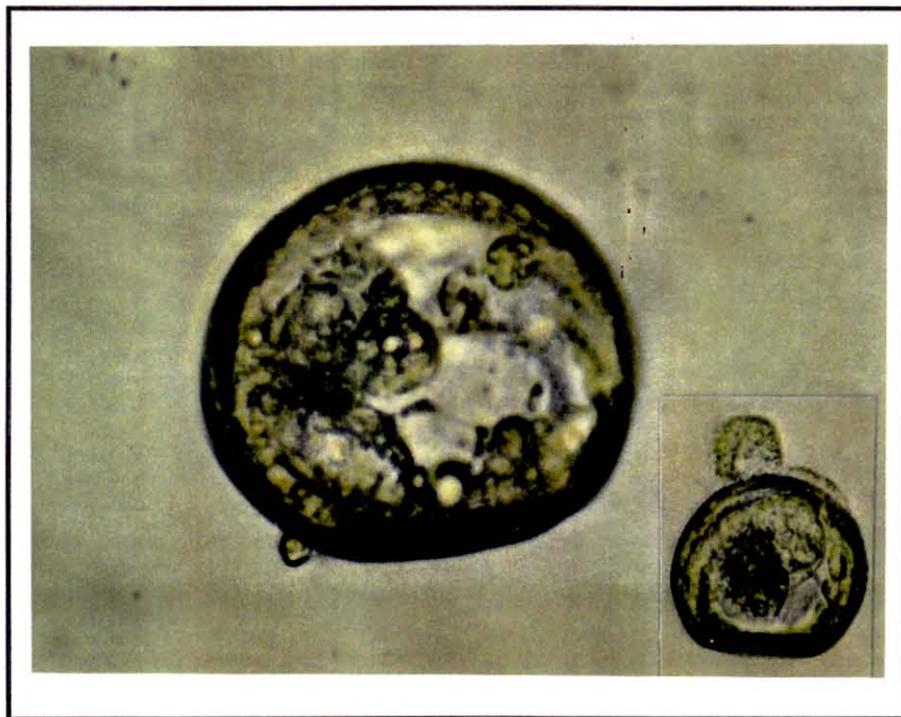


Université de Bretagne Occidentale
Institut Européen de la Mer

Diplôme d'Etudes Approfondies d'Océanologie Biologique,
Option Ressources Vivantes et Ecosystèmes Côtiers

Isabelle ARZUL

**TRANSMISSION EXPERIMENTALE DU VIRUS DE TYPE
HERPES CHEZ L'HUÎTRE CREUSE, CRASSOSTREA GIGAS.**



Stage effectué au Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
des invertébrés marins, B.P. 133-17390 La Tremblade,
sous la direction de Tristan Renault

Février-Août 1998



IFREMER

The IFREMER logo features a stylized, pixelated graphic of a fish or a similar marine organism to the left of the word 'IFREMER' in a bold, sans-serif font. The logo is positioned on a yellow horizontal bar that spans the width of the page.

SOMMAIRE

<i>INTRODUCTION</i>	1
<i>GENERALITES</i>	
I/ CARACTERISTIQUES COMMUNES AUX VIRUS APPARTENANT A LA FAMILLE DES <i>HERPESVIRIDAE</i>	
A/ Propriétés structurales	2
B/ Réplication	3
C/ Propriétés biologiques	4
II/ INFECTIONS A VIRUS DE TYPE HERPES OBSERVEES CHEZ LES HUITRES	
A/ Etiologie	6
B/ Aspects épidémiologiques	6
C/ Symptômes et lésions	7
D/ Diagnostic	7
<i>MATERIEL ET METHODES</i>	
I/ MATERIEL BIOLOGIQUE	
A/ Larves infectées	8
B/ Larves axéniques	8
C/ Larves conventionnelles	9
D/ Naissain	9
II/ PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	
A/ Reproduction de l'infection sur larves axéniques	10
1 - Réalisation d'un ultrafiltrat de broyat de larves infectées	10
2 - Inoculation du surnageant de broyat de larves infectées ultrafiltré	10
3 - Suivi de l'infection	10
4 - Récupération des larves	11

B/ Reproduction expérimentale de l'infection à virus de type herpès au stade naissain	11
1 - Obtention de larves axéniques expérimentalement infectées	12
2 - Infection expérimentale des larves conventionnelles	12
3 - Infection du naissain	12
4 - Suivi des élevages et prélèvements	12
III/ TECHNIQUES D'ANALYSE	
A/ Microscopie électronique	13
B/ Polymerase Chain Reaction (PCR)	13
1 - Description du protocole général de PCR	14
2 - Mise en œuvre de la réaction de PCR	15
3 - PCR appliquée à la détection de l'ADN du virus de type herpès de l'huître	15
<i>RESULTATS</i>	
I/ CONTROLE EN PCR DES LOTS DE LARVES SERVANT AUX EXPERIENCES	17
II/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR LARVES AXENIQUES	18
III/ ESSAIS DE REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR NAISSAIN	22
<i>DISCUSSION</i>	
I/ CONTROLE EN PCR DES LOTS SERVANT AUX EXPERIENCES	25
II/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR LARVES AXENIQUES	26
III/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR NAISSAIN	27
<i>CONCLUSION</i>	29
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	30
<i>ANNEXES</i>	32

INTRODUCTION

Au cours de l'été 1991, d'importantes mortalités de larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été observées dans des écloseries, simultanément en France (Comps et Cochenec, 1993) et en Nouvelle-Zélande (Hine *et al.*, 1992).

Les examens histologiques ainsi que des examens réalisés en microscopie électronique à transmission d'échantillons de larves présentant des mortalités ont permis de détecter la présence de particules virales associées à des lésions cellulaires.

D'après la morphologie, la taille, les localisations intranucléaires et cytoplasmiques du virus, il est possible d'envisager son appartenance à la famille des *Herpesviridae*.

De nouvelles mortalités sporadiques ont été observées au cours des étés suivants sur des lots de larves élevées en écloserie, mais également sur des lots particuliers de naissain de captage naturel ou provenant d'écloseries et de nurseries (Renault *et al.*, 1994). De plus, des mortalités concomitantes ont été rapportées pour des larves et des lots de naissain chez les deux espèces *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*, élevées dans les mêmes installations avec détection, chez ces deux espèces, d'un virus de type herpès (Renault, communication personnelle).

Il est possible d'associer les mortalités de larves et de naissain à la présence du virus, mais pour l'instant, la reproduction expérimentale des mortalités sur individus sains à partir de matériel biologique infecté n'a pu être réalisée que sur des larves (Le Deuff *et al.*, 1994). Le postulat de Koch reste donc à vérifier en ce qui concerne le naissain. Cependant, des premiers essais réalisés en 1996 laissent supposer la possible transmission du virus, en conditions expérimentales, à des animaux indemnes à ce stade de développement.

Après des rappels concernant les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*, nous ferons le point sur les connaissances relatives aux virus de type herpès infectant les huîtres.

Le travail expérimental ayant fait l'objet de ce stage comprend trois parties. Tout d'abord, il s'agissait d'infecter des larves d'huître creuse obtenues dans des conditions stériles, à partir d'un broyat de larves infectées. Puis, les larves axéniques, alors infectées, étaient mises en contact avec des larves d'huître creuse élevées en conditions non stériles (larves conventionnelles), celles-ci étant enfin utilisées pour infecter du naissain d'huître creuse.

GENERALITES

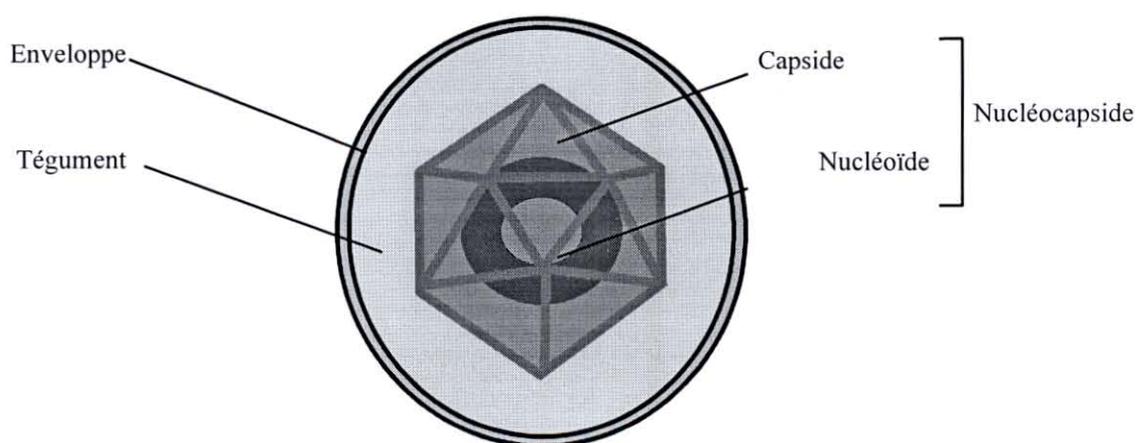
I/ CARACTERISTIQUES COMMUNES AUX VIRUS APPARTENANT A LA FAMILLE DES *HERPESVIRIDAE*

A/ Propriétés structurales

Les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* présentent une structure complexe qui peut être divisée en quatre éléments (cf. figure 1) :

- * Le nucléoïde correspond à l'assemblage de l'ADN viral et de protéines. L'ADN est double brin et linéaire, d'une taille comprise entre 120 et 220 kpb.
- * La capside contient le nucléoïde. Elle est constituée de 162 capsomères et présente une symétrie isocaédrique.
- * Le tégument correspond à la structure fibreuse située entre la capside et l'enveloppe.
- * L'enveloppe est indispensable à l'infectiosité des particules virales. Elle confère une morphologie sphérique et dérive de membranes cellulaires modifiées par l'insertion de protéines virales ainsi que de lipides.

Figure 1 - Structure d'une particule virale de type herpès (d'après Renault *et al.*, 1997).



B/ Réplication

Le cycle de réplication peut être décrit comme suit :

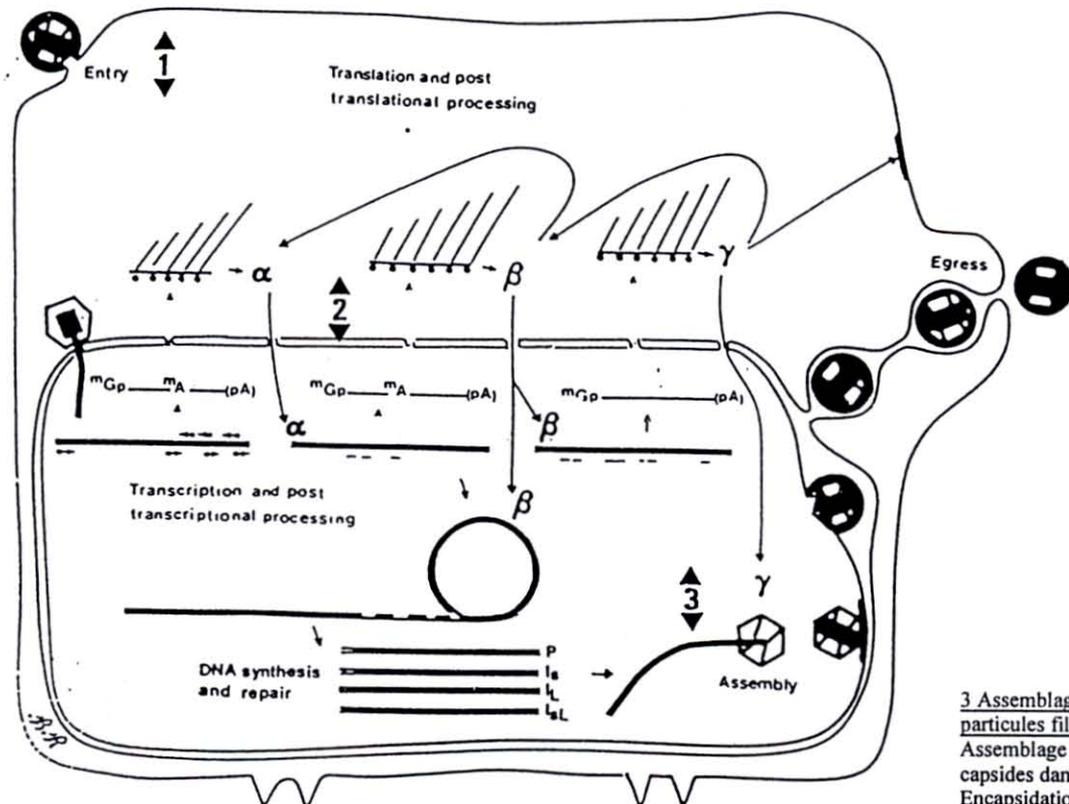
Figure 2 - Cycle de réplication des *herpesviridae* (d'après Roizman *et al.*, 1985).

