

Programme herpèsvirus

Synthèse des travaux réalisés
au laboratoire IFREMER de La Tremblade

Mars 1996 - Février 1997

Tristan RENAULT

IFREMER, Responsable du Programme Herpèsvirus à La Tremblade

Rose-Marie LE DEUFF

IFREMER, CDD financé par la Région Poitou - Charentes

Cécile LIPART

SMIDAP, CDD financé par la Région Pays de la Loire

Bruno CHOLLET

IFREMER, Cellule de Veille Zoosanitaire de La Tremblade

Philippe HAFFNER

IFREMER, Equipe de Pathologie de La Tremblade

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie

B.P. 133 - 17390 La Tremblade



Préambule

Les travaux rapportés dans ce rapport et réalisés au laboratoire IFREMER de La Tremblade (GAP) ont pu être menés à bien grâce au soutien financier de la Région Poitou-Charentes (Plan Etat/Région, convention n° 96/RPC-R62 et recrutement d'un post-doctorant, convention n° 96/RPC-R16) et de la Région Pays de la Loire (recrutement d'un technicien en contrat à durée déterminée, financé par le SMIDAP et détaché au laboratoire GAP). Ils ont également bénéficié d'une Décision d'Aide à la Recherche (n° 95-07-01) dans le cadre des Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation alloués par la Mission interministérielle de la Mer.

Outre les auteurs de ce rapport, différentes personnes ont participé à la réalisation de ce travail dans le cadre de la production et de l'élevage des naissains (éclosoirs et ostréiculteurs professionnels, station IFREMER de Bouin), du suivi des productions (SMIDAP) ainsi que par leur soutien technique (écloserie IFREMER de La Tremblade) et scientifique (C. Delsert, station IFREMER de Sète).

Les auteurs de ce rapport tiennent également à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Ce rapport représente la synthèse des travaux réalisés de mars 1996 à février 1997 au laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie de la station IFREMER de La Tremblade, dans le cadre de l'étude du virus de type herpès observé chez les huîtres et de la mise au point de méthodes de diagnostic. La majorité des travaux rapportés ici de façon complète, a déjà fait l'objet de comptes rendus intermédiaires :

- "Note de synthèse des résultats obtenus concernant la mise au point de méthodes de diagnostic du virus de type herpès", compte rendu des travaux réalisés pour la période mars - avril 1996, 13 pages.
- "Note de synthèse des résultats obtenus concernant l'étude du virus de type herpès et la mise au point de méthodes de diagnostic de l'infection", compte rendu des travaux réalisés pour la période avril - mai 1996, 36 pages.
- "Synthèse des résultats obtenus concernant l'étude du virus de type herpès et la mise au point de méthodes de diagnostic de l'infection", compte rendu des travaux réalisés pour la période juin - septembre 1996, 41 pages.

En outre, un des aspects non négligeables du travail réalisé au cours de cette période mais qui n'est pas rappelé dans ce rapport, a concerné la formation interne des agents IFREMER des Cellules de Veille Zoosanitaire de La Trinité, La Tremblade et Palavas à l'utilisation de la technique de PCR. Une journée d'information a également été consacrée au

SMIDAP. Les journées de formation interne et d'information ont fait l'objet d'une rédaction de documents de travail :

- "Session de formation à l'utilisation de la technique PCR pour le diagnostic de l'infection chez les huîtres - De la grande théorie aux petites recettes", session de formation des 23 et 24 avril 1996, 46 pages.

- "Infection à herpèsvirus chez les huîtres : résultats, applications et perspectives", réunion d'information IFREMER-SMIDAP du 22 mai 1996, 74 pages.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
<u>I - RAPPEL DES TRAVAUX CONCERNANT L'HERPESVIRUS OBSERVE CHEZ LES HUITRES. AOUT 1995 - FEVRIER 1996</u>	3
<u>II - RAPPELS SUR LES CARACTERISTIQUES DES VIRUS APPARTENANT A LA FAMILLE DES HERPESVIRIDAE</u>	7
II.1 - PROPRIETES GENERALES DES VIRUS APPARTENANT A LA FAMILLE DES HERPESVIRIDAE	7
II.2 - CLASSIFICATION DES HERPESVIRIDAE	8
II.3 - MORPHOLOGIE ET COMPOSITION DES PARTICULES VIRALES	9
II.4 - REPLICATION	10
<u>III - TECHNIQUE DE PCR APPLIQUEE A LA DETECTION DU VIRUS DE TYPE HERPES : MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE ET ESSAIS D'AMELIORATION DU PROTOCOLE ETABLI</u>	11
III.1 - MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE DETECTION DE L'ADN VIRAL PAR PCR	11
III.1.1 - OBTENTION D'ADN VIRAL CLONE	11
III.1.2 - SEQUENÇAGE ET DETERMINATION DE COUPLES D'AMORCES POUR LA PCR	11
III.1.3 - TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET REACTION DE PCR	13
III.2 - ESSAIS D'AMELIORATION DU PROTOCOLE DE PCR	15
III.2.1 - EFFET INHIBITEUR DES SURNAGEANTS DE BROUILLONS DE NAISSAIN	15
III.2.2 - EFFET INHIBITEUR DES PRODUITS DE LA REACTION DE PCR1 SUR LA REACTION DE PCR218	18
III.2.3 - QUANTITE D'ADN POLYMERASE UTILISEE PAR TUBE DE REACTION	18
III.2.4 - NOMBRE DE CYCLES	21
III.2.5 - CONCLUSION	21
III.3 - CONTROLE DE LA SPECIFICITE DE LA DETECTION PAR PCR POUR LE VIRUS DE TYPE HERPES DECRIT CHEZ LES HUITRES	23
<u>IV - UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE PCR POUR RECHERCHER L'ADN VIRAL DANS DES ECHANTILLONS D'HUITRE (LARVES ET NAISSAIN)</u>	24
IV.1 - ANALYSES EFFECTUEES DANS LE CADRE D'EXPERIMENTATIONS REALISEES EN BAIE DE PEN BE (SMIDAP)	24
IV.2 - RESULTATS DES ANALYSES REALISEES DANS LE CADRE DE LA CELLULE DE VEILLE	37

<u>V - UTILISATION DU PROTOCOLE DE PCR POUR PREPARER DES REACTIFS DE DIAGNOSTIC SPECIFIQUE ET ETUDIER LE VIRUS</u>	40
V.1 - PREPARATION DE SONDAS MARQUEES A LA DIGOXIGENINE ET SOUTHERN BLOTTING	40
V.1.1 - PREPARATION D'UNE SONDE MARQUEE A LA DIGOXIGENINE PAR PCR	40
V.1.2 - ANALYSE DE LA SPECIFICITE DE LA SONDE PRODUITE	40
V.1.3 - ANALYSE DE PRODUITS DE PCR EN SOUTHERN BLOTTING	43
V.2 - SEQUENÇAGE PARTIEL D'UN FRAGMENT AMPLIFIE PAR PCR	45
<u>VI - ESSAIS DE REPRODUCTION EXPERIMENTALE DE LA MALADIE</u>	46
VI.1 - NAISSAIN D'HUITRE CREUSE	46
VI.2 - LARVES DE PALOURDE JAPONAISE	52
<u>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES DU PROGRAMME HERPESVIRUS A LA TREMBLADE</u>	56
<u>ANNEXE : PROTOCOLE DE PCR OPTIMISE - RECOMMANDATIONS</u>	57

Introduction

Introduction

Parmi les maladies infectieuses observées chez les mollusques bivalves marins, les viroses sont souvent mal connues, en raison d'une certaine inadéquation des techniques d'identification et de diagnostic généralement mises en oeuvre lors de phénomènes de mortalité. En effet, la microscopie photonique a été et reste encore, dans de nombreux laboratoires travaillant sur les pathologies des mollusques, la technique de base pour l'analyse des échantillons. Cette technique reste insuffisante en cas de pathologie d'origine virale si elle n'est pas complétée par d'autres approches (microscopie électronique à transmission, recherche d'effets cytopathogènes sur monocouches cellulaires et réactifs de diagnostic spécifiques). Aucune lignée de mollusques bivalves n'est à l'heure actuelle disponible, et la recherche d'éventuels effets cytopathogènes dus à des virus est donc impossible en système homologue. De plus, aucun outil de diagnostic spécifique de virus d'huître (anticorps ou sondes nucléiques) n'était jusqu'alors disponible.

Depuis 1991, de fortes mortalités sporadiques de larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été observées, au cours de l'été, dans différentes écloséries françaises. Ces mortalités ont été associées à la détection d'un virus en microscopie électronique à transmission. Ce dernier, du fait de ces caractéristiques morphologiques et de son cycle de développement semble apparenté à la famille des *Herpesviridae*. Le pouvoir pathogène de cet agent viral a été démontré au laboratoire par reproduction expérimentale de mortalité sur larves axéniques. Par ailleurs, des mortalités concomitantes ont été rapportées chez les larves des deux espèces *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*, élevées dans les mêmes installations, avec détection chez ces deux espèces d'un virus de type herpès.

De fortes mortalités sporadiques ont également été observées au cours des étés 1993, 1994, 1995 et 1996 sur des lots particuliers de naissains d'huître creuse, produits en écloséries ou provenant de captage naturel. Pour ces animaux de moins d'un an, il a été possible de détecter un virus de type herpès comparable à celui mis en évidence chez les larves. Cependant, dans ce cas, la démonstration du pouvoir pathogène de ce virus (reproduction expérimentale de mortalités sur animaux sains à partir de matériel biologique infecté) nécessite des travaux complémentaires.

