pathogène, mais aussi de le localiser. De plus, l'utilisation de sondes spécifiques du génome viral peut être appliquée à la détection, voire à l'identification de variants.

Des Southern blots ont ainsi été réalisés. Dans un premier temps, nous avons transféré sur membrane de Nylon des produits de digestion et des produits d'amplification avec les couples OHV3-OHV114 et OHV113-OHV114. Puis, une sonde OHV3-OHV4 marquée à la digoxygénine a été utilisée. L'ensemble des fragments « anormaux » a bien été reconnu par la sonde, mettant ainsi en évidence que ceux-ci sont bien spécifiques, c'est-à-dire qu'ils correspondent bien à un fragment du génome viral.

### 3.4. Conclusion

Nous avons donc pu mettre en évidence un polymorphisme au sein du génome des virus de type herpès infectant les bivalves marins. Cette variation semble être fonction, non pas de l'espèce infectée, mais plutôt de l'origine des prélèvements. Pour compléter ces premiers résultats, des échantillons de coquillages d'espèce et d'origine variées seront analysés à l'aide d'outils moléculaires. En effet, la technique de PCR associée à l'utilisation d'enzymes de restriction et de séquençage est utilisée pour mettre en évidence l'existence de différents virus au sein d'une même famille ainsi que pour leur identification exacte (Schweiger *et al.*, 1994 ; Hirasawa *et al.*, 1995).

L'étude de la diversité présente un intérêt pour la connaissance même des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*. Il est important de rappeler que les virus de type herpès décrits chez les bivalves sont les premiers éléments de cette famille à être rapportés chez les Invertébrés.

D'autre part, l'existence d'une diversité au sein de ces virus conditionne le diagnostic de l'infection. En effet, s'il existe une hétérogénéité, le diagnostic reposera sur l'utilisation de sondes ou d'amorces reconnaissant les zones non variables du génome. Au contraire, si l'objectif est plutôt de distinguer les différents virus, le diagnostic reposera sur l'utilisation d'outils spécifiques des zones variables du génome. De plus, l'existence d'une diversité présente un intérêt évident et peut conditionner les techniques d'élevage ainsi que les transferts d'animaux. Dans ce cas, l'élevage concomitant d'espèces différentes est à éviter et

se pose également le problème des échanges d'animaux entre différents bassins ou pays producteurs de bivalves et de leur contrôle. Enfin, cette approche s'intègre dans un cadre beaucoup plus large, celui de la coévolution entre les hôtes et les pathogènes.

#### IV. - BIBLIOGRAPHIE

- Barnabé G. (1986). Aquaculture. Lavoisier 1, 1-424.
- Buroker N.E., Chanley P., Cranfield H.J. et Dinamani P. (1983). Systematic status of two oyster populations of the genus *Tiostrea* from New Zealand and Chile. Mar. Biol. 77, 191-200.
- Cen H., Breinig M.C., Atchison R.W., Ho M. et McKnight J.L. (1991). Epstein-Barr virus transmission via the donor organs in solid organ transplantation : polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of IR2, IR3 and IR4. J. Virol. 65(2), 976-980.
- Chow V.T., Tham K.M. et Bernard H.U. (1990). Thermus aquaticus DNA polymerase-catalysed chain reaction for the detection of papillomaviruses. J. Virol. Methods. 27(1), 101-112.
- Comps M. et Cochenec N. (1993). A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis*. J. Inv. Pathol. 62.
- Farley C.A., Banfield W.G., Kasnic J.R.G. et Foster W.S. (1972). Oyster herpes-type virus. Science, Wash. D.C. 178, 759-760.
- Gall G. et Pardue M.L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Pro. Nantl. Acad. Sci. USA 63, 378-381.
- Hine P.M., Wesney B. et Hay B. E. (1992). Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Dis. aquat. Org. 12(2), 135-142.
- Hine P.M. et Thorne E.T. (1997). Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi* (Sowerby, 1871) : an ultrastructural study. Dis. aquat. Org. 29(3), 197-204.
- Hine P.M., Wesney B. et Besant P. (1998). Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. Dis. aquat. Org. 32, 161-171.
- Hirasawa T., Yono K. et Mikazuki K. (1994). Differentiation of wild- and vaccine-type canine parvoviruses by PCR and restriction-enzyme analysis. J. Vet. Med. 42, 601-610.
- Le Deuff R.-M. (1995). Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux *Iridoviridae* et aux *Herpesviridae*. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux II, pp. 234.
- Le Deuff R.-M. Renault T. (1999) Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the japanese oyster, *C. gigas*. J Gen Virol 80:1317-1322
- Le Deuff R.-M., Renault T. et 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.
- Le Deuff R.-M., Nicolas J.-L., Renault T. et Cochenec N. (1994). Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 142(2), 69-72.
- Nicolas J.-L., Comps M. et Cochenec N. (1992). Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12(1), 11-13.