1 Entrée du virus dans la cellule

Attachement virus-récepteurs cellulaires
Fusion des membranes cellulaire et virale
Entrée des nucléocapsides dans le cytoplasme
et transport jusqu'aux pores nucléaires
Pénétration par phénomènes actifs de l'ADN viral dans le noyau

2 Synthèses virales

Transcription de l'ADN viral dans le noyau par l'ARN polymérase II de la cellule
Synthèse de protéines virales très précoces, précoces et tardives à partir des ARNm dans le cytoplasme de la cellule hôte
Réplication précoce de l'ADN viral dans le noyau des cellules infectées



3 Assemblage et libération des particules filles

Assemblage et accumulation des capsides dans le noyau
Encapsidation de l'ADN dans le noyau
Attachement des nucléocapsides à des zones particulières de la surface interne du noyau
Passage dans le cytoplasme
Libération des particules à partir de la cellule infectée

Signalons également que les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* ont la capacité de persister sous forme latente pendant toute la vie de l'hôte. Il y a alors absence de production de particules virales. L'ADN viral est soit intégré au génome de la cellule hôte, soit présent sous forme circulaire libre dans le noyau.

L'infection latente par les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* est en général localisée dans un type cellulaire particulier (cf. Tableau I). Enfin, le virus peut être réactivé sous l'effet de conditions stressantes ou suite à l'action de composés chimiques, d'hormones ou autres molécules biologiques.

C/ Propriétés biologiques

Il existe plus de 80 virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*. De nombreuses espèces animales sont infectées par ce type de virus, que ce soit les primates dont l'homme, les mammifères domestiques, les oiseaux, les poissons ou les batraciens.

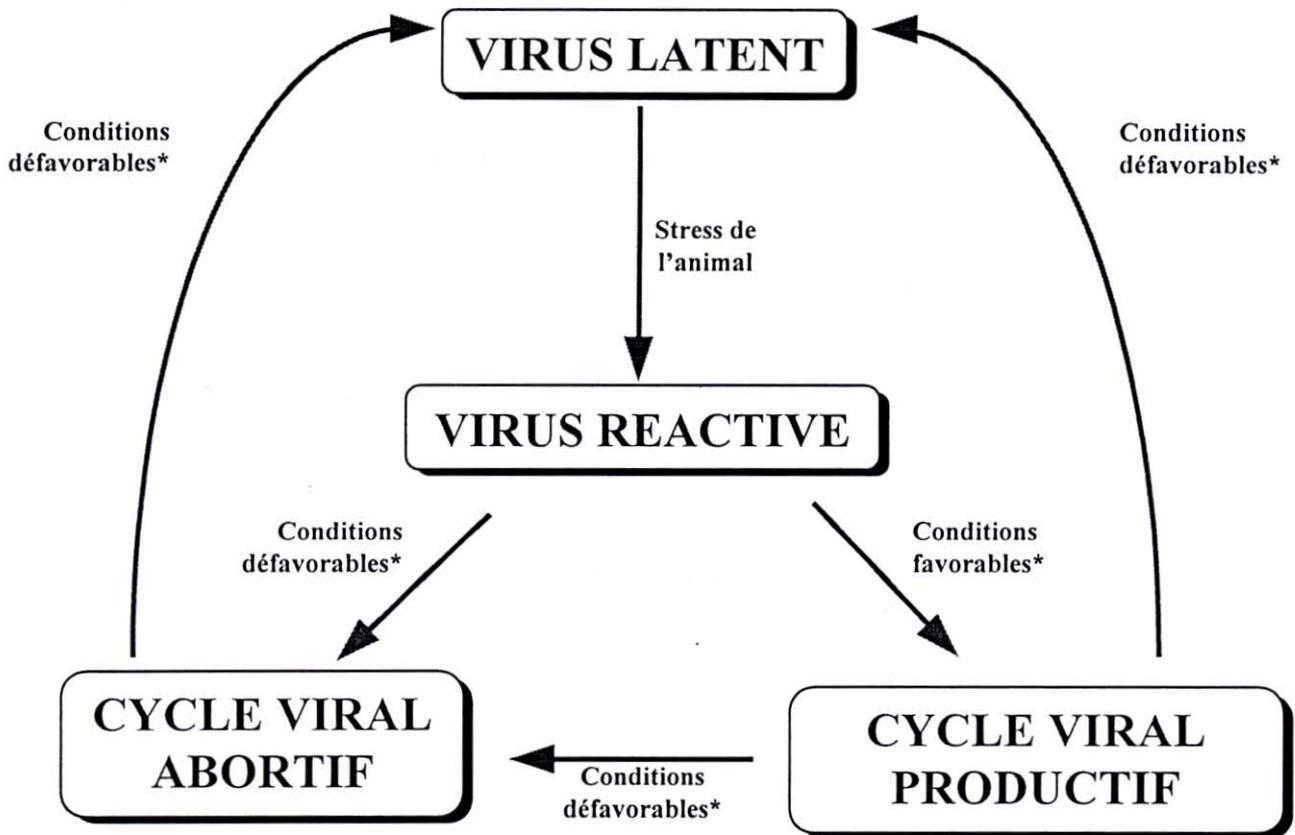
On classe les virus de cette famille en trois sous-familles selon leurs propriétés biologiques : *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae*.

Le tableau suivant résume les critères de classification et donne quelques exemples.

Tableau I - Caractères généraux des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*.

	<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Gammaherpesvirinae</i>
Variabilité d'hôte	+++	+	-
Cycle de multiplication	Court	Long	Variable
Développement <i>in vitro</i>	Rapide	Lent- Cytomégalie	Propriétés oncogènes Réplication dans les cellules lymphoblastoïdes et cycle lytique dans certaines cellules épithélioïdes et fibroblastiques
Infection latente	Souvent au niveau des ganglions nerveux	Glandes sécrétrices, reins, lymphocytes	Tissus lymphoïdes, lymphocytes
Quelques exemples de virus	<u>Homme</u> Herpes Simplex Virus (HSV1, HSV2) Varicella Zoster Virus (VZV) <u>Bovins</u> Bovine Mamillitis Virus <u>Porc</u> Pseudorabies Virus (maladie d'Aujeszky) <u>Equidés</u> Equine Herpesvirus-1 <u>Poissons</u> Chanel Catfish Virus (CCV)	<u>Homme</u> Cytomégalovirus (CMV) <u>Souris Murine</u> Cytomégalovirus	<u>Homme</u> Epstein Barr Virus (EBV) Herpesvirus humain type 8 (HHV8) <u>Poulet</u> Marek's Disease Virus <u>Primates</u> Herpesvirus Ateles Herpesvirus Saimiri

Par ailleurs, le cycle viral des *Herpesviridae* peut être représenté de la manière suivante :



*Conditions favorables/défavorables pour le virus

Figure 3 - Cycle viral des *Herpesviridae* (d'après Renault *et al.*, 1997).

La latence permet au virus de persister dans l'organisme infecté à l'abri de la réponse immunitaire alors que le cycle viral productif conduit à la mort cellulaire. Au préalable, le nucléole augmente de taille et se retrouve contre la membrane nucléaire, la chromatine se marginalise, puis le noyau change de forme, présentant alors des excroissances. Enfin, les altérations touchent le réticulum endoplasmique et la membrane cytoplasmique, aboutissant à la mort cellulaire. Le cycle viral abortif n'autorise pas la réplication virale, la cellule reste donc indemne.

II/ INFECTIONS A VIRUS DE TYPE HERPES OBSERVEES CHEZ LES HUITRES

A/ Etiologie

Les particules virales observées chez plusieurs espèces de bivalves marins présentent les mêmes caractéristiques que les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*. De plus, le tropisme apparent des virus détectés pour les cellules de type fibroblastique pourrait laisser penser qu'ils appartiennent à la sous-famille des *Betaherpesvirinae*.

En microscopie électronique à transmission, les particules virales présentent des morphologies différentes selon leur localisation :

- ❖ Les particules virales intranucléaires ont un diamètre de 72-75 nm. Elles peuvent être vides (capsides), ou elles contiennent un nucléoïde, il s'agit alors de nucléocapsides.
- ❖ Les particules intracytoplasmiques mesurent en moyenne 105 nm et possèdent une enveloppe dérivée de la membrane nucléaire des cellules infectées.
- ❖ Les virions en position extracellulaire sont également enveloppés et peuvent présenter des prolongements à leur surface, voire une queue. Ils possèdent un diamètre d'environ 120 nm.

B/ Aspects épidémiologiques

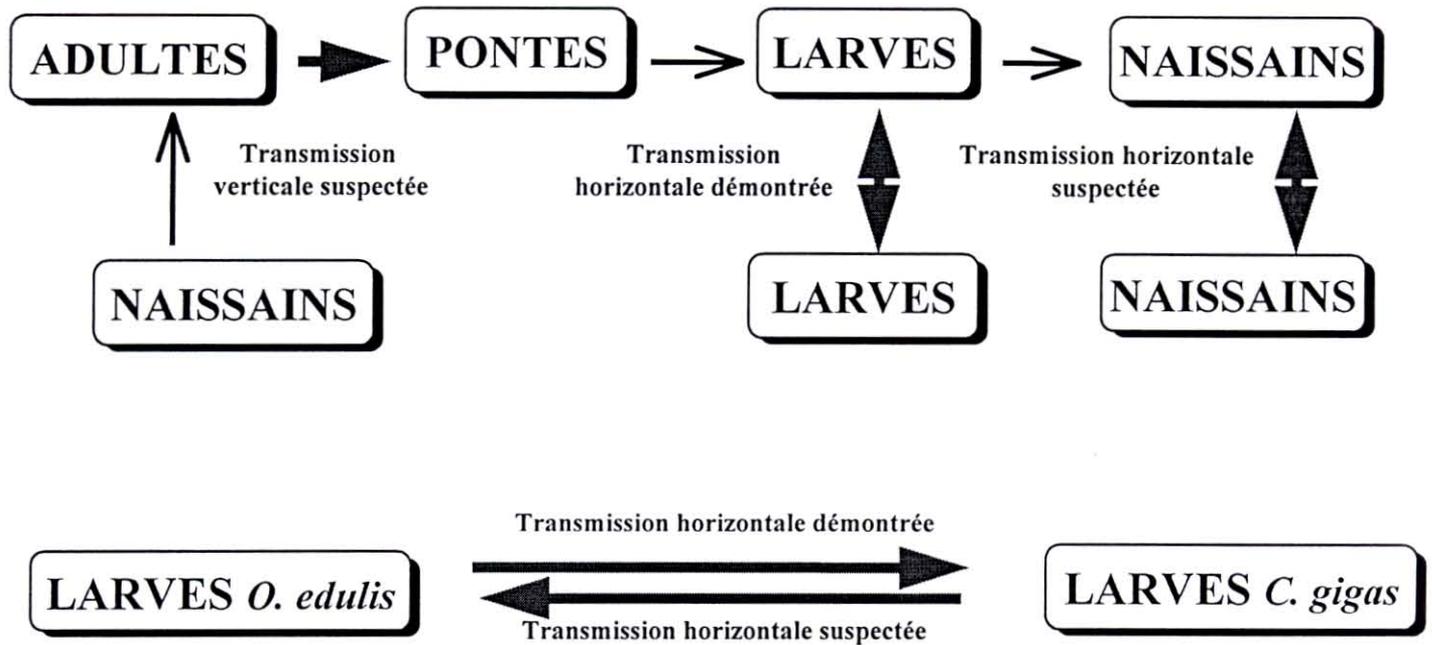
Concernant l'épidémiologie de l'infection, peu de données sont à l'heure actuelle disponibles pour les virus de type herpes infectant les huîtres.