La difficulté de l'étude de ce virus réside non seulement dans l'impossibilité actuelle de pouvoir le cultiver *in vitro*, mais également aussi dans ses caractéristiques biologiques. En effet, les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* peuvent exister dans les cellules de l'hôte sous plusieurs formes : une forme latente, une forme peu productive et une forme d'infection aiguë.

En phase de latence (absence de symptôme et de mortalités), le virus n'est présent que sous forme d'ADN, intégré au génome de l'hôte ou sous formes circulaires dans la cellule. Au cours de cette phase, les particules virales ne sont pas produites.

Dans d'autres cas, le virus peut se multiplier de façon limitée. Un cycle viral peu productif donne aboutit à un nombre réduit de virions qui ne sont que difficilement détectés en microscopie électronique. De plus, ce cycle viral peu productif n'induit pas nécessairement une infection clinique.

Dans la forme aiguë, forme observée chez les larves et le naissain, la multiplication intense du virus aboutit à une maladie clinique.

Les deux premières formes d'infection virale (latente et peu productive) sont supposées exister chez les huîtres adultes, le virus pouvant alors être transmis à la descendance sous forme activée mais encore peu productive. Chez les larves, le virus transmis pourra soit se multiplier et induire une infection, soit passer à un état de latence en l'absence de tout signe particulier. De ce fait, le développement ultérieur de la maladie dans un lot d'animaux au stade naissain peut correspondre soit à l'activation d'un virus déjà présent chez certains individus sous une forme latente, soit à une contamination par le virus sous forme de particules infectieuses produites par des huîtres voisines malades. Toutefois, si les conditions sont défavorables à la multiplication du virus, celui-ci peut retourner à une phase de latence.

Pour pallier les difficultés du diagnostic de l'infection à herpèsvirus chez les huîtres, divers travaux ont été entrepris et poursuivis au sein du Laboratoire IFREMER GAP, afin de développer des techniques de diagnostic adaptées et sensibles, tout particulièrement à l'aide de la biologie moléculaire et de démontrer le pouvoir pathogène de l'agent viral sur les stades naissain.

I - Rappel
des travaux concernant l'herpèsvirus
observé chez les huîtres.
Août 1995 - Février 1996.

I. - Rappel des travaux concernant l'herpèsvirus observé chez les huîtres. Août 1995 - Février 1996

Les travaux concernant le virus de type herpès, observé chez les huîtres, ont permis d'aboutir, en août 1995, à la mise au point d'un protocole de purification du virus, malgré l'ensemble des difficultés rencontrées (impossibilité de reproduire le virus sur lignées cellulaires, dépendance vis à vis des professionnels pour l'approvisionnement en matériel infecté et difficulté de planifier les expériences). Le point de blocage que représentait l'obtention de particules virales en nombre suffisant pour le développement d'outils de diagnostic fiables et sensibles a été levé.

Etude des cas de mortalités

L'étude de ces cas concerne essentiellement l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, pour l'année 1995, avec comme objectif fixé d'essayer de préciser les relations mortalités et infection à virus de type herpès. 2378 huîtres (stade naissain) provenant de l'ensemble du littoral français ont ainsi été analysées sur coupes histologiques. 206 individus présentaient des anomalies cellulaires et nucléaires laissant suspecter une infection virale à herpèsvirus. Ces animaux provenaient de 52 lots différents.

Essais de reproduction de l'infection virale

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

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

Quelques essais ont été également réalisés sur naissains et adultes. Dans ce cas, aucune mortalité n'a été observée.

L'ensemble des observations réalisées, ainsi que les données fondamentales concernant le cycle des *Herpesviridae* (Figure 1), permettent de dessiner un schéma résumant les différents modes de transmission possibles du virus de type herpès chez les huîtres (Figure 2).

Purification

Il a été possible de purifier à plusieurs reprises des particules virales à partir de larves infectées fraîches. Cependant, le même protocole testé sur des lots de naissains présentant des mortalités anormales n'a pas permis d'aboutir à un résultat probant. Par ailleurs les essais effectués à partir de larves ou de naissains infectés conservés congelés à -20°C, ont été infructueux.

Extraction de l'ADN viral, clonage et séquençage

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

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

- De cloner des fragments de l'ADN extrait des particules virales purifiées, après digestion par l'enzyme *EcoRI*. Le clonage a été réalisé en plasmide Bluescript KS II(-). Ce type de clonage permet d'obtenir relativement rapidement des sondes nucléiques adéquates pour l'obtention d'outils spécifiques de diagnostic. Quatre des fragments clonés ont été choisis en fonction de leur longueur différente, afin de vérifier leur spécificité. Les premiers essais d'hybridation sur membrane ont donné des résultats positifs. En effet, les quatre fragments testés donnent un marquage net sur les ADN extraits de larves et de naissains infectés et pas de marquage sur de l'ADN extrait d'huîtres creuses adultes saines.

- Suite à ces résultats, le séquençage partiel d'un des fragments clonés a permis de définir des zones propices à la construction de couples d'amorces pour la PCR (Polymerase Chain Reaction). Nous disposons à l'heure actuelle d'amorces qui nous permettent d'obtenir une amplification claire sur ADN viral purifié, sur ADN extraits de larves infectés, sur broyats de larves et de naissains infectés et une absence d'amplification sur ADN d'huîtres adultes saines. Une méthodologie a été ainsi définie au laboratoire de La Tremblade pour le traitement des échantillons de larves et de naissain présentant des mortalités.

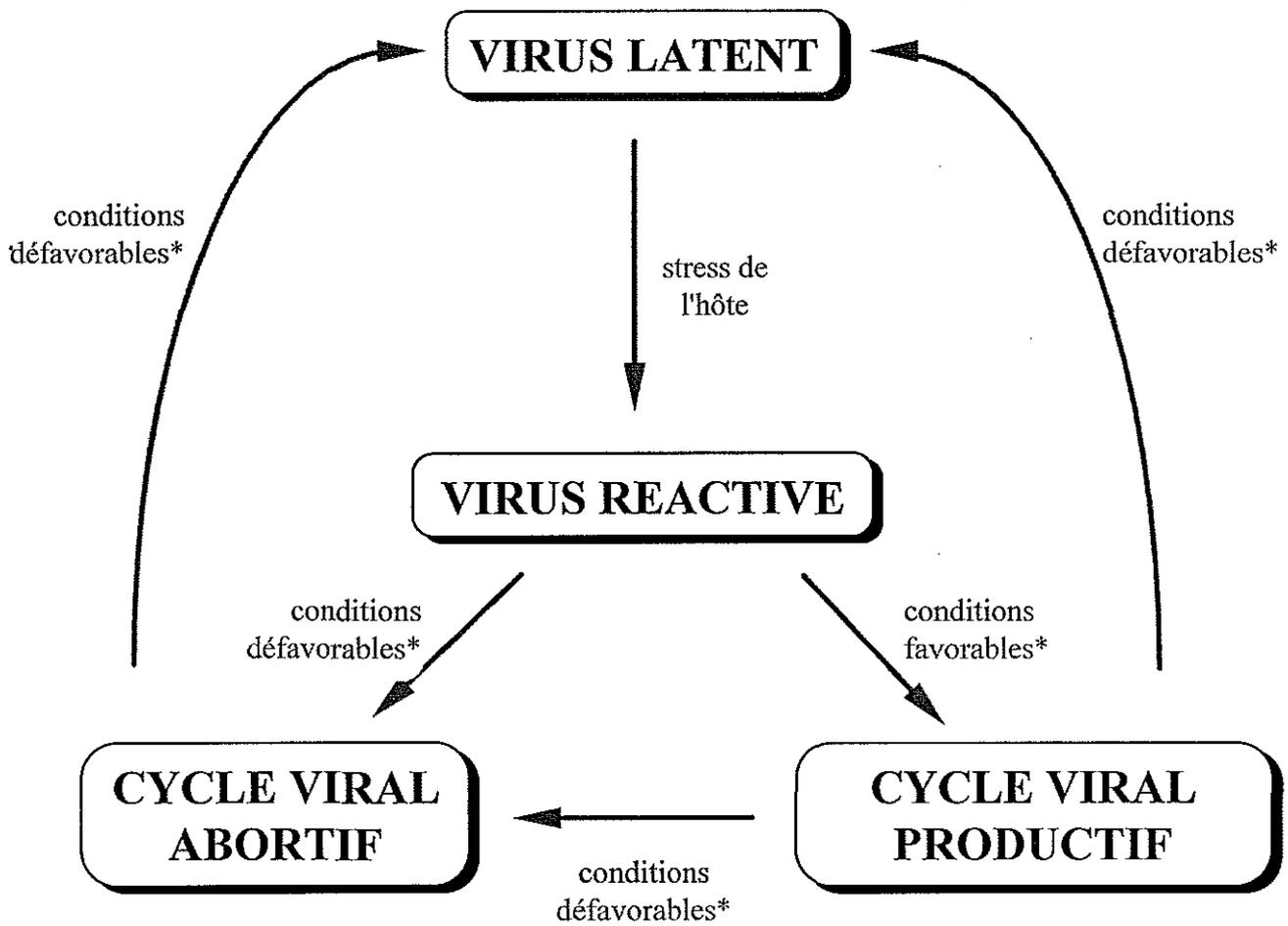
- D'envoyer au Dr A. Davison (Medical Research Council Virology Unit, Glasgow) de l'ADN viral extrait de particules purifiées afin qu'il puisse réaliser le séquençage complet du génome viral et le comparer à d'autres virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*.