- Nuovo G.J., Darfler M.M., Impraim C.C. et Bromley S.E. (1991). Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions. Analysis by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* 138(1), 53-58.
- Rayfield M., De Cock K., Heyward W., Goldstein L., Krebs J., Kwok S., Lee S., McCormick J., Moreau J.M., Odehouri K *et al.* (1988). Mixed human immunodeficiency virus (HIV) infection in an individual: demonstration of both HIV type 1 and type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 158(6), 1170-1176.
- Renault T. (1998). Infections herpétiques chez les invertébrés : détection de virus de type herpès chez les mollusques bivalves marins. *Virologie* 2, 401-403.
- Renault T., Cochenec N., Le Deuff R.-M. et Chollet B. (1994a). Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 14(2), 64-66.
- Renault T., Le Deuff R.-M., Cochenec N. et Maffart P. (1994b). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France – Comparative study. *Revue Méd. Vét.* 145(10), 735-742.
- Renault T., Le Deuff R.-M., Lipart C., Delsert C. (2000) Development of a PCR procedure for the detection of an herpes-like virus infecting oysters in France. *J Virol Meth* 88:41-50
- Renault T., Le Deuff R.-M., Cochenec N., Chollet B. et 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, 539-543.
- Renault T., Le Deuff R.-M., Lipart C., Chollet B. et Haffner P. (1996). Synthèse des résultats obtenus concernant l'étude du virus de type herpès et la mise au point de méthodes de diagnostic de l'infection - Juin/septembre 1996. Note IFREMER.
- Renault T., Le Deuff R.-M., Lipart C., Chollet B. et Haffner P. (1997). Programme herpèsvirus : Synthèse des travaux réalisés au laboratoire IFREMER de La Tremblade - Mars 1996/février 1997. Note IFREMER.
- Richman D.D., Guatelli J.C., Grimes J., Tsiatis A. et Gingeras T. (1991). Detection of mutations associated with zidovudine resistance in human immunodeficiency virus by use of the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 164(6), 1075-1081.
- Roizman B. et Batterson W. (1985). Herpesviruses and their replication. In : *Virology*, ed. : Fields B.N. *et al.*, Raven Press, New York, 497-526.
- Sanger F., Nicklen S. et Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5462-5467.
- Schweiger B., Schreier B., Böthig B. et Lopez-Pila J.M. (1994). Differentiation of vaccine and wild-type polioviruses using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Arch. Virol.* 134, 39-50.
- Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503.
- Zaia J.A., Gallez-Hawkins G., Churchill M.A., Morton-Blackshere A., Pande H., Adler S.P., Schmidt G.M. et Forman S.J. (1990). Comparative analysis of human cytomegalovirus a-sequence in multiple clinical isolates by using polymerase chain reaction fragment length polymorphism assay. *J. Clin. Microbiol.* 28(12), 2602-2607.

## V. - PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS, POSTERS ET POSTERS

### V. 1. - Publications

- Le Deuff R.-M., Renault T. (1999) Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the japanese oyster, *C. gigas*. J Gen Virol 80:1317-1322
- Renault T. (1998) Infections herpétiques chez les invertébrés : détection de virus de type herpès chez les mollusques bivalves marins. Virologie 2:401-403
- Renault T., Lipart C. (1998) Diagnosis of herpes-like virus infections in oysters using molecular techniques. European Aquaculture Society, Special Publication 26:235-236
- Renault T., Le Deuff R.-M., Lipart C., Delsert C. (2000) Development of a PCR procedure for the detection of an herpes-like virus infecting oysters in France. J Virol Meth 88:41-50

### V. 2. – Communications

- Arzul I., Renault T, Lipart C. (1999) Herpes-like virus diversity in marine bivalves. 9<sup>th</sup> International Conference « Diseases of Fish and Shellfish », 19-24<sup>th</sup> September 1999 ; Rhodes, Hellas. Abstract book: O-103
- Renault T, Arzul I., Lipart C. (1999) Development of an internal standard for PCR detection of herpes-like virus infecting bivalves. 9<sup>th</sup> International Conference « Diseases of Fish and Shellfish », 19-24<sup>th</sup> September 1999 ; Rhodes, Hellas. Abstract book: O-104

### V. 3. - Posters

- Arzul I., Lipart C., Renault T (2000) Herpesvirus de l'huître : deux espèces différentes de bivalve marin infectées par un même variant. Journées Francophones de Virologie, 6-7 avril 2000, Paris
- Renault T, Lipart C., Arzul I. (2000) Construction et utilisation d'un standard interne dans le cadre de la détection par PCR de virus de type herpès chez les huîtres. Journées Francophones de Virologie, 6-7 avril 2000, Paris