Chez les mollusques bivalves marins, plusieurs descriptions d'infection par des virus de type herpes ont été rapportées chez des adultes d'huître américaine, *Crassostrea virginica*, (Farley *et al.*, 1972), chez des larves et du naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, (Hine *et al.*, 1992 ; Nicolas *et al.*, 1992 ; Renault *et al.*, 1994) et chez le naissain d'huître plate, *Ostrea edulis*, (Comps et Cochenec, 1993). Signalons également que des mortalités de larves de palourde, *Ruditapes decussatus*, ont pu être associées à la détection d'ADN viral de type herpes, mais également à l'observation de particules virales en microscopie électronique à transmission (Renault, communication personnelle).

Les mortalités massives et brutales d'huîtres apparaissent le plus généralement pendant les périodes chaudes de l'année ou en eau chauffée à 25-30°C (Farley *et al.*, 1972 ; Le Deuff *et al.*, 1996).

Il a été démontré qu'il existait bien une transmission horizontale, d'une part entre larves infectées et saines de *C. gigas* (Le Deuff *et al.*, 1994) et d'autre part entre larves d'*O. edulis* infectées et larves saines de *C. gigas* (Le Deuff, 1995). De plus, l'existence d'une transmission verticale est fortement suspectée (Le Deuff, 1995), (cf. figure 4).

Figure 4 - Modes de transmission de l'infection à virus de type herpès chez les huîtres (d'après Renault *et al.*, 1997).



C/ Symptômes et lésions

Les larves infectées cessent de se nourrir et de nager et des mortalités significatives sont observées à partir du 6ème jour suivant la ponte, 100% de mortalité sont généralement atteints entre le 8ème et le 10ème jour. Cependant, les mortalités peuvent être plus précoces et survenir dès le 4ème jour.

Les larves présentent d'importantes lésions du velum. Celui-ci apparaît nécrosé chez un grand nombre d'individus et des cellules hypertrophiées se détachent et peuvent apparaître libres dans l'eau d'élevage. Des lésions peuvent être observées sur coupes histologiques : elles sont principalement localisées au niveau du tissu conjonctif (cellules de type fibroblastique) et plus rarement au niveau de l'épithélium du velum et du manteau. Les lésions nucléaires sont caractéristiques des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* : certains noyaux sont hyperbasophiles et très condensés, d'autres hypertrophiés présentent une marginalisation de la chromatine. Elles sont associées à des images de nécrose dans le cas d'infections avancées.

D/ Diagnostic

Une des difficultés de l'étude de ce virus réside dans l'impossibilité de le cultiver *in vitro*. En effet, aucune lignée de mollusques bivalves n'est aujourd'hui disponible. De plus, nous l'avons déjà mentionné, les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* peuvent exister sous diverses formes dans la cellule hôte : forme latente, infection peu productive ou infection aiguë.

Le diagnostic de l'infection à virus de type herpès chez l'huître repose à l'heure actuelle sur l'histologie (élément d'orientation) et sur la microscopie électronique à transmission, qui ne peut cependant être considérée comme une technique de diagnostic de routine, ainsi que sur la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) qui utilise des amorces nucléiques spécifiques. L'histologie classique permet d'observer des anomalies nucléaires chez les animaux infectés, les réactions inflammatoires étant en général limitées. Cependant, ces observations ne permettent pas de conclure à la présence du virus, elles ne sont effectivement pas spécifiques de cette infection.

MATERIEL ET METHODES

I/ MATERIEL BIOLOGIQUE

Le terme «larve» est utilisé pour décrire le stade embryonnaire caractérisé par une vie libre hors de l'œuf. Ce stade précède la métamorphose, qui correspond chez les mollusques bivalves marins à l'étape de fixation (21 jours), étape au cours de laquelle la larve perd son velum et donc son activité de nage. On parle alors de naissain (juvéniles).

A/ Larves infectées

Des échantillons de larves contrôlés comme infectés par le virus de type herpès (microscopie électronique et PCR), sont conservés congelés à -20°C.

A chaque essai, la quantité de matériel infecté nécessaire est prélevée et décongelée. Les lots principalement utilisés proviennent d'une écloserie professionnelle située dans la baie de Bourgneuf (85). Ils sont conservés au congélateur depuis juillet 1995. Ces lots ont été choisis parmi d'autres lots contrôlés comme positifs en microscopie électronique à transmission, sur l'observation macroscopique de larves expérimentalement infectées par ces lots (Séverin, 1996), à savoir la sédimentation après 48 heures d'élevage et l'observation de lésions du velum. Donc, non seulement la présence du virus a été confirmée en PCR, mais ces échantillons ont conservé leur virulence, c'est-à-dire leur pouvoir d'infection.

B/ Larves axéniques

La ponte, c'est à dire l'obtention d'œufs fécondés, est réalisée en conditions stériles. Les géniteurs, qui proviennent de l'écloserie IFREMER de Ronces les Bains ou de différentes entreprises ostréicoles de La Tremblade, sont tout d'abord brossés sous l'eau courante, rincés à l'alcool à 70° et séchés sous hotte à flux laminaire.

Puis, on procède à l'ouverture des huîtres avec un couteau stérilisé à l'alcool. Les animaux sont rincés successivement avec de l'eau de mer filtrée à 0,22 µm, autoclavée et additionnée de 0,1 % Tween 80 (Polyoxyéthylène Sorbitan Mono-Oléate), puis avec de l'eau de mer filtrée à 0,22 µm et autoclavée. Afin d'identifier les individus mâles et femelles, des gamètes prélevés avec la pointe d'un scalpel sont observés au microscope photonique en présence d'une goutte d'eau de mer. Seuls les individus possédant des gamètes en bon état (mobilité des spermatozoïdes, ovocytes en forme de poire, et peu de bactéries à l'observation au microscope photonique) sont sélectionnés et décontaminés avec de la Bétadine (un rinçage rapide, un contact de dix minutes suivi d'un autre rinçage rapide). Après scarification de la gonade pour chaque géniteur, les gamètes sont récupérés par aspiration à l'aide d'une pipette stérile de 1 ml. Ils sont ensuite déposés dans un Erlen Meyer contenant 300 ml d'eau de mer filtrée à 0,22 µm et autoclavée.

Dix millilitres de spermatozoïdes sont mis en contact avec 300 ml d'une suspension d'ovules pendant 20 minutes. Des œufs fécondés sont ainsi obtenus. Ils sont distribués, toujours sous hotte à flux laminaire, dans des ballons ou des fioles contenant de l'eau de mer stérile (filtrée à 0,22 µm et autoclavée), complétée en antibiotiques (1ml par litre d'eau d'élevage des solutions suivantes : Pénicilline G à 100 U/ml, Streptomycine à 0,1 mg/ml, Fluméquine à 0,03 mg/ml, Kanamycine à 0,1 mg/ml, Acide oxolinique à 0,1 mg/ml et Erythromycine à 0,1 mg/ml). Les larves axéniques sont

maintenues à une température de 25-26°C, sans bullage et sans apport de nourriture. Elles se développent normalement jusqu'au stade de larves D et peuvent survivre dans ces conditions plus de quinze jours après la fécondation.

C/ Larves conventionnelles

L'obtention des larves conventionnelles se fait en utilisant un protocole identique à celui retenu pour la production de larves axéniques, mais sans prendre les mêmes précautions. Les larves obtenues sont mises en élevage dans des bacs cylindro-coniques contenant 120 litres d'eau de mer filtrée à 10 µm sans apport de nourriture. On y entretient un bullage et la température est maintenue à 25-26°C. Ces bacs se situent dans une salle réservée aux essais de pathologie expérimentale.

D/ Naissain

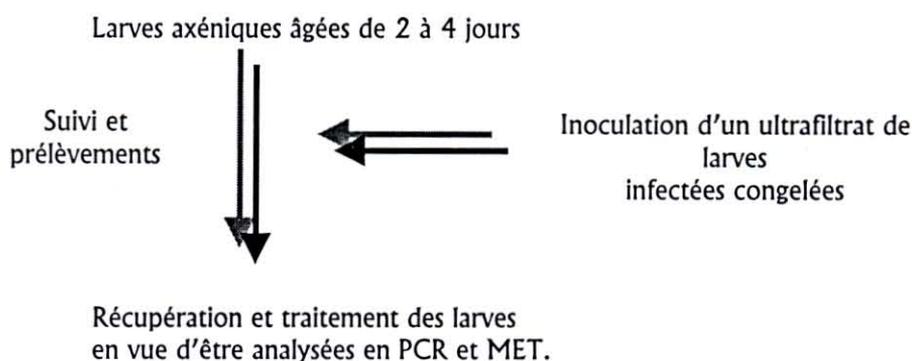
Le naissain utilisé correspond à des productions 1997 et 1998 d'une éclosérie située à Bouin (Baie de Bourgneuf, 85). Les animaux produits en 1997 ont été mis sur estran en juillet de la même année dans la baie de Penbé (56), tandis que les productions 1998 proviennent directement de l'éclosérie-nurserie professionnelle. Les animaux sont répartis, à raison de 100 individus par bac de 10 litres pour le naissain produit en 1998, et à raison de 20 individus par bac de 50 litres pour les animaux de 1997. Ces bacs se situent dans une salle réservée aux essais de pathologie expérimentale. Ces animaux sont progressivement acclimatés à une température de 26-27°C pour la moitié des individus et à une température de 21-24°C pour l'autre moitié. Un bullage y est assuré. De plus, les huîtres reçoivent quotidiennement un mélange d'algues phytoplanctoniques (*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*). L'eau d'élevage, filtrée à 10 µm n'est pas renouvelée au cours de l'élevage. Cependant, de l'eau douce est ajoutée régulièrement dans les bacs afin de maintenir une salinité de 35-37⁰/₀₀.

II/ PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

A/ Reproduction de l'infection sur larves axéniques

Le principe de l'expérience consiste à induire des mortalités sur des larves axéniques en les infectant avec un ultrafiltrat de broyat de larves infectées, conservées congelées. Un suivi des mortalités est assuré régulièrement, l'eau d'élevage et les larves sont analysées en PCR et en microscopie électronique à transmission (MET).

Les manipulations sont effectuées sous hotte à flux laminaire.