Obtention d'anticorps spécifiques du virus

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

Figure 1

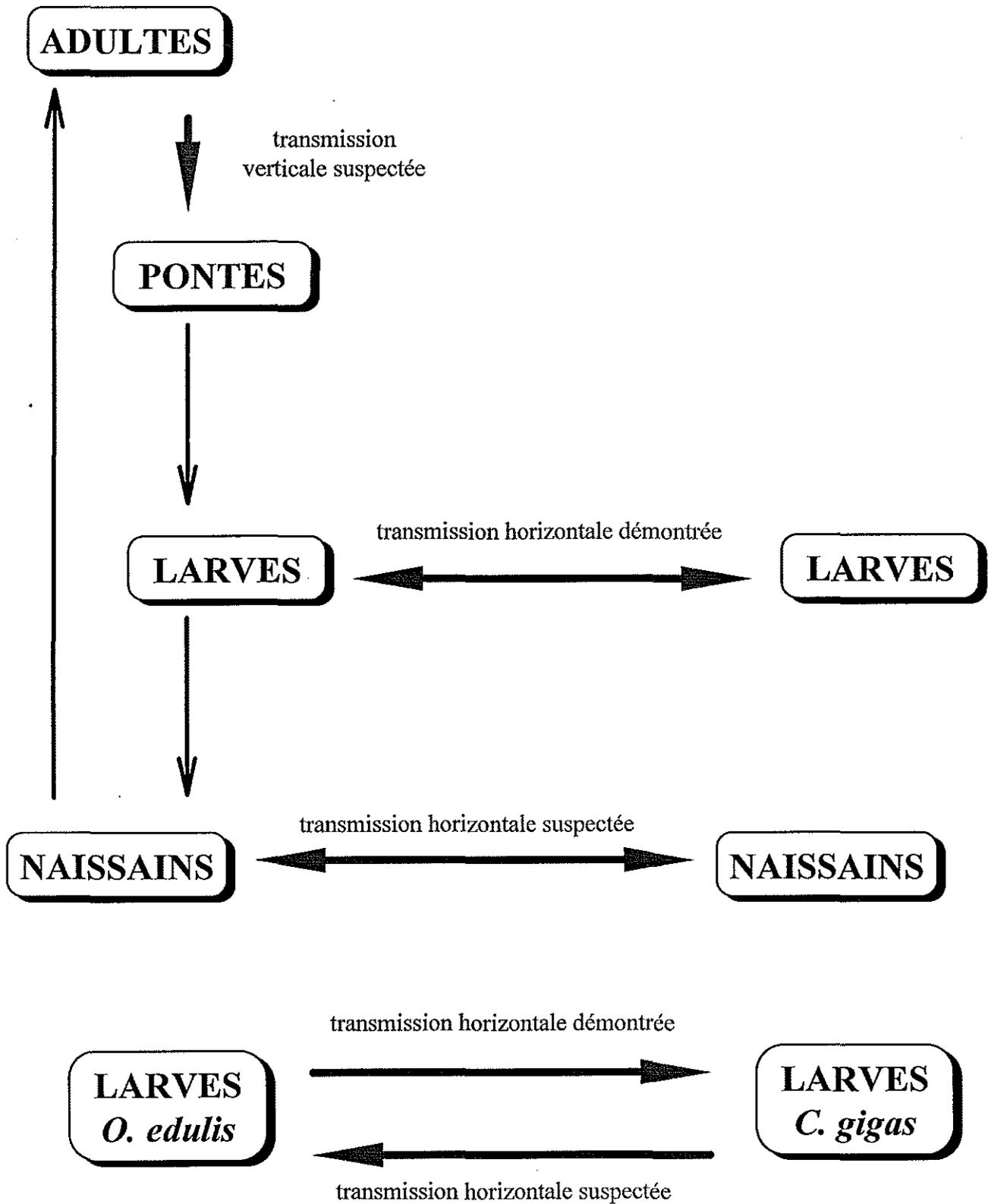
Cycle des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*



*conditions favorables/défavorables pour le virus

Figure 2

Modes de transmission du virus de type herpès chez les huîtres



II - Rappels
sur les caractéristiques des virus
appartenant à la famille des
Herpesviridae

II - Rappels sur les caractéristiques des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*

Les caractères généraux des virus apparentés à la famille des *Herpesviridae* sont rapportés ici de façon synthétique, afin de rappeler certaines particularités importantes de ces agents.

II.1 - Propriétés générales des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*

- ❖ **Matériel génétique** : ADN double brin linéaire contenu dans le core ou nucléoïde.
- ❖ **Capside** à symétrie icosaédrique constitué de 162 capsomères et assemblée dans le noyau de la cellule.
- ❖ **Enveloppe** dérivée de la cellule.
- ❖ **Famille très vaste**, plus de 80 virus différents recensés.
- ❖ **Virus ubiquitaires**, rencontrés chez de nombreuses espèces différentes.

*

Homme, les principaux virus sont : Herpès simplex 1, Herpès simplex 2, Cytomégalovirus, Virus de la varicelle et du zona et Virus d'Epstein-Barr.

Primates, au moins 30 virus différents chez différentes espèces : singe vert, singe rhésus, macaque, babouin, capucin, gorille, tamarin, singe écureuil, orang-outan, chimpanzé, ouistiti, atèle.

Autres mammifères : équidés, bovins, ovins, caprins, porcs, cervidés, chiens, cochon d'Inde, hamster, éléphant, félins, lapins, wallaby, marmotte, souris, rat, phoque, écureuil.

Oiseaux : canard, aigle, cigogne, pigeon, faucon, poulet, grue, dinde, caille, cormoran, perroquet, pingouin, hibou.

Amphibiens et reptiles : grenouille, boa, cobra, tortue, iguane, lézard.

Poissons : carpe, brochet, poisson chat, turbot, salmonidés, anguille.

Mollusques : huître américaine, huître japonaise, huître plate européenne (virus apparentés).

* liste non exhaustive

- ❖ Grande variété de cellules cibles et spécificité large ou restreinte avec cycle de multiplication plus ou moins rapide selon les virus.
- ❖ Induction de **tumeurs** par certains virus.
- ❖ Capacité de rester en phase de **latence** chez l'hôte : caractère ubiquitaire.

II.2 - Classification des Herpesviridae

3 sous familles* : *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae*.

❖ *Alphaherpesvirinae* :

- ◆ Variabilité d'hôtes.
- ◆ Cycle de multiplication relativement court.
- ◆ Développement rapide *in vitro*.
- ◆ Destruction des cellules infectées.
- ◆ Etablissement d'infections latentes au niveau des ganglions en premier lieu.

❖ *Betaherpesvirinae* :

- ◆ Variabilité d'hôtes limitée.
- ◆ Cycle de multiplication long.
- ◆ Développement lent *in vitro* - Cytomégalie.
- ◆ Etablissement d'infections latentes (glandes sécrétrices, reins, etc ...).

❖ *Gammaherpesvirinae* :

- ◆ Variabilité d'hôtes limitée à la famille à laquelle appartient l'hôte naturel (reproduction expérimentale).
- ◆ Réplication dans les cellules lymphoblastoïdes et cycle lytique dans certaines cellules épithéloïdes et fibroblastiques *in vitro*.
- ◆ Virus spécifiques des lymphocytes T ou B, souvent sans production de particules filles.
- ◆ Latence fréquente dans les tissus lymphoïdes.

* Ces sous familles virales ont été établies d'après des critères biologiques (cytopathologie, tropisme, réplication, latence...). Néanmoins, une autre classification, qui elle ne tient compte que de critères moléculaires (structure du génome, arrangement des séquences uniques et répétées), permet de diviser les *Herpesviridae* en cinq groupes : A, B, C, D et E. Dans chacun de ces groupes, il est possible de trouver des virus appartenant aux trois sous familles α , β , γ , ou même des virus dits orphelins (non apparenté à une des trois sous familles déjà définies). Cette particularité illustre à la fois la variété et la complexité de la famille des *Herpesviridae*.

11.3 - Morphologie et composition des particules virales

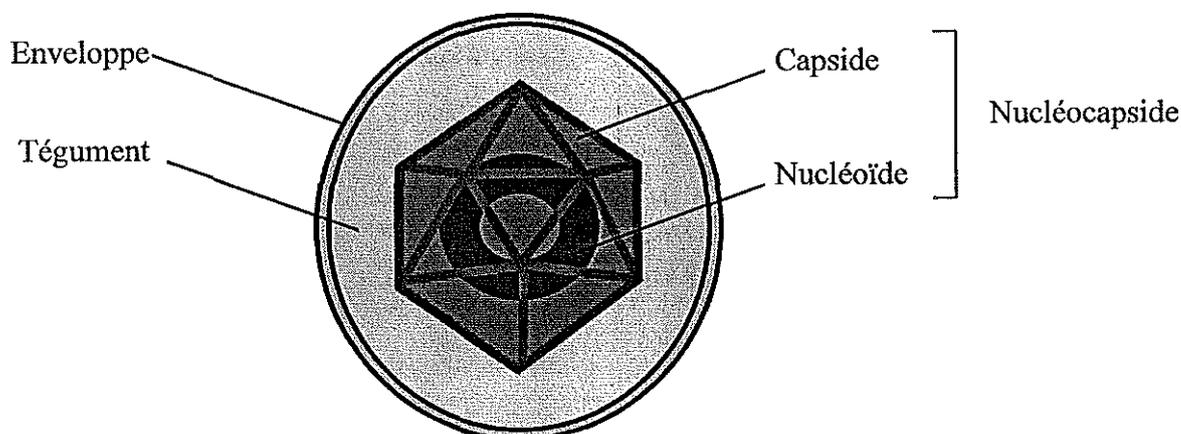
Les particules virales sont composées de quatre éléments : le nucléoïde (ou core), la capsid, le tégument et l'enveloppe (Figure 3). Les particules virales complètes ont un diamètre de 100 à 200 nm.

- ❖ **Le nucléoïde** : structure opaque aux électrons en microscopie électronique à transmission, constituée de l'assemblage de l'ADN viral et de protéines.
- ❖ **La capsid** : contient le nucléoïde lorsqu'il est présent (nucléocapside). De symétrie icosaédrique, elle est composée de 162 capsomères.
- ❖ **Le tégument** : correspond à la structure fibreuse, localisée entre la capsid et l'enveloppe. Cette dernière est répartie de façon asymétrique autour de la nucléocapside.
- ❖ **L'enveloppe** : est la structure la plus externe des virions et est indispensable à l'infectiosité des particules virales. Elle confère lorsqu'elle est intègre, une morphologie sphérique. Elle dérive de membranes cellulaires modifiées par l'insertion de protéines virales et porte des protrusions à sa surface.

Les particules virales contiennent un acide nucléique de type ADN double brin linéaire (120 à 220 kpb, soit 80 à 150 10^6 Da). Les protéines de structures sont en nombre variable de 15 à 35, avec des tailles allant de 12 à 220 kDa. Des lipides sont également présents dans les particules virales et sont localisés au niveau de l'enveloppe, de même que la plupart des glycoprotéines virales.

Figure 3

Structure d'une particule virale de type herpès



II.4 - Réplication

❖ Organisation du génome

Présence de séquences uniques et de séquences répétées qui selon leur arrangement permettent de distinguer cinq types différents de virus : A, B, C, D et E.

❖ Entrée du virus dans la cellule

- ◆ Attachement du virus sur des récepteurs cellulaires (spécificité).
- ◆ Fusion des membranes cellulaires et virales (glycoprotéines d'enveloppe).
- ◆ Entrée des nucléocapsides dans le cytoplasme de la cellule et transport jusqu'à la membrane nucléaire (pores).
- ◆ Pénétration de l'ADN viral dans le noyau par des phénomènes actifs.

❖ Synthèses virales

- ◆ Transcription de l'ADN viral dans le noyau, par la RNA polymérase II.
- ◆ Synthèses de protéines virales à partir d'ARNm viraux dans le cytoplasme de la cellule hôte.
- ◆ Expression des gènes viraux en cascade.
- ◆ Réplication de l'ADN viral relativement précocement, dans le noyau des cellules infectées.

❖ 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 de la membrane interne du noyau.
- ◆ Passage dans le cytoplasme (vésicules).
- ◆ Libération des particules par la cellule infectée.

❖ Phénomène de latence

- ◆ Capacité commune à tous les herpèsvirus de persister sous forme latente pendant toute la vie de l'hôte.
- ◆ Présence d'ADN viral en absence de production de particules virales chez l'hôte (ADN intégré au génome de la cellule hôte ou sous forme circulaire, libre dans le noyau de la cellule).
- ◆ Localisation de la latence à des tissus particuliers à chaque virus.
- ◆ Réactivation du virus suite à un facteur de stress physique ou émotionnel, ou sous l'action de composés chimiques, d'hormones ou d'autres molécules biologiques.

III - Technique de PCR
appliquée à la détection du
virus de type herpès :
mise au point d'un protocole et essais
d'amélioration du protocole établi

III - Technique de PCR appliquée à la détection du virus de type herpès : mise au point d'un protocole et essais d'amélioration du protocole établi

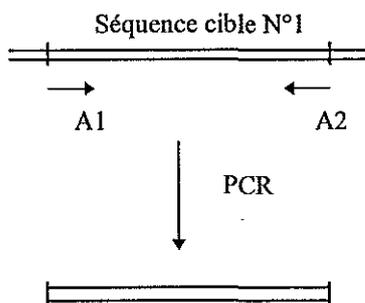
III.1 - Mise au point d'un protocole de détection de l'ADN viral par PCR

III.1.1 - Obtention d'ADN viral cloné

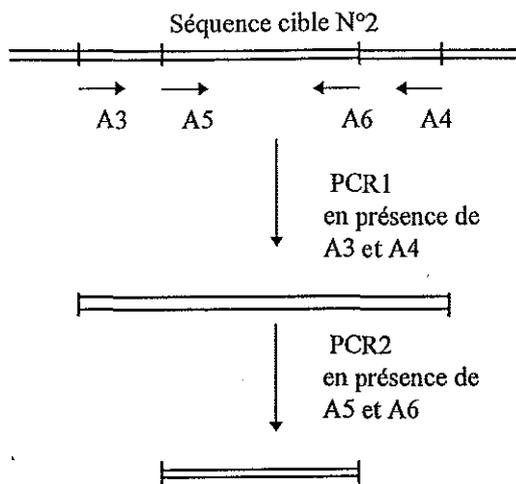
La purification des particules virales à partir de larves de *Crassostrea gigas* infectées à la fin de l'été 1995 a permis d'extraire l'ADN viral. Cet ADN, dont la taille a été estimée à 180 kpb (ou 0,2 fg ou $1,2 \cdot 10^8$ Da), a été cloné dans un plasmide, sous forme de fragments (fragments de restriction *EcoRI*) de 1 à 4 kpb. Les fragments clonés d'ADN viral peuvent être produits à volonté dans des bactéries transformées, c'est à dire dans lesquelles les plasmides recombinants ont été introduits et peuvent se multiplier.

III.1.2 - Séquençage et détermination de couples d'amorces pour la PCR

Parmi les fragments clonés d'ADN viral, certains ont été séquencés partiellement. Des séquences cibles pour l'amplification par PCR ont été choisies dans ces séquences d'ADN viral, puis plusieurs couples d'amorces (A1+A2 ; A3+A4 ; A5+A6) ont été déterminés en fonction de ces séquences cibles (C. Delsert, IFREMER Sète).

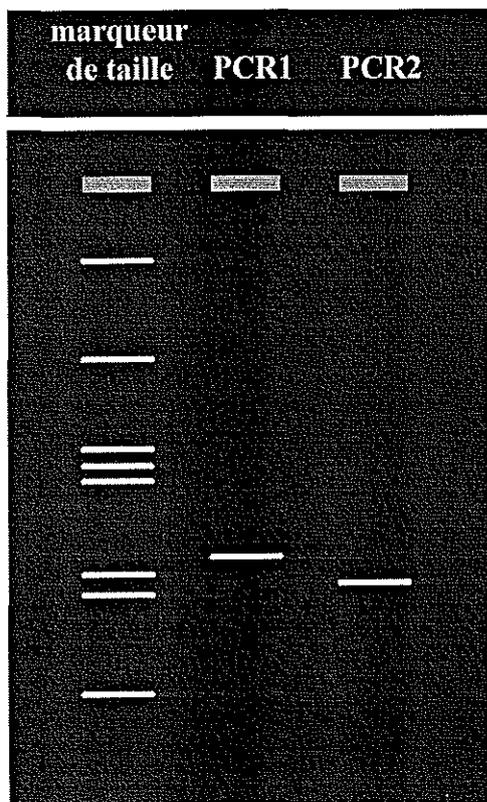


Le premier couple (A1+A2) testé n'a pas été retenu, car la sensibilité de l'amplification ne s'est pas avérée suffisante. De plus, du fait de leurs séquences, la spécificité de ces amorces n'était pas satisfaisante. En effet, si un fragment spécifique était amplifié à partir d'ADN viral, de façon intense, plusieurs autres fragments d'intensité plus faible et de taille différente étaient amplifiés à partir d'ADN de *Crassostrea gigas*.



Les deux autres couples d'amorces (A3+A4 et A5+A6) permettent l'amplification de séquences cibles de l'ADN viral de façon spécifique. Un seul fragment est amplifié pour chacun de ces couples d'amorces en présence d'ADN viral. Aucune amplification non spécifique n'est visible à partir d'ADN de *Crassostrea gigas* ou d'*Ostrea edulis*.

Ces couples d'amorces sont utilisés dans une réaction de nested PCR. Celle-ci consiste à réaliser une première amplification par PCR en présence du couple d'amorces A3+A4. Puis, 1µl des produits de cette première PCR est utilisé pour réaliser une deuxième amplification en présence du couple d'amorce A5+A6. La méthode de nested PCR permet ainsi d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la détection du virus dans des échantillons.



Les produits de PCR sont visualisés après électrophorèse en gel d'agarose 1%, coloré au bromure d'éthidium.

III.1.3 - Traitement des échantillons et réaction de PCR

Nous avons fait le choix de présenter les résultats concernant l'élaboration de protocoles de PCR en deux parties (mise au point et améliorations) afin que le lecteur puisse mieux comprendre la démarche de ce travail et les conclusions qui en ont été déduites.

Différents essais ont conduit, dans un premier temps, au protocole initial indiqué ci-dessous. Ce protocole permettait de détecter 5×10^6 copies de génome viral dans des échantillons de naissain. Il a fait ensuite l'objet d'améliorations (voir partie III.2) afin d'abaisser le seuil de détectabilité de l'ADN viral.

Dans un souci de clarté, le protocole optimisé, utilisé à l'heure actuelle au laboratoire IFREMER de La Tremblade, est rappelé à nouveau sous forme d'annexe accompagnée de recommandations techniques.