1 - Réalisation d'un ultrafiltrat de broyat de larves infectées

De 130 à 400 mg de larves infectées par le virus de type herpès sont décongelés et broyés au Potter dans 5 ml d'eau de mer stérile. On ajoute de l'eau de mer filtrée et autoclavée afin d'obtenir un volume final de 20 ml. Après broyage, la suspension est centrifugée à 2000 tours par minute pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est alors récupéré et filtré à 0,45 μm , puis à 0,22 μm .

2 - Inoculation du surnageant ultrafiltré de broyat de larves infectées

Les larves axéniques sont distribuées, à raison de 100 à 300 larves par ml, dans des ballons de deux litres contenant un litre d'eau de mer filtrée à 0,22 μm et autoclavée, complétementée en antibiotiques (Fluméquine à 0,03 mg/l, Pénicilline G à 100 U/l, Streptomycine à 0,1 mg/l, Acide oxolinique à 0,1 mg/l, Kanamycine à 0,1mg/l et Erythromycine à 0,1mg/l; ces concentrations correspondent aux concentrations finales dans les ballons d'élevage). Une partie des ballons est inoculée avec environ 8 ml du surnageant ultrafiltré de broyat de larves infectées, tandis que les autres ballons servent de témoins négatifs. Ces derniers reçoivent un volume équivalent d'eau de mer filtrée stérile.

3 - Suivi de l'infection

L'objectif de ces expériences est de vérifier la conservation du pouvoir infectieux du virus pour les lots de larves infectées utilisés et de suivre l'évolution de l'infection virale chez les larves.

Dans ce dessein, des prélèvements sont effectués :

- ❖ 1 ml du broyat dans le Potter
- ❖ 1ml du surnageant après centrifugation
- ❖ 1 ml d'ultrafiltrat après filtration à 0,45 μm
- ❖ 1 ml d'ultrafiltrat après filtration à 0,22 μm
- ❖ 1 ml d'eau de mer dans chaque ballon immédiatement après inoculation du broyat.

Les larves sont observées quotidiennement au microscope photonique à l'aide d'une cellule de comptage (Sedgewick-Rafter) afin de suivre leur développement et l'apparition d'éventuelles lésions.

4 - Récupération des larves

A la fin de l'expérience, le contenu des ballons est récupéré selon le protocole suivant : si l'ensemble des larves n'est pas sédimenté, le contenu des ballons est filtré à 20 μm , sinon, le fond du ballon est aspiré directement et centrifugé dans des tubes de 45 ml à 3500 tours par minute pendant 15 minutes à 4°C. Après cette première centrifugation, 1 ml de surnageant est prélevé (surnageant 1). Le surnageant est ensuite éliminé et les larves au culot sont récupérées dans 45 ml d'eau de mer filtrée stérile. Les larves sont à nouveau centrifugées 2000 tours par minute pendant 15 minutes à 4°C. Cette étape de lavage est répétée une fois. Puis, 1 ml de l'eau de rinçage est récupéré (surnageants 2, puis 3) ainsi que les larves. L'ensemble des prélèvements est conservé au congélateur à -20°C, les larves sont traitées afin d'être analysées en PCR.

B/ Reproduction expérimentale de l'infection à virus de type herpès au stade naissain

Les essais d'infection avec le virus de type herpès au stade naissain nécessitent l'utilisation de larves conventionnelles d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, expérimentalement infectées par le virus de type herpès et leur mise en contact avec du naissain indemne. Le principe de l'expérience peut être résumé par le schéma suivant:

1ère étape

Larves axéniques
âgées de 2 à 3 jours



Inoculation d'un ultrafiltrat de larves
infectées congelées

Larves axéniques expérimentalement infectées âgées de 5 à 13 jours

2ème étape

Larves conventionnelles âgées de 5 à 10 jours



Inoculation des larves axéniques
expérimentalement infectées

Larves conventionnelles expérimentalement infectées âgées de 10 à 15 jours

3ème étape

Essais d'infection du naissain par balnéation

1 - Obtention de larves axéniques expérimentalement infectées

De la même façon que pour l'expérience précédente on inocule du surnageant de broyat de larves infectées ultrafiltré à 0,22 µm dans des ballons de deux litres d'élevage de larves axéniques âgées de 2 à 3 jours, contenant un litre d'eau de mer filtrée stérile complétementée en antibiotiques. Les autres ballons reçoivent l'équivalent du volume d'ultrafiltrat inoculé en eau de mer stérile. La densité larvaire est de 100 à 300 larves par ml.

2 - Infection expérimentale des larves conventionnelles

Les larves conventionnelles sont élevées dans des bacs cylindro-coniques (120 litres) situés dans une salle réservée aux essais de pathologie expérimentale. On inocule deux bacs (A et B) après 5 à 10 jours d'élevage avec des larves axéniques infectées alors âgées 5 à 13 jours. Le troisième bac cylindro-conique, après 5 à 10 jours, reçoit les larves axéniques contenues dans le ballon ayant été inoculé avec de l'eau de mer stérile.

3 - Infection du naissain

Les animaux sont mis à sec pendant quatre heures dans des béciers afin d'augmenter leur activité de filtration lors de leur mise en contact avec les larves conventionnelles.

Les larves des bacs cylindro-coniques A et B sont récupérées sur le même tamis de 45 µm, puis transvasées dans un bécier contenant 600 ml d'eau de mer. Les larves du bac cylindro-conique témoin sont récupérées à part.

La mise en contact entre le naissain et les larves conventionnelles, sous un volume de 200 ml est de une heure minimum en bécier. Le naissain est ensuite remis en eau dans les bacs en présence des larves (absence de renouvellement d'eau).

4 - Suivi des élevages et prélèvements

Au terme de la période d'acclimatation du naissain, cinq individus sont prélevés dans chaque bac, ils sont conservés individuellement en sac minigrip au congélateur à - 20°C. Ces prélèvements permettent d'établir un " Point Zéro", c'est-à-dire de contrôler la présence ou l'absence du virus sur les animaux en début d'expérience.

Par ailleurs, des prélèvements sont effectués à chaque étape de l'expérience :

- ❖ 1 ml d'eau de mer dans chacun des ballons de larves axéniques infectées et dans le ballon servant de témoin négatif, juste avant leur mise en contact avec les larves conventionnelles.
- ❖ 1 ml d'eau de mer dans chacun des bacs cylindro-coniques avant la mise en contact des larves conventionnelles avec les larves axéniques.
- ❖ 1 ml d'eau de mer dans chacun des bacs cylindro-coniques 30 minutes après la mise en contact des larves conventionnelles avec les larves axéniques.
- ❖ Echantillonnage des larves conventionnelles "infectées" et "non infectées" après filtration et avant contact avec le naissain.

Après la mise en contact avec les larves conventionnelles "infectées" et "non infectées", le naissain fait l'objet d'un suivi journalier. Les animaux morts sont prélevés et conservés individuellement au congélateur à -20°C.

III/ TECHNIQUES D'ANALYSE

A/ Microscopie électronique

La préparation des échantillons comporte quatre étapes principales brièvement reprises ci-dessous (cf. annexe 2).

- ❖ Fixation en glutaraldéhyde à 3%

Elle permet de préserver le mieux possible les structures des échantillons à analyser.

- ❖ Décalcification

Elle est indispensable pour les échantillons de larves et de naissains fixés avec leur coquille.

- ❖ Déshydratation, imprégnation et inclusion des échantillons

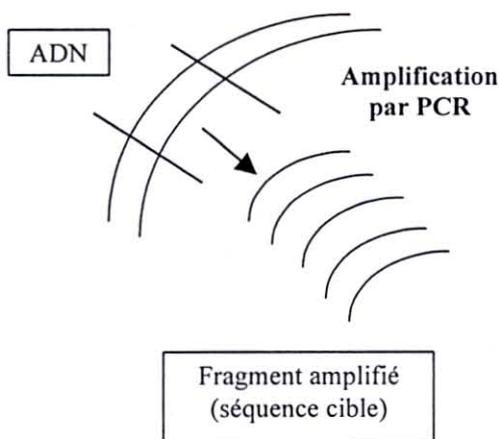
L'imprégnation se fait en Epon et l'inclusion en résine Epon

- ❖ Réalisation des coupes et contraste

Des coupes semi-fines de 1 à 2 μm d'épaisseur sont observées en microscopie photonique afin de contrôler la qualité des échantillons. Puis, des coupes ultrafines de 80 à 100 nm d'épaisseur sont réalisées et déposées sur des grilles de cuivre et contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb. L'observation des coupes se fait à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL JEM 1200 EX sous une tension d'accélération de 80 kVolts.

B/ Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mise au point par Saiki en 1985 (Saiki et *al.*, 1985), la technique de PCR est utilisée pour amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un segment d'acide nucléique situé entre deux séquences connues.



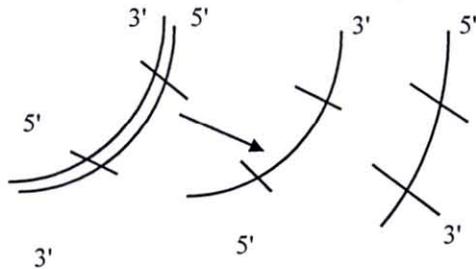
Cette réaction d'amplification enzymatique est obtenue par plusieurs cycles de polymérisation. La particularité de cette technique réside dans le fait que les copies d'ADN néosynthétisées servent de matrice au cours des cycles d'amplification suivants, aboutissant ainsi à une amplification exponentielle du nombre de copies.

On appelle séquence cible d'amplification, la région de l'ADN qui sera spécifiquement amplifiée au cours de la PCR. La taille de la séquence cible varie d'une centaine à quelques centaines de bases.

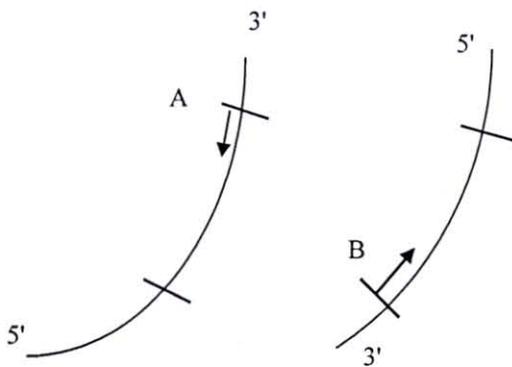
L'amplification de l'ADN cible est obtenue par une série de cycles d'amplification. Une PCR classique comporte en général 30 cycles, un cycle étant défini comme la période au cours de laquelle la quantité d'ADN cible est multipliée par deux.

1- Description du protocole général de PCR

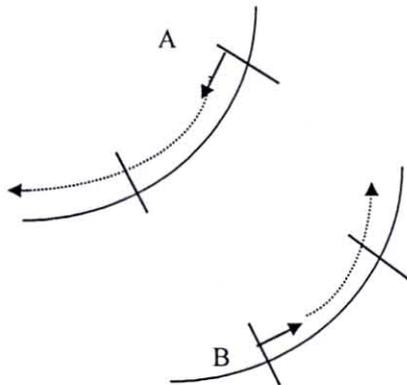
Chaque cycle d'amplification comprend trois étapes. Chacune des étapes est réalisée à une température particulière.



La première étape ou étape de dénaturation est réalisée à 94 °C pendant 1 minute. Sous l'effet de la température, les deux brins constituant l'ADN sont séparés. On obtient alors de l'ADN simple brin qui servira de matrice pour l'amplification ultérieure.