Traitement des échantillons de larves

50 mg de larves sont pesés en portant des gants et à l'aide d'une pipette Pasteur neuve. Les larves sont ensuite broyées en présence de 50 μ l d'eau bidistillée, dans un microtube de type Eppendorf, à l'aide d'un piston Pellet à usage unique. Ce broyat est placé au bain-marie bouillant 10 minutes, puis centrifugé (8000 rpm, 5 mn) et congelé à -20 °C.

Traitement des échantillons de naissain (animaux de moins de 3 mm)

Les animaux de moins de 3 mm peuvent difficilement être ouverts, ils sont donc broyés avec la coquille de la façon suivante. Les animaux (30 individus) sont séchés sur du papier absorbant, puis ils sont réunis par pools de 5 (6 pools) dans des tubes Eppendorf. Dans le même temps, ils sont pesés (X g).

Ces animaux sont broyés en présence de X ml d'eau bidistillée, dans un microtube de type Eppendorf, à l'aide d'un piston Pellet à usage unique. Le broyat obtenu est placé au bain-marie bouillant 10 minutes, puis centrifugé (8000 rpm, 5 mn) et congelé à -20 °C.

Traitement des échantillons de naissain (animaux de plus de 3 mm)

Un échantillon de 30 animaux est analysé, quelle que soit leur taille. Ces animaux sont traités par pools de 5. Le traitement de ces pools et, en particulier, le broyage en eau bidistillée tient compte du poids de chair obtenu (0,5 ml pour 0,5 g de tissus ou X ml pour X g de tissus) de façon à "standardiser" le protocole.

30 animaux sont ouverts à l'aide d'un couteau à huître, au préalable longuement lavé, ou d'une lame de scalpel neuve. Les huîtres sont séchées sur du papier absorbant, puis elles sont réunies par pools de 5 (6 pools) dans des boîtes de Pétri. Les tissus sont dilacérés très finement à l'aide de lames de rasoir, puis conservés sur glace. Les lames ainsi que les gants sont changés entre chaque pool. 0,5 g (ou X g si les animaux sont petits) de tissus dilacérés sont pesés à l'aide d'une pipette Pasteur neuve. Ces tissus sont broyés en présence de 0,5 ml (ou X ml) d'eau distillée, dans un microtube de type Eppendorf, à l'aide d'un piston Pellet à usage unique. Le broyat obtenu est placé au bain-marie bouillant 10 minutes, puis centrifugé (8000 rpm, 5 mn) et congelé à -20 °C.

Réaction de PCR

Un certain nombre de précautions doivent être prises. Globalement, ces précautions concernent l'utilisation d'un matériel adapté (gants, matériel jetable, cônes à filtres, etc...) et d'équipements réservés à l'usage exclusif de la PCR (pipettes, paillasses,...).

De plus, il faut souligner l'importance de séparer les différentes étapes de l'analyse d'échantillons par PCR dans différentes pièces, de façon à limiter les contaminations entre différents lots ou la contamination des réactifs et du matériel. Ainsi, trois pièces sont nécessaires :

- une pièce réservée à la préparation des échantillons,
- une autre réservée à la préparation des réactifs,
- une troisième pour la mise en oeuvre de la réaction et la manipulation des produits de réaction.

Des témoins négatifs (eau bidistillée) sont réalisés : un témoin entre chaque lot de naissain ou tous les 10 lots de larves, plus le premier et l'avant dernier tube de la série. Un autre témoin négatif est réalisé (un tube), il contient de l'ADN extrait d'huîtres saines, *C. gigas* ou *O. edulis*. Un témoin positif correspondant à 5.10^7 copies de génome viral, est réalisé, c'est le dernier tube.

1 μ l du surnageant de chaque broyat ou des témoins est utilisé pour réaliser la réaction de PCR1, en présence des amorces A3 et A4.

Le résultat de la réaction de PCR1 est analysé par électrophorèse en gel d'agarose :

- * Si une bande intense est visualisée sur gel, les produits de la réaction de PCR1 doivent être dilués au $1/50^e$ pour ne pas inhiber la réaction de PCR2.
- * Si la bande amplifiée est faible ou non visible, les produits de la réaction de PCR1 ne sont pas dilués.

1 μ l des produits de la réaction de PCR1, dilués ou non, est utilisé pour réaliser la réaction de PCR2.

Le résultat de la réaction de PCR2 est analysé par électrophorèse en gel d'agarose :

- * Témoins : les témoins négatifs doivent être négatifs (contrôle de l'absence de contaminations), les témoins positifs doivent être positifs (contrôle de la qualité de la réaction). Ceci est contrôlé en PCR1 et en PCR2.

Si ces deux critères ne sont pas remplis, les analyses ne peuvent et ne doivent pas être interprétées.

- * Echantillons : si une bande intense ou faible est visualisée sur gel, le résultat est positif. C'est à dire, l'ADN viral est présent dans l'échantillon analysé. Si aucune bande n'est visible, le résultat est négatif. Dans ce cas, rien ne permet d'affirmer que l'ADN viral est absent de l'échantillon. Il peut en effet être présent, mais en quantité trop faible pour être détectée.

III.2 - Essais d'amélioration du protocole de PCR

Différents paramètres ont été testés au laboratoire de La Tremblade afin d'améliorer la sensibilité et la reproductibilité du diagnostic par PCR de l'infection à herpèsvirus. Les essais ont porté sur la recherche d'un effet inhibiteur des surnageants de broyats de naissain sur la réaction de PCR ainsi que d'un effet inhibiteur des produits de PCR1 sur la réaction de PCR2, sur les quantités d'ADN polymérase à utiliser, sur le nombre de cycles d'amplification ainsi que sur la définition d'un témoin positif correspondant au seuil de détectabilité de l'ADN viral.

III.2.1 - Effet inhibiteur des surnageants de broyats de naissain

Pour rechercher un éventuel effet inhibiteur des surnageants de broyats sur la réaction de PCR, des essais ont été réalisés en utilisant des gammes de quantités connues d'ADN viral et des tissus de naissain indemne. Il a été ainsi possible de démontrer un effet inhibiteur net des broyats de tissus sur la réaction de PCR (Tableau 1). En effet, lorsqu'un μl de surnageant de broyat réalisé à partir de 6, 2 et 1 mg de tissus par μl d'eau bidistillée est introduit dans un tube de PCR, il est impossible de détecter 5.10^3 copies de génomes viraux en PCR2 et la détection de 5.10^4 , 5.10^5 et 5.10^6 copies est aléatoire. Par ailleurs, pour des broyats réalisés avec de plus petites quantités de tissus (0,1 mg, 0,05 mg et 0,01 mg), la réaction est positive en PCR2 pour 5.10^3 copies de génomes viraux par tube (résultat identique à celui obtenu en l'absence de surnageant de broyat). L'abaissement du seuil de détectabilité, en présence de plus faibles quantités de tissus, est de l'ordre d'un facteur 10 000 à 100 000 par rapport aux résultats obtenus jusqu'alors.

Tableau 1

Résultats obtenus en PCR2 en fonction de la quantité de tissus de naissain indemne incorporée dans le tube de réaction (1 μl de produit de PCR1 en PCR2)

Nombre de copies d'ADN viral/ Concentration des broyats de naissain (mg par μl)	5.10^3	5.10^4	5.10^5	5.10^6
6	-	-	-	+/-
2	-	-	-	+
1	-	+/-	+/-	+
0,5	+/-	+	+	+
0,1	+	+	+	+
0,05	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+
0 - Témoin	+	+	+	+

N.B. : +/-, résultat positif ou négatif en fonction des expériences

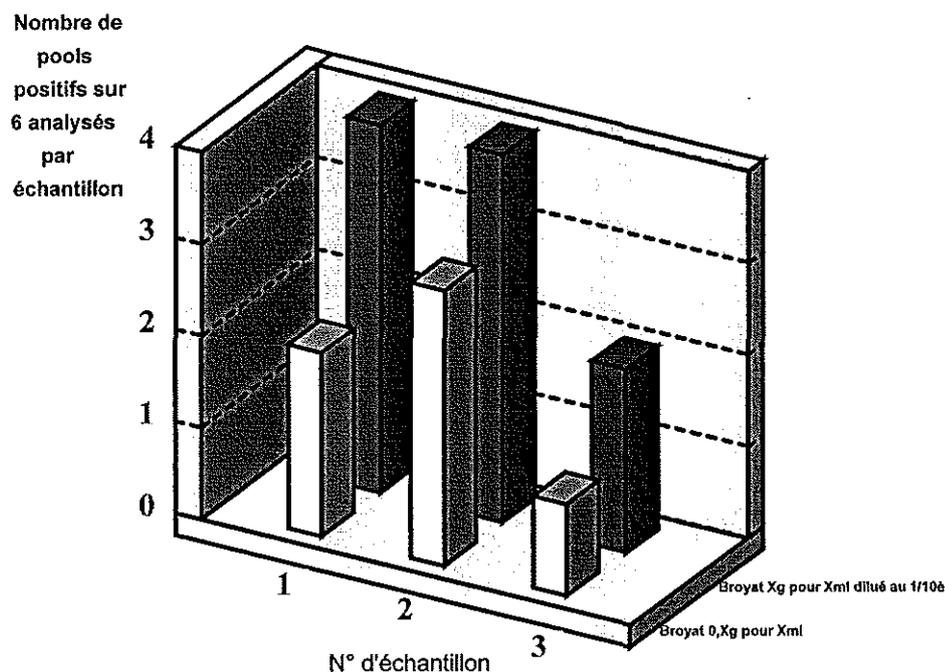
Pour limiter l'effet inhibiteur des surnageants de broyat au cours de la réaction de PCR et obtenir une amélioration de la détection de l'ADN viral d'un facteur de 10 000 à 100 000, il semblait donc nécessaire de limiter la quantité de tissus dans les tubes.

Dans un premier temps, des essais ont été réalisés en effectuant une dilution plus importante de l'échantillon (lots présentant des mortalités) par rapport à ce qui était préconisé dans le premier protocole de PCR. Les broyats ont été réalisés en utilisant 0, X g de tissus dilué dans X ml d'eau distillée, au lieu de X g dans X ml. Cette modification a permis d'obtenir une amélioration sensible au niveau de la détectabilité de l'ADN viral.

Cependant, l'amélioration obtenue n'étant pas aussi importante que celle escomptée, d'autres essais ont été alors entrepris. Les réactions de PCR ont été réalisées à partir de broyats effectués à partir de X g de tissus repris dans X ml d'eau distillée et dilué au 1/10^e avant leur utilisation. Les résultats obtenus dans ce cas sont meilleurs. En effet, il est possible d'obtenir plus de résultats positifs pour un lot donné en utilisant ce protocole qu'en utilisant directement des broyats faits avec 0, X g dans X ml d'eau (Figure 4). De plus, ce type de protocole facilite le broyage des tissus.

Figure 4

Résultats obtenus en PCR2 en fonction du protocole de préparation des échantillons (réalisation des broyats)



D'autres essais ont par ailleurs été réalisés afin de tenter de réduire l'effet inhibiteur du surnageant de broyat par un traitement au Chelex et à la protéinase K.

Des microbilles de Chelex (5% en eau bidistillée) additionnées au surnageant de broyat permettent d'éliminer les ions divalents, inhibiteurs potentiels de la réaction de PCR. Dans le même temps, de la protéinase K (10 mg/ml) est ajoutée au surnageant de broyat afin de digérer les protéines pouvant elles, présenter une activité inhibitrice de la PCR et/ou une activité de dégradation de l'ADN. Après incubation (56 °C, 4 h), la réaction est arrêtée par chauffage (100 °C, 15 mn). Puis, les microbilles sont éliminées par centrifugation (8000 rpm, 5 mn).

Un premier essai a été réalisé en utilisant 0,1 µl d'enzyme Taq polymérase (soit 0,5 unité) par tube de PCR et 1 mg de tissu par tube. La réaction de PCR a comporté 30 cycles. 0,1 µl de produits de la réaction de PCR1 a été utilisé en PCR2. Cette expérience a été conduite en parallèle sur des surnageants traités ou non traités par le Chelex et la protéinase K. Les résultats obtenus montrent que ce traitement n'améliore pas la détection du virus de type herpès en PCR (Tableau 2).

Toutefois, d'autres essais pourront être réalisés ultérieurement en appliquant les conditions optimales définies dans les paragraphes suivants concernant la quantité d'enzyme, le nombre de cycles de PCR et la quantité de tissus utilisée.

Tableau 2

**Effet du traitement des échantillons au Chelex et à la protéinase K
sur les résultats obtenus en PCR2
(0,1 µl de produit de PCR1 en PCR2 ; 0,1 µl d'enzyme/tube ; 30 cycles de PCR)**

N° de l'échantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total
1 mg de tissu traité au Chelex et à la protéinase K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1+/15
1 mg de tissu non traité (témoin)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	4+/15

III.2.2 - Effet inhibiteur des produits de la réaction de PCR1 sur la réaction de PCR2

Afin de vérifier si les produits de PCR1 pouvaient avoir un effet inhibiteur sur la réaction en PCR2, différents volumes (5, 1 et 0,1 µl) de la réaction 1 ont été testés pour effectuer la seconde amplification. Les résultats obtenus indiquent qu'un effet inhibiteur semble exister pour les volumes 5 et 1 µl (Tableau 3).

De ce fait, il a été choisi de ne prendre que 0,1 µl de produits de réaction de PCR1 pour réaliser la seconde amplification, quel que soit le résultat d'amplification obtenu en PCR1.

Tableau 3

Résultats obtenus en PCR2 en fonction du volume de produit de PCR1 utilisé
(pour 5.10^3 copies de génomes viraux)

Volume de produits de PCR1/ Concentration des broyats de naissain (mg par µl)	5 µl	1 µl	0,1 µl
6	-	-	(+/-)
2	-	-	+/-
0,1	-	-	+
0 - Témoin	-	-	+

N.B. : +/-, résultat positif ou négatif en fonction des expériences

III.2.3 - Quantité d'ADN polymérase utilisée par tube de réaction

Il avait été choisi dans un premier temps, par souci d'économie (prix élevé de l'enzyme), de n'utiliser que 0,1 µl d'ADN polymérase (soit 0,5 unité d'enzyme) par tube de PCR (PCR1 et PCR2). Des essais ont été réalisés afin de vérifier si cette quantité est adéquate et permet de disposer d'une méthode performante pour le diagnostic de l'infection virale. Ainsi, différents volumes d'enzyme par tube de PCR (0,1 µl ; 0,3 µl ; 0,5 µl et 0,8 µl) ont été testés sur des gammes de quantités connues d'ADN viral. Les résultats obtenus sont rapportés dans les Tableaux 4, 5 et 6. Dans un premier temps, nous avons fait varier de la même façon les quantités d'enzyme utilisées en PCR1 et en PCR2. Il apparaît que l'augmentation du volume d'enzyme utilisée par tube de PCR permet d'améliorer le niveau de détection de l'ADN viral de façon importante (Tableau 4).

Dans un second temps, des volumes d'enzyme différents ont été testés en PCR1 et en PCR2 afin de vérifier si l'effet de la quantité d'ADN polymérase utilisée était plus important pour la réaction 1 ou la réaction 2. Il semble qu'il soit préférable d'utiliser 2,5 unités d'enzyme aussi bien pour la première que pour la seconde réaction d'amplification (Tableau 7).

Dans ces conditions, il a été choisi de réaliser les réactions de PCR1 et de PCR2 avec 2,5 unités d'ADN polymérase thermorésistante (soit un volume de 0,5 µl par tube).

Tableau 4 (Expérience n°1)

**Résultats obtenus en PCR2 en fonction du volume d'enzyme utilisé
(0,1 µl de produit de PCR1 en PCR2)**

Nombre de copies d'ADN viral/ Quantité d'ADN polymérase par tube PCR	5	50	$5 \cdot 10^2$	10^3	$2,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	10^4
0,1 µl (0,5 U)	5-/5	5-/5	5-/5	5-/5	2+/5	5+/5	5+/5
0,5 µl (2,5 U)	5-/5	1+/5	2+/5	5+/5	NF	5+/5	NF

NB : pour chaque quantité de copies de génomes viraux et quantité d'enzyme, cinq répliquats ont été réalisés. Les résultats indiqués dans le tableau correspondent au nombre de répliquats donnant une réponse positive ou négative en PCR2 - NF pour non fait.

Tableau 5 (Expérience n°2)

**Résultats obtenus en PCR2 en fonction du volume d'enzyme utilisé
(0,1 µl de produit de PCR1 en PCR2)**

Nombre de copies d'ADN viral/ Quantité d'ADN polymérase par tube PCR	50	500	1000
0,1 µl (0,5 U)	3-/3	3-/3	3-/3
0,3 µl (1,5 U)	3-/3	3-/3	1+/3
0,5 µl (2,5 U)	3-/3	3-/3	1+/3
0,8 µl (4 U)	3-/3	3-/3	3-/3

NB : pour chaque quantité de copies de génomes viraux et quantité d'enzyme, trois répliquats ont été réalisés. Les résultats indiqués dans le tableau correspondent au nombre de répliquats donnant une réponse positive ou négative en PCR2. Pour cette expérience, les quantités d'ADN viral par tube étant faibles, peu de résultats positifs sont observés.

Tableau 6 (Expérience n°3)

**Résultats obtenus en PCR2 en fonction du volume d'enzyme utilisé
(0,1 µl de produit de PCR1 en PCR2)**

Nombre de copies d'ADN viral/ Quantité d'ADN polymérase par tube PCR	10^3	$2,5 \cdot 10^3$
0,1 µl (0,5 U)	5-/5	4+/5
0,3 µl (1,5 U)	5-/5	5+/5
0,5 µl (2,5 U)	1+/5	5+/5

NB : pour chaque quantité de copies de génomes viraux et quantité d'enzyme, cinq répliquats ont été réalisés. Les résultats indiqués dans le tableau correspondent au nombre de répliquats donnant une réponse positive ou négative en PCR2.

Tableau 7 (Expérience n°4)

**Résultats obtenus en PCR2 en fonction du volume d'enzyme utilisé en PCR1 et PCR2
(pour $5 \cdot 10^3$ copies de génomes viraux - 0,1 µl de produit de PCR1 en PCR2)**

Volume d'enzyme	
0,1 µl PCR1 - 0,1 µl PCR2	2+/5 dont 1 faible
0,1 µl PCR1 - 0,5 µl PCR2	5+/5 dont 3 faibles
0,5 µl PCR1 - 0,1 µl PCR2	4+/5 dont 1 faible
0,5 µl PCR1 - 0,5 µl PCR2	5+/5

NB : pour chaque quantité d'enzyme, cinq répliquats ont été réalisés. Les résultats indiqués dans le tableau correspondent au nombre de répliquats donnant une réponse positive ou négative en PCR2.