La deuxième étape ou étape d'hybridation est réalisée à la température choisie pendant 1 minute. Le choix de la température se fait selon une formule empirique : T_m (°C) - 5°C avec $T_m = \%GC$. A cette température, les amorces qui servent de point de départ à la polymérisation s'hybrident de façon spécifique sur l'ADN matrice de part et d'autre de la séquence cible d'amplification. Pour que les amorces s'hybrident préférentiellement, une grande quantité en est ajoutée au milieu réactionnel. Les amorces sont des oligonucléotides de synthèse, de séquence définie (18 à 35 nucléotides ou mers).



La troisième étape ou étape d'élongation est réalisée à 72 °C pendant une minute. C'est l'étape d'allongement des amorces par polymérisation. L'enzyme utilisé est une ADN polymérase thermorésistante purifiée à partir de bactéries thermophiles (*Thermus aquaticus*, par exemple). Cette polymérase, appelée Taq polymérase, reste stable à des températures pouvant aller jusqu'à 95 °C.

L'enzyme prend pour matrice le brin d'ADN sur lequel est hybridée l'amorce et polymérise un brin d'ADN de séquence complémentaire à partir des extrémités 3' des amorces.

Le cycle d'amplification permet de doubler le nombre de copies de la séquence cible. Ces cycles sont reproduits de la même façon trente fois (en général), le nombre de copies de la séquence cible est alors de l'ordre de 2^{30} .

2 - Mise en œuvre de la réaction de PCR

Le mélange réactionnel de la PCR est composé :

- d'un tampon de réaction,
- de chlorure de magnésium (cofacteur de la polymérase),
- des quatre nucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dGTP et dCTP) nécessaires à la polymérisation de l'ADN,
- des amorces A et B,
- de polymérase thermorésistante ou Taq polymérase.

Les **cycles thermiques** permettant l'amplification sont réalisés au moyen d'un thermocycleur sur lequel sont programmés la température, la durée des trois étapes de chaque cycle d'amplification et le nombre de cycles souhaités.

Enfin, les produits d'amplification sont analysés par **électrophorèse en gel d'agarose** à 1% (cf. annexe 1). Les produits de PCR sont mélangés avec un tampon de dépôt contenant du sucrose ou du glycérol afin d'alourdir les échantillons ainsi que deux colorants qui permettent de suivre le déroulement de la migration lors de l'électrophorèse. Puis, les échantillons ainsi qu'un marqueur de masses moléculaires (contenant plusieurs fragments de taille connue) sont déposés dans les puits du gel d'agarose. Ce dernier est alors soumis à un champ électrique. Ainsi, les fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille. Le gel, coloré au bromure d'éthidium (agent intercalant), est observé sur une table lumineuse en lumière ultraviolette. Les produits d'amplification, s'ils sont en quantité suffisante, apparaissent sous la forme d'une bande fluorescente. Le calcul et le contrôle de leur taille se font par comparaison de leur migration avec celle du marqueur de masses moléculaires.

3 - PCR appliquée à la détection de l'ADN du virus de type herpès de l'huître

La **purification** des particules virales à partir de larves d'huître creuse infectées a permis, en 1995, d'extraire de l'ADN viral (Le Deuff et Renault, en préparation). 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. 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 déterminés en fonction de ces séquences cibles.

Deux types de protocole de PCR peuvent être utilisés pour la détection du virus de type herpès de l'huître creuse :

❖ Le premier correspond à une **PCR gigogne ou nested PCR** (Renault *et al.*, 1996 ; Renault *et al.*, en préparation). Les produits amplifiés en présence du couple d'amorces A3 et A4 lors d'une première réaction de PCR sont utilisés pour réaliser une deuxième amplification en présence du couple d'amorces A5 et 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 bonne spécificité à la réaction. La taille des fragments attendus à la fin de la deuxième réaction est de 940 paires de bases.

❖ Le deuxième consiste en une PCR simple (Renault *et al.*, 1997). Un seul couple d'amorces (OHV3 et OHV4 ou OHV3 et OHV114) est alors utilisé afin d'amplifier des séquences cibles connues. Ces amorces permettent d'abaisser le seuil de détection de l'ADN viral dans l'échantillon (Renault *et al.*, 1997). De plus, ce protocole permet de limiter les risques de contamination (réaction unique d'amplification). Les fragments attendus ont une taille de 896 paires de bases.

Avant d'être passés en PCR, les échantillons subissent un **traitement** particulier qui varie selon la taille des animaux:

- ❖ Les larves sont broyées en tube Eppendorf, à l'aide d'un piston Pellet à usage unique, en présence d'eau distillée (X µl d'eau distillée pour X mg de larves).
- ❖ Le naissain de taille inférieure à 3 mm est réuni par lot de cinq individus dans des tubes Eppendorf, il est alors pesé (X g), puis broyé en présence d'eau distillée (2Xml) à l'aide d'un piston Pellet à usage unique.
- ❖ Le naissain dont la taille est supérieure à 3 mm est ouvert, séché, réuni par lots de cinq individus dans des sacs Minigrip, puis dilacéré à l'aide d'un marteau. Environ 0.5 g du broyat ainsi obtenu est transvasé dans un tube Eppendorf après section d'un angle du sac et 1 ml d'eau bidistillée est ajouté. L'ensemble est mélangé à l'aide d'un Vortex.

Les broyats obtenus sont ensuite placés au bain-marie bouillant 10 minutes, puis centrifugés (10000 tours, 5 minutes à 4°C). Les surnageants recueillis sont immédiatement dilués au dixième en eau bidistillée et placés au congélateur à - 20°C.

Différents **témoins** sont utilisés :

- ❖ Les témoins négatifs sont réalisés à partir d'eau bidistillée, ceci afin de détecter d'éventuelles contaminations des réactifs ou de la zone de travail au cours des manipulations.
- ❖ Les témoins positifs sont composés d'ADN extrait de virus purifié. L'un correspond à 10 ng, l'autre à 0,5 pg d'ADN viral pour une nested PCR ou 10 fg pour la PCR simple. Ces deux témoins positifs permettent de vérifier l'efficacité du milieu réactionnel et la qualité de la réaction de PCR.

Le **mélange réactionnel** par tube de PCR est le suivant:

	PCR1 (ou PCR simple)	PCR2
Echantillon	1 µl	0.1 µl
Tampon	5 µl	5µl
MgCl ₂	5 µl	5µl
Nucléotides	5 µl	5 µl
A3, A5 ou OHV3	1 µl	1µl
A4, A6 ou OHV4	1 µl	1µl
Taq polymérase	0.5 µl	0.4 µl
Eau bidistillée	31.5 µl	32.5 µl

RESULTATS

I/ CONTROLE EN PCR DES LARVES SERVANT AUX EXPERIENCES

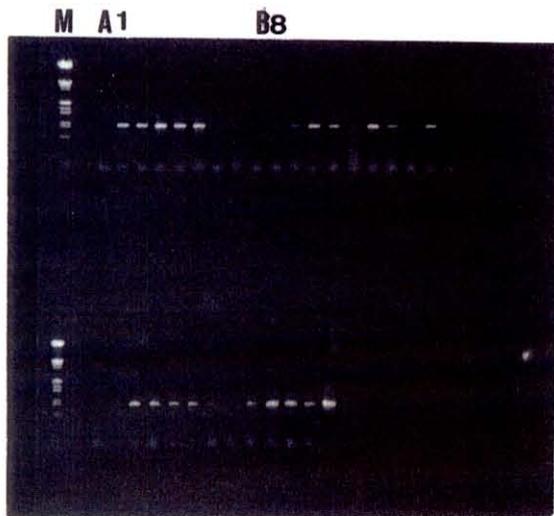
Avant tout essai, différents échantillons de larves d'huître creuse présumés infectés par le virus de type herpès et utilisés pour les infections expérimentales, sont contrôlés en PCR après avoir été traités selon le protocole décrit précédemment (Matériel et Méthodes III / B / 3 – PCR appliquée à la détection de l'ADN du virus de type herpès de l'huître). Les différents lots analysés sont répertoriés dans le tableau suivant (Tableau II). Ils proviennent principalement d'une écloserie privée, située dans la baie de Bourgneuf (85) et sont conservés à -20°C depuis 1995. Selon les résultats obtenus en nested PCR (amorces A3 - A4 et A5 - A6) et en PCR simple (amorces OHV3 - OHV4), certains lots sont retenus préférentiellement pour réaliser les infections des larves axéniques. Il s'agit des lots 2, 3, 4, et 22, 26 (les figures 5a et 5b présentent les résultats obtenus en gel d'agarose à 1%).

Tableau II - Résultats des analyses en PCR simple et en nested PCR des lots de larves d'huître creuse 1 à 27

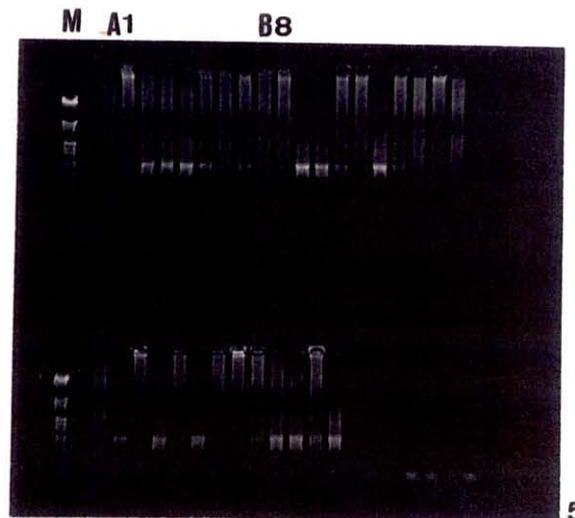
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
OHV3-OHV4	2+	2+	3+	3+	3+	-	+/-	+/-	+	2+	2+	+	3+	+	+/-	2+	-	-	3+	2+	2+	2+	+	-	+	3+	2+
A3-A4-A5-A6	+	3+	3+	3+	2+	+	2+	+/-	3+	3+	2+	+/-	3+	+	-	-	-	2+	+/-	3+	+	3+	-	-	2+	3+	3+

- : échantillons négatifs

+ : échantillons positifs (+/- à 3+ selon l'intensité en gel d'agarose)



5a



5b

Figures 5a et 5b - Analyse des différents lots de larves (1 à 27) après PCR simple (5a) et après nested PCR (5b)

A, B et C : témoins négatifs

D et E : témoins positifs (0,5 pg et 10 ng d'ADN viral)

M : marqueurs de taille.

II/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR LARVES AXENIQUES

Quatre essais d'infection de larves axéniques non suivis d'infection de larves conventionnelles ont été réalisés. Les oeufs obtenus après fécondation en conditions stériles sont répartis dans des volumes d'eau de mer filtrée stérile additionnée en antibiotiques. Après 2 à 4 jours, un ultrafiltrat de broyat de larves infectées est ajouté dans certains ballons, le même volume d'eau de mer filtrée stérile est introduit dans les ballons servant de témoins négatifs.

Différents prélèvements sont réalisés au cours des étapes d'infection afin de vérifier la présence du virus (particules et ADN viral) (Matériel et Méthodes II / A / 3 – Suivi de l'infection). La figure 6 présente les résultats obtenus après analyse en PCR simple des prélèvements effectués au cours de l'infection des larves axéniques de l'essai 4.

Les larves sont observées régulièrement au microscope photonique. Les figures 7a et 7b illustrent les lésions que l'on peut observer sur des larves axéniques provenant de ballons infectés. Les larves sont récupérées en fin d'expérience selon le protocole décrit précédemment (Matériel et Méthodes II / A / 4 – Récupération des larves) et analysées en PCR et en microscopie électronique à transmission (MET) (cf. figures 8a, b et c). A chaque essai, un contrôle bactériologique est effectué avant et après mise en élevage des larves. Celui-ci est réalisé en inoculant 0.2 ml d'eau d'élevage, avant et après mise en élevage des larves axéniques, dans des tubes contenant de la Pastone (peptone pancréatique de caséine), le contrôle ne révèle aucune contamination.