L'ensemble des résultats obtenus montre qu'il est plus adapté d'utiliser 2,5 unités d'ADN polymérase thermorésistante pour les réactions d'amplification aussi bien pour la première, que pour la seconde réaction. Il est ainsi possible d'abaisser le seuil de détectabilité de la méthode, mais surtout sa reproductibilité. En effet, de cette façon, pour des quantités données d'ADN viral, la totalité des répliquats réalisés donne une réponse positive.

Ce type de résultat a permis d'envisager l'incorporation d'un témoin positif interne donnant une indication sur le seuil de sensibilité de la méthode. En effet, pour chaque réaction de PCR, un tube témoin contenant une quantité d'ADN connue (soit 2500 copies de génomes viraux) est intégré à l'analyse. Ce tube doit donner une réaction positive et correspond à la plus faible quantité d'ADN détectable de façon systématique avec le protocole de PCR utilisé. Il est possible de détecter des quantités plus faibles d'ADN en PCR. Cependant, pour ces quantités, la réaction n'est pas fiable (pas de détection dans 100% des répliquats).

III.2.4 - Nombre de cycles

Des essais ont été réalisés en utilisant 40 et 35 cycles en PCR1 et en PCR2 afin de vérifier si l'augmentation du nombre de cycles pouvait apporter une amélioration. L'ensemble des expériences avait été réalisé jusqu'à présent en utilisant 30 cycles pour les séries d'amplification.

Les résultats obtenus montrent que les réactions avec 40 cycles ne semblent pas améliorer le niveau de détection de l'ADN viral. Lorsque 35 cycles sont réalisés, il est possible d'observer une amélioration (intensité plus forte des bandes sur gel d'agarose). De ce fait, il est préconisé lors de l'analyse d'échantillons, de réaliser des amplifications comportant 35 cycles en PCR1 et en PCR2.

III.2.5 - Conclusion

L'ensemble des points étudiés (préparation du broyat, quantité de produits de PCR1 utilisée pour la réaction de PCR2, quantité d'ADN polymérase, nombre de cycles et incorporation d'un témoin positif donnant un seuil de détection de l'ADN du virus de type herpès observé chez les huîtres) permet d'obtenir une nette amélioration de la technique de PCR. L'ensemble des modifications apportées au protocole de PCR est donné dans la Figure 5. Le protocole amélioré complet est donné en annexe.

L'optimisation du protocole de PCR a été réalisée en faisant varier certains paramètres, un à un. Cette approche a permis d'obtenir une technique reproductible, avec un bon seuil de détection.

L'analyse d'échantillons, en tenant compte de ces modifications a été réalisée et permet de confirmer les résultats obtenus à partir de gammes de quantités connues d'ADN viral.

Figure 5
Améliorations apportées au protocole de PCR

BROYAT : **X g d'échantillon / X ml d'eau distillée**

 dilution au 1/10^è du surnageant de broyat

 congélation à -80 °C

PCR1 : *** Mix de PCR :**

H ₂ O	31.6 µl
Tampon 10x	5 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTPs	5 µl
Amorce 3	1 µl
Amorce 4	1 µl
Taq polymérase	0.4 µl **

Soit : 49 µl de mix par tube réactionnel

*** Témoin interne 2500 copies de génomes viraux**

*** 1 µl d'échantillon**

*** 35 cycles de PCR dans le thermocycleur Crocodile III**

PCR2 : *** Mix de PCR :**

H ₂ O	32.6 µl
Tampon 10x	5 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTPs	5 µl
Amorce 5	1 µl
Amorce 6	1 µl
Taq polymérase	0.4 µl **

Soit : 50 µl de mix par tube réactionnel

*** 0.1 µl de produit de PCR1**

*** 35 cycles de PCR dans le thermocycleur Crocodile III**

**** : 0.4 µl de Taq polymérase correspond en fait à 2 unités d'enzyme et non pas à 2,5 (souci d'économie)**

III.3 - Contrôle de la spécificité de la détection par PCR pour le virus de type herpès décrit chez les huîtres

Une collection d'ADN viraux, correspondant à différents virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*, a été réalisée. Les ADN génomiques de plusieurs virus ont été obtenus auprès de l'Université de Rennes, du Medical Research Council (Glasgow) et de l'Université de Californie (Davis).

Cette collection est composée d'ADN génomiques (non infectieux), extraits de différents virus produits en cultures cellulaires. Elle est composée de virus d'origines diverses, pathogènes pour l'homme ou les poissons (Figure 6).

La spécificité des réactifs de PCR (amorces 3, 4, 5 et 6) et des conditions protocolaires (protocole amélioré) a été testée à partir de ces différents ADN, au fur et à mesure de leur disponibilité. Ainsi, aucune réaction croisée n'a pu être visualisée à partir des ADN provenant de HSV1, HSV2, HCMV, HHV6, CCV et OMV.

Figure 6

Origine des ADN viraux disponibles à La Tremblade

Designation	Nom vernaculaire	Hôte	Sous famille	Type de génome
Human Herpesvirus 1 (HHV1)	Herpes simplex virus type 1 (HSV1)	Homme	α	E
Human Herpesvirus 2 (HHV2)	Herpes simplex virus type 2 (HSV2)	Homme	α	E
Human herpesvirus 6 (HHV6)		Homme	β	A
Human herpesvirus 5 (HHV5)	Cytomegalovirus (CMV)	Homme	β	E
Ictalurid herpesvirus 1	Channel catfish virus (CCV)	Poissons : <i>Ictaluridae</i> (<i>Ictalurus punctatus</i>)	supposé α	aucun*
Salmonid herpesvirus 2	<i>Oncorhynchus masou</i> virus (OMV)	Poissons : <i>Salmonidae</i> (<i>Oncorhynchus masou</i>)	nd**	nd**

* Non A/non B/non C/non D/non E

** Non déterminé

IV - Utilisation
de la technique de PCR
pour rechercher l'ADN viral
dans des échantillons d'huître
(larves et naissain)

IV - Utilisation de la technique de PCR pour rechercher l'ADN viral dans des échantillons d'huître (larves et naissain)

IV.1 - Analyses effectuées dans le cadre d'expérimentations réalisées en baie de Pen Bé (SMIDAP)

Dans le cadre de la démarche Régionale des Pays de la Loire pour une production contrôlée de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, des animaux issus de sept pontes, produits en éclosion, ont été suivis depuis le stade larvaire (J10) jusqu'au stade naissain (J200).

Un contrôle régulier des mortalités a été réalisé par le SMIDAP, en association à des analyses pour rechercher la présence du virus de type herpès à partir de J10 après la ponte. Les prélèvements et les analyses ont été effectués tous les quinze jours, jusqu'à la mise en élevage des animaux sur sites en baie de Pen Bé. Par la suite, les examens ont été effectués mensuellement jusqu'à septembre 1996. Les analyses pour rechercher le virus de type herpès ont été réalisées au moyen de la technique de PCR au laboratoire IFREMER de La Tremblade.

Les travaux réalisés au cours de l'année 1996 concernant la technique de PCR, ont permis d'améliorer la sensibilité de détection de l'ADN viral dans les échantillons de naissain. Actuellement, la technique employée permet de détecter 2500 copies de génome viral de façon reproductible (cf. paragraphe I.2). Cela n'exclut pas de pouvoir détecter des quantités d'ADN plus faibles, mais dans ce cas la détection reste aléatoire.

Les analyses des échantillons provenant des lots mis en élevage à Pen Bé ont été réalisées avec le protocole de PCR optimisé à partir du mois de juillet 1996. Les échantillons antérieurs au mois de juillet, ont pour la plupart été analysés une nouvelle fois avec le protocole de PCR optimisé.

Le bilan des examens nous permet de constater qu'entre le stade larvaire (J10) et la mise en élevage à Pen Bé (juin 1996), il n'est pas possible de détecter la présence du virus dans les échantillons analysés. Cela peut être dû à l'inadaptation du protocole de PCR pour l'analyse de ces premiers échantillons, ou à des stades latents de l'infection, pour lesquels la quantité d'ADN est trop faible pour pouvoir être visualisée en gel d'agarose.

Le complément d'analyse sur les échantillons réalisé *a posteriori* (après juillet 1996) avec le protocole optimisé de PCR, n'a pas permis d'améliorer la qualité de la réponse en ce qui concerne la détection d'ADN viral. Cela peut être dû à une trop faible quantité d'ADN dans les échantillons analysés, à une mauvaise conservation des échantillons (plus de trois mois à -20 °C), ou bien encore à un problème d'échantillonnage (nombre insuffisant d'animaux analysés pour détecter de faibles prévalences). Enfin, une autre hypothèse possible est que les animaux sont bien indemnes de virus et que la contamination puisse se faire plus tard dans le temps, sur les sites d'élevage.

Par contre, les résultats obtenus sur les échantillons d'animaux prélevés sur sites en condition d'élevage à Pen Bé, permettent de proposer quelques hypothèses quant au comportement des animaux vis à vis de l'infection virale, en fonction de leur famille d'origine et de leurs conditions d'élevage.

Le tableau suivant indique quelles sont les variations de comportement des différentes familles pour deux dates précises, concernant l'évolution des phénomènes de mortalité, ainsi que le nombre d'analyses positives en PCR en fin d'expérience.