Le tableau III présente les conditions de réalisation des différents essais d'infection de larves axéniques et le tableau IV reprend les résultats obtenus.

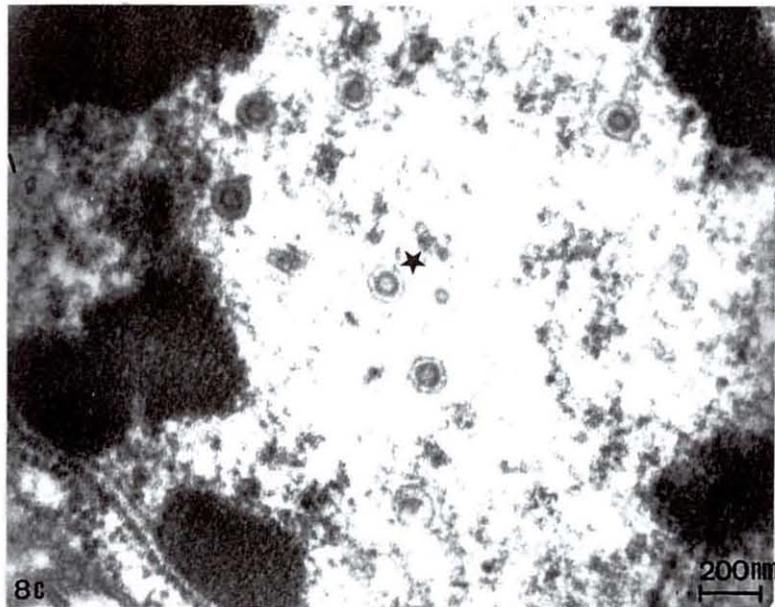
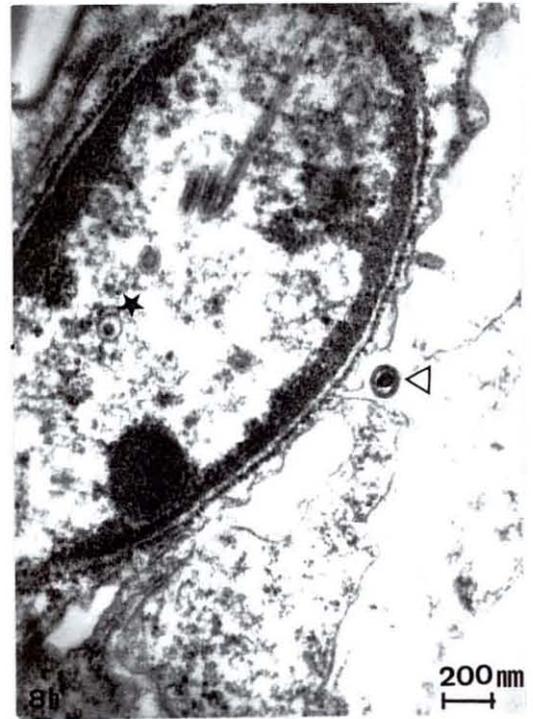


M A 1 2 3 4 5 B C D

Figure 6 - Analyse en PCR simple (OHV3 – OHV4) des prélèvements réalisés au cours de l'infection des larves axéniques de l'essai 4. A et B : Témoins négatifs. C et D : Témoins positifs (0,5 pg et 10 fg d'ADN viral). M : marqueurs de taille. 1 : broyat réalisé au Potter. 2 : surnageant après centrifugation. 3 : ultrafiltrat après filtration à 0,45 μm . 4 : ultrafiltrat après filtration à 0,22 μm . 5 : larves.



Figures 7a et 7b - Larves axéniques infectées observées en microscopie photonique : Cellules hypertrophiées, ballonnées (7a \blacktriangleleft) et lésions du vélum (7b \star).



Figures 8 a, b, c - Larves axéniques infectées observées au microscope électronique à transmission.
★ Capsides et nucléocapsides ; ◁ Particules enveloppées.

Tableau III - Conditions de réalisation des essais d'infection des larves axéniques d'huître creuse (essais non suivis d'infection de larves conventionnelles).

	ESSAI 1	ESSAI 2	ESSAI 3	ESSAI 4
Fécondation				
Géniteurs	2 femelles 1 mâle	2 femelles 1 mâle	2 femelles 1 mâle	2 femelles 2 mâles
Origine	Ecloserie IFREMER Ronce les Bains	Ecloserie IFREMER Ronce les Bains	Ecloserie IFREMER Ronce les Bains	Ecloserie IFREMER Ronce les Bains
Matériel utilisé				
Larves infectées	4 ballons de 1 l	3 ballons de 1 l	3 ballons de 1 l	4 ballons de 1 l
Témoins négatifs	2 ballons de 1 l	3 ballons 1 l	3 ballons de 1 l	2 ballons de 1 l
Densité de larves	100 larves/ml	3000 larves/ml	300 larves/ml	300 larves/ml
Conditions d'élevage	Bain-marie 25°C Antibiotiques*	Bain-marie 25°C Antibiotiques*	Bain-marie 25°C Antibiotiques*	Bain-marie 25°C Antibiotiques*
Ultrafiltrat				
Quantité de larves Infectées broyées	130 mg des lots 2, 3 et 4 (ballons 1 et 2) 200mg des lots 22 et 26 (ballons 3 et 4)	300 mg des lots 22 et 26 (ballons 1, 2 et 3)	300 mg des lots 22 et 26 (ballons 1, 2 et 3)	400 mg du lot 22 400 mg du lot 26 (ballons 1, 2, 3, 4) Deux broyats, pool des surnageants
Volume final	20 ml	20 ml	20 ml	40 ml
Volume inoculé	6-7 ml/ballon	5 ml/ballon	5 ml/ballon	7 ml
Age à l'inoculation	J3	J2	J3	J4
Age à la récupération	J6	J9	J6	J8 (ballons 2 et 4) J11 (ballons 1 et 3)

* Antibiotiques : Acide oxolinique (0,1mg/l), Erythromycine (0,1mg/l), Kanamycine (0,1mg/l), Fluméquine(30mg/l), Pénicilline G (10⁵U/l), Streptomycine (100mg/l)

Tableau IV - Observations et résultats des analyses en PCR réalisées au cours des essais d'infection des larves axéniques d'huître creuse.

		Observations macroscopiques		Résultats PCR				
		Sédimentation	Lésions*	Ballon	Surnageant 1	Surnageant 2	Surnageant 3	Larves
Essai 1	Ballon 1	Non	Non	++	+/-	-	-	-
	Ballon 2	Non	Non	++	+	-	-	-
	Ballon 3	Non	Oui	++	++	+	+	++
	Ballon 4	Oui	Oui	++	+	+	+	-
	Ballon 5	Non	Non	-	-	-	-	-
	Ballon 6	Non	Non	-	-	-	-	-
Essai 2	Ballon 1	Non	Non	+	NF	NF	NF	-
	Ballon 2	Non	Non	+	+	NF	NF	NF
	Ballon 3	Non	Non	++	+	-	-	-
	Ballon 4	Non	Non	NF	NF	NF	NF	NF
	Ballon 5	Non	Non	-	-	NF	NF	NF
	Ballon 6	Non	Non		-	-	-	-
Essai 3	Ballon 1	Oui	Non	++	++	+	+	+++
	Ballon 2	Non	Non	+	+	+/-	-	-
	Ballon 3	Non	Non	+/-	+/-	-	-	-
	Ballon 4	Non	Non	-	-	-	-	-
	Ballon 5	Non	Non	-	-	-	-	-
	Ballon 6	Non	Non	-	-	-	-	-
Essai 4	Ballon 1	Non	Non	+	+	+/-	-	-
	Ballon 2	Oui	Oui	++	+	+/-	-	-
	Ballon 3	Non	Non	++	++	+	-	-
	Ballon 4	Oui	Oui	+/-	+/-	-	-	-
	Ballon 5	Non	Non	-	-	-	-	-
	Ballon 6	Non	Non	-	-	-	-	-

*Les lésions sont décrites précédemment dans la partie Généralités II / C – Symptômes et lésions. Les larves axéniques de l'essai 1 ont été analysées en MET : détection de particules virales chez les animaux infectés (cf. figures 8a, b et c).

III/ ESSAIS DE REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR NAISSAIN

Avant les essais d'infection du naissain, un "Point Zéro" a été établi. Au terme de la période d'acclimatation, cinq huîtres sont prélevées dans chaque bac. Les animaux sont analysés individuellement en PCR. Les analyses sont négatives pour l'ensemble des lots d'animaux.

Trois essais ont pu être réalisés. 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 mise en contact avec 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. Comme précédemment, un contrôle bactériologique est réalisé avant et après mise en élevage des larves axéniques. Aucune contamination n'a été détectée. Les conditions de réalisation de ces essais et les résultats obtenus sont repris dans les tableaux V et VI. La figure 9 illustre les résultats obtenus après analyse en PCR simple (amorces OHV3 – OHV4) des prélèvements réalisés au cours de la récupération des larves axéniques de l'essai 6. Enfin, l'analyse du naissain a été réalisée en PCR pour chaque essai d'infection, mais elle n'a pas permis de détecter d'ADN viral chez les animaux infectés.

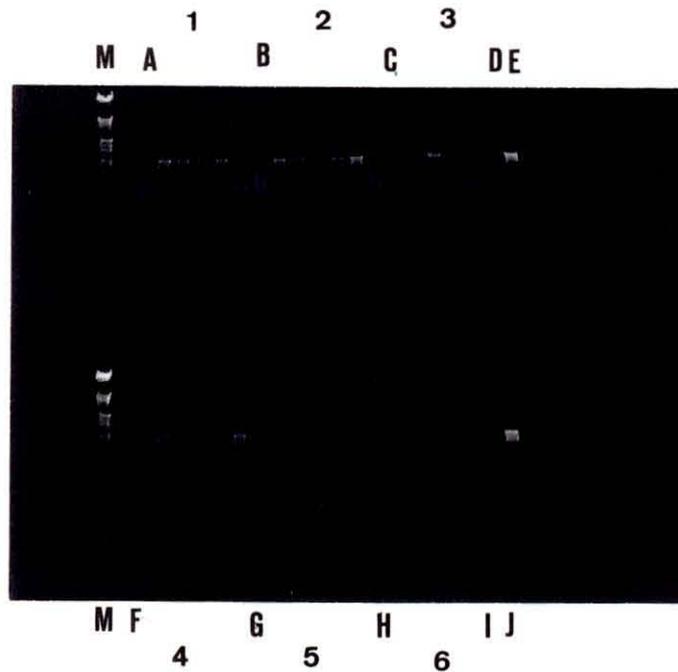


Figure 9 - Analyse en PCR simple des prélèvements réalisés au cours de l'étape de récupération des larves axéniques de l'essai 6. A, B, C, F, G et H : Témoins négatifs. D et I : Témoins positifs 0,5 pg d'ADN viral. E et J : Témoins positifs 10 ng. Pour chaque ballon (1 à 6), sont analysés dans l'ordre : eau du ballon, surnageant de 1^{er}, 2^{ème} puis 3^{ème} rinçage et enfin les larves.

Tableau V - Conditions de réalisation des essais d'infection des larves axéniques, puis des larves conventionnelles et du naissain d'huître creuse.

	ESSAI 5	ESSAI 6	ESSAI 7
Fécondation axénique			
Géniteurs-Origine	1 femelle et 1 mâle, Ecloserie IFREMER (Ronce les Bains)	2 femelles et 1 mâle Etablissement ostréicole (La Tremblade)	3 femelles et 2 mâles Etablissement ostréicole (La Tremblade)
Témoins positifs	4 ballons de 1 l	4 ballons de 1 l	4 ballons de 1 l
Témoins négatifs	2 ballons de 1 l	2 ballons de 1 l	2 ballons de 1 l
Densité larvaire	300 larves/ml	200 larves/ml	300 larves/ml
Conditions d'élevage	Bain-marie 25°C Antibiotiques	Bain-marie 25°C Antibiotiques	Bain-marie 25°C Antibiotiques
Ultrafiltrat			
Quantité de larves Infectées broyées	400 mg du lot.22 400 mg du lot.26 (ballons 1, 2, 3, 4) Deux broyats, pool des surnageants	400 mg du lot.22 400 mg du lot.26 (ballons 1, 2, 3, 4) Deux broyats, pool des surnageants	400 mg du lot.22 400 mg du lot.26 (ballons 1, 2, 3, 4) Deux broyats, pool des surnageants
Volume final	40 ml	40 ml	40 ml
Volume inoculé	4 ml	4 ml	4 ml
Age à l'inoculation	J3	J2	J3
Age à la mise en contact avec les larves conventionnelles	J5 (ballons 2, 3 et 4)	J9 (ballons 1, 2 et 4) (Répartition ballon 3 dans 1,2 et 4 à J7)	J11 (ballon 2), J13 (ballons 1 et 4) (Répartition ballon 3 dan 1 et 4 à J11)
Larves conventionnelles			
Géniteurs-origine	2 femelles et 2 mâles Etablissement ostréicole (Bouin, 85)	15 femelles et 4 mâles Etablissement ostréicole (La Tremblade)	15 femelles et 7 mâles Etablissement ostréicole (La Tremblade)
Densité larvaire	40 larves/ml	150 larves/ml	350 larves/ml
Age à l'infection	J5	J9	J10
Mise en contact avec naissain	J10	J10	J15

Tableau VI - Observations et résultats des analyses en PCR réalisées au cours des essais d'infection des larves axéniques, puis des larves conventionnelles d'huître creuse.

		Observations macroscopiques		Résultats PCR				
		Sédimentation	Lésions*	Ballon	Surnageant 1	Surnageant 2	Surnageant 3	Larves
Essai 5	Ballon 1	Non	Oui	+				
	Ballon 2	Oui	Oui	+	-	+	-	-
	Ballon 3	Oui	Oui	+	+	-	-	-
	Ballon 4	Oui	Oui	+	+	-	-	-
	Ballon 5	Oui	Oui	-	-	-	-	-
	Ballon 6	Oui	Oui	-	-	-	-	-
	Bac A	Non	Non	-	-	-	-	-
	Bac B	Non	Non	-	-	-	-	-
	Bac T	Non	Non	-	-	-	-	-
Essai 6	Ballon 1	Oui	Oui	+	++	++	+	+
	Ballon 2	Oui	Oui	+	++	+	+	++
	Ballon 3	Oui	Oui	+	++	+	+	++
	Ballon 4	Oui	Oui	++	+	+	+	++
	Ballon 5	Non	Non	-	-	-	-	-
	Ballon 6	Non	Non	-	-	-	-	-
	Bac A	Non	Non	-	+	-	+	-
	Bac B	Non	Non	-	-	-	+	-
	Bac T	Non	Non	-	-	-	-	-
Essai 7	Ballon 1	Oui	Oui	+	+	-	-	-
	Ballon 2	Oeufs		+	-	-	-	-
	Ballon 3	Oui	Oui	+	-	+	-	+
	Ballon 4	Oui	Oui	+	-	-	-	+
	Ballon 5	Non	Non	-	-	-	-	-
	Ballon 6	Non	Non	-	-	-	-	-
	Bac A	Oui	Oui	-	-	+	-	+
	Bac B	Non	Oui	-	-	-	+	+/-
	Bac T	Non	Non	-	+	+	+	-

* Les lésions sont décrites précédemment dans la partie Généralités/ II / C – Symptômes et lésions.

DISCUSSION

I/ CONTROLE EN PCR DES LOTS SERVANT AUX EXPERIENCES

Les témoins négatifs comme les témoins positifs permettent de valider les analyses de PCR (PCR simple et nested PCR) réalisées pour le contrôle des lots de larves présumés infectés par le virus de type herpès.

La nested PCR utilise successivement les couples d'amorces A3-A4 et A5-A6 (26-28 paires de bases), elle est théoriquement plus spécifique mais semble moins sensible que la PCR simple qui n'utilise qu'un seul couple d'amorces, OHV3-OHV4, de 20 paires de bases. En effet, après une PCR simple, il est possible de détecter des bandes en gel d'agarose pour 1 fg d'ADN viral par tube de PCR (soit 5 copies de génome viral). De plus, le protocole de PCR simple est plus rapide. Tout en réduisant le nombre de manipulations, il permet de limiter les risques de contamination.

Sur la figure 5b, des «smears» sont observés et peuvent être expliqués par l'obtention de produits d'amplification non homogènes (nombreux fragments de tailles différentes). Au contraire, les bandes obtenues après analyse en PCR simple apparaissent plus nettes, ce qui prouve une plus grande pureté des produits de la réaction.

Deux hypothèses peuvent expliquer ces observations :

- ❖ Une grande quantité d'ADN cible retarde l'entrée de la réaction en phase exponentielle et donc diminue l'homogénéité de la taille des fragments obtenus. Or, les produits amplifiés en présence du couple d'amorces A3-A4 sont utilisés pour réaliser une deuxième réaction d'amplification en présence du couple d'amorces A5-A6. Donc, si la quantité initiale d'ADN cible dans l'échantillon est élevée, la quantité introduite dans le mélange de la deuxième réaction est en conséquence importante, d'où une possible diminution de l'homogénéité de la taille des fragments obtenus et l'observation des traînées en gel d'agarose.
- ❖ La Taq polymérase présente un taux d'erreur relativement élevé (1 pour 9000 paires de bases). En utilisant le protocole de nested PCR, on amplifie également les fragments résultants des erreurs produites au cours de la première réaction, ainsi on augmente le nombre de fragments de taille différente, d'où l'observation des traînées sur la figure 5b.

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 (cf. Tableau II), 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 est utilisé, et 23 sur 27 pour le protocole de simple PCR. 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.

En revanche, l'intensité des bandes observées en gel d'agarose peut varier d'un protocole à l'autre. Mais les techniques de PCR appliquées au cours de cette étude ne permettent d'obtenir qu'un résultat qualitatif et non quantitatif.

Ainsi, au vu des résultats obtenus, les échantillons 2, 3, 4, 22 et 26 ont été préférentiellement retenus pour les essais d'infection des larves axéniques.

II/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR LARVES AXENIQUES

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 quatre essais d'infection expérimentale de larves axéniques non suivis d'infection de larves conventionnelles réalisés dans la présente étude n'ont pas tous permis d'obtenir des résultats totalement identiques. Toutefois, des **lésions du velum** et des **cellules ballonnées** sont bien visibles chez les larves axéniques de certains ballons infectés (cf. figures 7a et 7b). De plus, des phénomènes de **sédimentation** ont pu être clairement observés au cours de l'essai 1 dans les ballons 3 et 4, dans le ballon 1 de l'essai 3 et enfin dans les ballons 2 et 4 de l'essai 4. Tous ces ballons correspondent à des larves infectées. Aucun signe macroscopique n'a été observé dans les ballons témoins négatifs.

Cependant, ces observations macroscopiques ne sont pas systématiquement corrélées à la **détection d'ADN viral par PCR**. Ceci peut s'expliquer par des problèmes d'inhibition de la réaction de PCR par des substances telles que le sel. En effet, le prélèvement des larves sédimentées s'accompagne également des cristaux de sel qui s'accumulent au fond des ballons. La concentration en chlorure de magnésium est effectivement cruciale pour une activité optimale de la polymérase. Ces résultats peuvent également résulter d'un moment inadapté du prélèvement des larves. En effet, les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* sont des virus enveloppés, donc relativement fragiles. Ils se conservent mal dans l'eau de mer, même filtrée stérile. Il serait préférable de prélever les animaux juste avant qu'ils ne se décomposent et relarguent les particules virales. Ainsi, parmi les analyses de larves réalisées, seuls deux ballons infectés (essai 1, ballon 3 et essai 3, ballon 1) présentent des résultats positifs. Néanmoins, 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 animaux. Mais, au vu de la différence d'intensité des bandes obtenues en gel d'agarose entre les deux derniers surnageants de rinçage et les larves (cf. Tableau IV), il est probable que les animaux contiennent effectivement de l'ADN viral. Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus pour les analyses réalisées en microscopie électronique à transmission. En effet, dans le cas de l'essai 1, ces analyses ont permis de mettre en évidence de nombreuses particules virales chez les larves provenant du ballon 3 (cf. figures 8a, b et c) et aucun virus chez les animaux provenant des ballons témoins.

Nous constatons donc un **manque de répétabilité** dans l'observation des symptômes pour les larves axéniques expérimentalement infectées. Ces résultats peuvent s'expliquer par une perte de virulence des virus présents dans les lots de larves utilisés pour réaliser les infections. Ces échantillons ont été contrôlés positifs en PCR avant d'entreprendre les essais (Discussion I – Contrôle en PCR des lots servant aux expériences). Cependant, il est possible que seulement un petit nombre de particules intègres (possédant leur enveloppe et donc infectieux) soient présents dans les broyats ultrafiltrés utilisés. Le suivi des différentes étapes de préparation de l'ultrafiltrat

(du broyat dans le Potter à l'ultrafiltrat obtenu après filtration à 0,22 μm), permet de vérifier qu'il y a bien inoculation d'ADN viral dans les ballons à infecter. En effet, comme l'illustre la figure 6, l'ADN viral est conservé au cours des différentes étapes de la préparation de l'ultrafiltrat. On peut noter que le prélèvement du broyat au Potter présente une bande moins intense que les prélèvements suivant en gel d'agarose. Ceci peut s'expliquer par la présence, en quantité plus importante, d'inhibiteurs de la réaction de PCR (débris de larves). 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. Les décongélations et recongélations successives des lots de larves infectées prélevés en 1995 ont pu altérer les virions et leur faire perdre leur pouvoir infectieux. Aussi, le peu de particules virales intègres pourrait se répartir de façon aléatoire dans les ballons infectés, et seuls ces ballons présentent des lésions et des phénomènes de sédimentation. Cette hypothèse semble confirmée par le fait que certains ballons infectés avec un ultrafiltrat, et ne présentant aucune anomalie après cette inoculation, montrent des signes macroscopiques rapidement après leur ensemencement par des larves vivantes ayant sédimenté (cf. Tableau V). Dans ce cas, l'inoculation de larves vivantes infectées correspondrait au relarguage de plus grande quantité de particules virales intègres.

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 quantités de bactéries non négligeables au niveau des gamètes pour l'ensemble des géniteurs utilisés. Aussi était-il essentiel d'utiliser des antibiotiques dans les ballons d'élevage. En effet, tous les essais d'infection de larves conventionnelles réalisés jusqu'alors semblent avoir échoué lorsqu'un surnageant de broyat d'animaux contaminés était utilisé.

Ainsi, il semble clair qu'il est possible d'induire l'infection virale au stade larvaire en suivant le protocole décrit en Matériel et Méthodes II / A - Reproduction de l'infection sur larves axéniques

III/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR NAISSAIN

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 (Renault *et al.*, 1996) ont été réalisés en utilisant un support biologique vivant (contact avec des larves vivantes expérimentalement infectées). 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 développe. 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 poursuivies en 1997 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. De plus, les analyses en PCR de celui-ci sont toutes négatives.

- ❖ Au cours de **l'essai 5**, ni l'infection des larves axéniques, ni l'infection des larves conventionnelles n'a pu être démontrée. Les larves axéniques des ballons infectés comme celles des ballons témoins présentaient des lésions et ont sédimenté. Il est probable qu'un problème de développement des larves a contrarié le succès de l'infection. Les larves axéniques n'étant pas infectées, nous concevons donc que les larves conventionnelles ne le soient pas.
- ❖ Au cours de **l'essai 6**, nous avons pu montrer l'infection des larves axéniques (cf. figure 9). Les témoins négatifs et positifs permettent de valider l'analyse en PCR simple effectuée sur l'ensemble des prélèvements réalisés pendant l'étape de récupération des larves. Les prélèvements concernant les ballons témoins sont tous négatifs, alors que les larves des ballons 1, 2, 3 et 4 apparaissent infectées. La différence d'intensité des bandes observées en gel d'agarose entre les surnageants de rinçage et les larves est plus marquée pour les ballons 2 et 4, alors que pour les ballons 1 et 3, il est plus difficile de savoir si l'ADN viral détecté provient effectivement des larves ou plutôt du broyat ultrafiltré que l'on a inoculé dans les ballons. En effet, l'ADN viral est détecté en PCR dans l'échantillon de larves, mais également avec la même intensité ou une intensité plus importante dans les différents surnageants récupérés après centrifugation et rinçages des élevages.
- ❖ Enfin, les larves axéniques des ballons 3 et 4 de **l'essai 7** apparaissent infectées dans la mesure où les derniers surnageants des eaux de rinçage sont négatifs en PCR (cf. Tableau VI). De plus, l'analyse des larves conventionnelles révèle probablement leur infection, cependant il est difficile de conclure étant donné que les analyses en PCR effectuées sur les larves conventionnelles du bac témoin révèlent des surnageants de rinçage des animaux positifs. Ces résultats peuvent s'expliquer par un problème de contamination du bac ou des échantillons analysés ou encore par le fait que les larves étaient déjà infectées (hypothèse de transmission verticale du virus de type herpès infectant les huîtres). Cela n'est cependant pas gênant, le but de cette étape d'infection des larves conventionnelles étant bien d'obtenir une quantité suffisante de virus pour contaminer le naissain.

Les analyses du naissain en PCR sont toutes négatives. Cependant, nous avons mentionné le fait que les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* peuvent persister sous forme latente, la production de particules filles étant nulle. Cette propriété rend délicate la détection d'ADN viral, alors en si petite quantité, d'autant plus qu'il existe de nombreuses substances inhibitrices de la réaction de PCR dans la chaire des animaux. En outre, l'augmentation de la température de l'eau d'élevage était probablement insuffisante pour favoriser l'expression de la maladie. Les conditions d'élevage les plus adaptées au développement de l'infection restent effectivement à définir.

CONCLUSION

La récente apparition de nombreuses infections à virus de type herpès chez différentes espèces d'huître nécessite le développement d'outils diagnostiques adaptés. En effet, les techniques de détection utilisées jusqu'alors pour rechercher ces infections virales, histologie et microscopie électronique à transmission, sont plus ou moins satisfaisantes tant par leur sensibilité, le temps qu'elles nécessitent et leur coût.

La PCR appliquée à la détection des herpèsvirus chez les vertébrés est largement documentée (Boyle et Blackwell, 1991 ; Casas *et al.*, 1996 ; Cassinotti *et al.*, 1996 ; de Gee *et al.*, 1996). Par ailleurs, de récents progrès ont été réalisés dans le développement de méthodes moléculaires de détection de virus humains transmissibles par les coquillages (Lees *et al.*, 1994 ; Le Guyader *et al.*, 1994 ; Atmar *et al.*, 1993). Cependant, aucune technique de détection des virus infectant les bivalves et faisant appel à la biologie moléculaire n'a fait l'objet, à ce jour, de publication. Le laboratoire IFREMER de Ronce les Bains a donc développé un protocole de mise en évidence d'un virus de type herpès associé à des mortalités de larves et de naissain chez l'huître creuse. Ce protocole fait appel à la PCR (Renault *et al.*, en préparation).

Le modèle expérimental utilisé au cours de ce stage est complexe et exige la maîtrise des trois niveaux d'infection : larves axéniques, larves conventionnelles et naissain. En effet, le succès de l'un des maillons conditionne le succès du maillon suivant. De plus, ce modèle demande des outils diagnostiques adaptés. Or, la présence d'inhibiteurs de la réaction de PCR (sel par exemple) gêne l'interprétation de certains résultats et, en aucun cas le protocole suivi dans cette étude ne nous permet d'apprécier la quantité de particules virales infectieuses présentes dans les échantillons. En revanche, la rapidité et la facilité de mise en œuvre de cette méthode d'analyse nous ont aidés dans le bon déroulement des essais d'infection expérimentale de naissain. En effet, l'analyse rapide des prélèvements conditionnait la poursuite ou l'arrêt de l'expérience en cours. Au contraire, la microscopie électronique à transmission autorise un diagnostic de certitude et permet d'effectuer une quantification approximative du nombre de particules virales intègres présentes, mais c'est une technique lourde qui ne peut être appliquée en routine.

C'est pourquoi, malgré la complexité du modèle expérimental suivi, cet enchaînement d'infections est le seul moyen, à l'heure actuelle, de s'assurer d'une quantité suffisante de particules virales effectivement infectieuses.

Les essais de transmission expérimentale de l'infection au stade naissain, réalisés au cours de ce stage, n'ont pas permis d'aboutir à l'induction de mortalité et à la définition d'un protocole reproductible. Cependant, ces 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 observées.

Enfin, le contrôle en PCR des lots de larves utilisés pour les infections nous ont permis d'aborder une autre voie de recherche, celle de la diversité au sein des virus de type herpès infectant les huîtres creuses.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Atmar, R.L., Metcalf, T.G., Neill, F.H. et Estes, M.K. (1993). Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 631-635.
- Boyle, J. et Blackwell, J. (1991). Use of polymerase chain reaction to detect latent Channel Catfish Virus. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1965-1968.
- Casas, I., Tenorio, A., de Ory, F., Lozano, A. and Echevarria, J.M. (1996). Detection of both herpes simplex and Varicella-Zoster viruses in cerebrospinal fluid from patients with encephalitis. *J. Med. Virol.* 50, 82-92.
- Cassinotti, P., Mietz, H. and Siegl, G. (1996). Suitable and clinical application of a multiplex nested PCR assay for the diagnosis of herpes simplex virus infections. *J. Med. Virol.* 50, 75-81.
- 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., Foster, W.S. (1972). Oyster herpes-type virus. *Science, Wash.D.C.* 178, 759-760.
- de Gee, A.L.M., Wagter, L.H.A. and Hage, J.J. (1996). The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Microbiol.* 53, 163-168.
- 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.
- 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.
- 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. 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. et Renault, T. (en préparation). Purification and partial genom cloning of Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, herpes-like virus.
- Lees, D.N., Henshlwood, K. et Dore, W.J. (1994). Development of a method for the detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Appl. environ. Microbiol.* 60, 2999-3005.
- Le Guyader, F., Dubois, E., Menard, D. et Pommepuy, M. (1994). Detection of hepatitis A, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3665-3671.
- 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.
- Renault, T., Cochenec, N., Le Deuff, R.-M. et Chollet, B. (1994) Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 14(2), 64-66.

- 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.
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Lipart, C. et Delsert C. (en préparation) Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters.
- Roizman, B., Batterson, W. (1985). Herpesviruses and their replication, dans *Virology*, Fields, B.N. *et al.*, 25, 497-526.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Falcoma, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Séverin, P. (1996). Technique de PCR appliquée à la détection du virus de type herpès de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : diagnostic et applications expérimentales. Rapport de stage, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, pp 41

ANNEXES

ANNEXE 2 : Solutions et réactifs utilisés en microscopie électronique

1 - Préparation des solutions

Cacodylate de sodium 0,4 M : 8,6 g dans 100 ml d'eau distillée

Chlorure de sodium 2% et 10% en eau distillée

Tampon cacodylate pH 7,4 :

	1000 mOsm
Cacodylate de sodium	50 ml du stock à 0,4M
NaCl	20 ml du stock à 10%
Eau distillée	30 ml
Ajuster le pH à 7,4	

Glutaraldéhyde 3% :

	1000 mOsm
Glutaraldéhyde à 25%	2,5 ml
Cacodylate de sodium 0,4 M	5 ml
NaCl 10%	3,5 ml
Eau distillée	9 ml

Acide osmique 1% :

	1000 mOsm
Acide osmique à 4%	1 vol.
Cacodylate de sodium 0,4 M	1 vol.
NaCl	1 vol. du stock à 10%
Eau distillée	1 vol.

EDTA 5%

EDTA disodique	5 g
Tampon cacodylate	100 ml

Dissoudre par addition de quelques pastilles de soude. L'EDTA se dissout en effet lorsque le pH est supérieur à 8. Lorsque la solution est limpide, ajuster à nouveau le pH à 7,4 par addition d'HCl concentré.

Mélange Epon

Epon 812	12,32 g
DDSA*	6,2 g
MNA*	6,2 g
DMP30*	0,3 g

* DDSA : Dodecyl succinic anhydride ; MNA : Methylnorbornene-2,3-dicarboxylic anhydride ; DMP30 : 2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phénol.

2 - Préparation des réactifs utilisés pour le contraste des coupes

Acétate d'uranyle :

Solution stock à 5% en eau distillée

Solution pour contraste : 1/2 à 2/3 solution stock, 1/2 à 1/3 éthanol à 50%

Citrate de plomb :

Dans un récipient très propre mélanger 16 ml d'eau distillée bouillie et 3 ml de citrate de sodium 1 M (357 g/l).

Agiter très doucement et ajouter 2 ml de nitrate de plomb 1 M (331 g/l).

Un précipité se forme, agiter pour obtenir une solution laiteuse, puis ajouter 4 ml de NaOH 1N (40 g/l), la solution doit devenir limpide.

ANNEXE 1 : Electrophorèse en gel d'agarose

1 - Réactifs

TAE concentré (utilisé dilué dix fois) :

Tris base	54 g
Acide borique	27,5 g
EDTA	1 mM

Gel d'agarose :

Le gel utilisé est à 1% d'agarose.
Peser la quantité requise d'agarose.
Ajouter le volume nécessaire de TBE dilué et porter à ébullition.

Tampon de dépôt (utilisé dilué six fois, soit 2 μ l pour 10 μ l d'échantillon) :

Bleu de bromophénol	0,25%
Xylène cyanol FF	0,25%
Sucrose	40%

Stocker à 4°C.

Bromure d'éthidium : 10 mg/ml

2 - Méthode

Laisser refroidir le gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium, en dessous de 50°C, couler dans le moule et insérer un peigne afin de former des puits.

Oter le peigne après complet refroidissement de l'agarose et placer le gel dans une cuve à électrophorèse horizontale, contenant du tampon TBE dilué.

Déposer dans les puits les échantillons, contenant 1/5 volume de tampon de dépôt.

Un voltage de 20 à 70 Volts est appliqué, le bleu de bromophénol et le xylène cyanol permettent de visualiser deux fronts de migration, le gel est observé sous lumière ultraviolette.