Tableau 8

**Comportement des différentes familles :
évolution des phénomènes de mortalité entre deux dates précises
et nombre d'analyses positives en PCR en fin d'expérience**

Famille	Mortalité cumulée au 01/08/96	Mortalité cumulée en fin d'expérience	Nombre d'analyses positives / nombre total d'analyses	Site - code couleur
H	5%	75%	0+ / 30	1 : 3R
H	4%	41%	ND	1 : 2R1V
H	<1%	13%	1+ / 24	4 : 4R
I	3%	56%	0+ / 30	1 : 3J
I	1%	43%	1+ / 24	1 : 2R1J
K	54%	82%	11+ / 38	6 : 3R1J
K	22%	48%	9+ / 18	6 : 2R2J
M	5%	47%	0+ / 28	1 : 2J1R
M	1%	10%	2+ / 30	4 : 3J1R
M	5%	15%	0+ / 12	4 : 2R2V
B	42%	90%*	5+ / 15	2 : 1R2V
B	48%	90%*	0+ / 9**	2 : 2R1V
B	19%	64%	9+ / 23	4 : 4J
B	38%	62%	7+ / 35	8 : 2B1J
B	25%	59%	3+ / 6	7 : 2B1V
B	27%	57%	7+ / 12	7 : 3B
F	11%	44%	5+ / 16	3 : 2V1J
F	6%	34%	ND	8 : 2J1B
F	10%	31%	ND	3 : 2J1V
F	22%	43%	3+ / 24	5 : 3V
F	13.5%	29%	4+ / 6	5 : 2V1B
G	33%	63%	4+ / 18	4 : 3V1R
G	31%	63%	3+ / 6	8 : JVB
G	37.5%	61%	2+ / 6	7 : 2R1B
G	20%	55%	5+ / 5	7 : 2B1R

* Mortalités non significatives (poches colmatées)

** Nombreux animaux morts (échantillon de faible taille).

N. B. : Les familles B, F et G sont issues d'une éclosérie, les familles H, I, K et M proviennent d'une autre écloséries.

Globalement, au vu des résultats des analyses effectuées en PCR et des pourcentages de mortalité, trois grandes tendances se dessinent. Il est ainsi possible de rapprocher le comportement des familles B, G et K, ainsi que celui des familles H, I, M, tandis que la famille F présente un comportement intermédiaire.

Les familles B, G et K ont dès le début du mois d'août 96 montré de forts pourcentages de mortalité (globalement supérieurs à 40%) quels que soient les sites de mise en élevage. Le comptage final du taux de survie, réalisé fin septembre 1996 montre que toutes ces familles ont subi de fortes mortalités. Ces mortalités sont accompagnées d'un nombre important d'analyses positives en PCR : 20+ / 56 (36%) pour K, 31+ / 100 (31%) pour B, 14+ / 41 (34%) pour G, quels que soient les sites (Figures 7 à 12). Pour ces familles, il est donc possible d'observer quel que soit le site d'élevage, l'apparition de mortalités précoces associées à la détection d'ADN viral par PCR pour de nombreux échantillons.

Pour ce qui est de la famille F, son comportement est un peu différent. En effet, quel que soit le site, le pourcentage de mortalité cumulée pour ces animaux, n'a pas dépassé 44% fin septembre 1996, mais une détection précoce d'ADN viral a été possible dès le début du mois d'août 1996 avec des mortalités observées à cette date, ces mortalités restant cependant limitées. Le nombre d'analyses positives pour cette famille est important (12+ / 46, Figures 13 et 14).

Les familles H, I et M quant à elles n'ont pas subi de phénomène de mortalité début août (moins de 5% quels que soient les familles et les sites), puis ont évolué différemment en fonction des sites sur lesquels elles étaient en élevage.

En effet, on constate sur le site 4, une faible évolution des mortalités jusqu'à la fin du mois de septembre 1996 (moins de 15%), ainsi que des analyses PCR dont seul un petit nombre est positif (1+ / 24 pour H, 2+ / 42 pour M, Figures 16 et 18). Par contre, pour le site 1, une évolution notable des mortalités a été observée. En fin d'expérience, les mortalités cumulées sont supérieures à 41% pour les familles H, I et M. Or, il est survenu sur le site 1, où sont implantées ces familles, une dégradation de la qualité du milieu naturel (présence à forte concentration de *Gymnodinium*). A partir de ce phénomène, les taux de mortalité des familles H, I et M ont fortement augmenté (jusqu'à 75% pour H, Figure 15 et 50% pour M, Figure 17). Cependant, les analyses sur ces animaux n'ont révélé que très peu d'échantillons positifs en PCR pour la recherche d'ADN viral (0+ / 30 pour H, 1+ / 54 pour I et 0+ / 28 pour M). Pour ces familles, l'apparition de fortes mortalités est plus tardive. Elle est observée uniquement sur certains sites d'élevage et non associée de façon systématique à la détection d'ADN viral par PCR.

Il est possible d'émettre l'hypothèse que selon l'origine des animaux, le comportement vis à vis de l'infection à virus de type herpès n'est pas identique. En effet, les trois types de comportements observés (cf. paragraphes précédents) tendent à montrer que certaines familles semblent être plus atteintes par l'herpèsvirus, ce qui provoquerait des phénomènes de mortalité différentiels. Dans un second temps, il semble que le site d'élevage ainsi que les conditions environnementales peuvent jouer un rôle important dans l'apparition de phénomènes de mortalité. En effet, par exemple, il est possible d'observer de fortes mortalités pour les animaux issus de la famille M sur le site 1 et de faibles mortalités pour la même famille sur le site 4.

Quels que soient les sites, les animaux issus des pontes protocolaires G, B et K ont subi de fortes mortalités associées à la détection d'un grand nombre d'échantillons positifs en PCR. Pour ces familles, il est possible de poser l'hypothèse de l'existence d'un grand nombre d'animaux porteurs latents. Si les conditions sont favorables à l'expression du virus, elles pourraient aboutir à l'apparition de fortes mortalités. En effet, un grand nombre d'individus déclencheraient de façon concomitante une infection exprimée et il y aurait dans ce cas production massive de particules infectieuses. Il pourrait y avoir alors infection ou surinfection d'autres individus par transmission horizontale. Si le virus se multiplie de façon importante, il peut être transmis aux individus se trouvant à proximité par l'intermédiaire de particules libérées à partir des tissus nécrosés des huîtres infectées.

Par contre pour les familles H, I et M, il est possible de détecter ponctuellement la présence d'herpèsvirus, sans que se manifestent de mortalités massives (13% de mortalité pour H, 1+/24 en PCR sur le site 4 ; 10% de mortalité pour M, 2+/30 en PCR sur le site 4). Dans ce cas, il est possible de suspecter qu'un nombre limité d'animaux soit porteur latent et que des conditions favorables à l'expression du virus n'aboutissent qu'à la mortalité des individus porteurs. En effet, dans ces conditions, la transmission horizontale ne pourrait se faire que de façon limitée du fait du petit nombre d'huîtres infectées capables de libérer des particules infectieuses (production réduite de particules virales). Il n'y aurait pas d'évolution explosive de la maladie.

Pour la famille F, son comportement est différent. En effet, elle a subi des mortalités précocement, mais cependant ces dernières n'ont pas évolué de manière importante dans le temps. Ce type de comportement peut amener plusieurs hypothèses. La première hypothèse consisterait à dire que pour cette famille seul un petit nombre d'individus serait porteur latent et que dans des conditions favorables à l'expression de la maladie, seuls les individus porteurs présenteraient des mortalités. Une autre interprétation de ces résultats peut être que les conditions environnementales des sites sur lesquels ont été élevés les individus de la famille F (sites 3 et 5 : sur ces deux sites, présence uniquement de la famille F) ne soient pas favorables à une expression explosive de la maladie. Enfin, une troisième possibilité est que des individus issus de parents particuliers présenteraient une meilleure capacité à supporter l'infection virale.

Figure 7

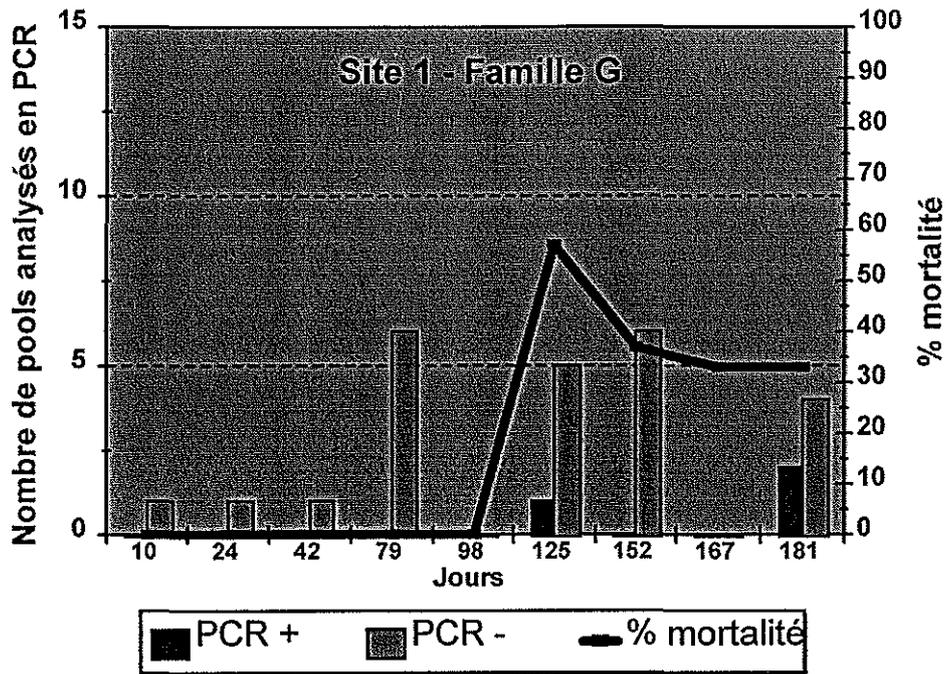


Figure 8

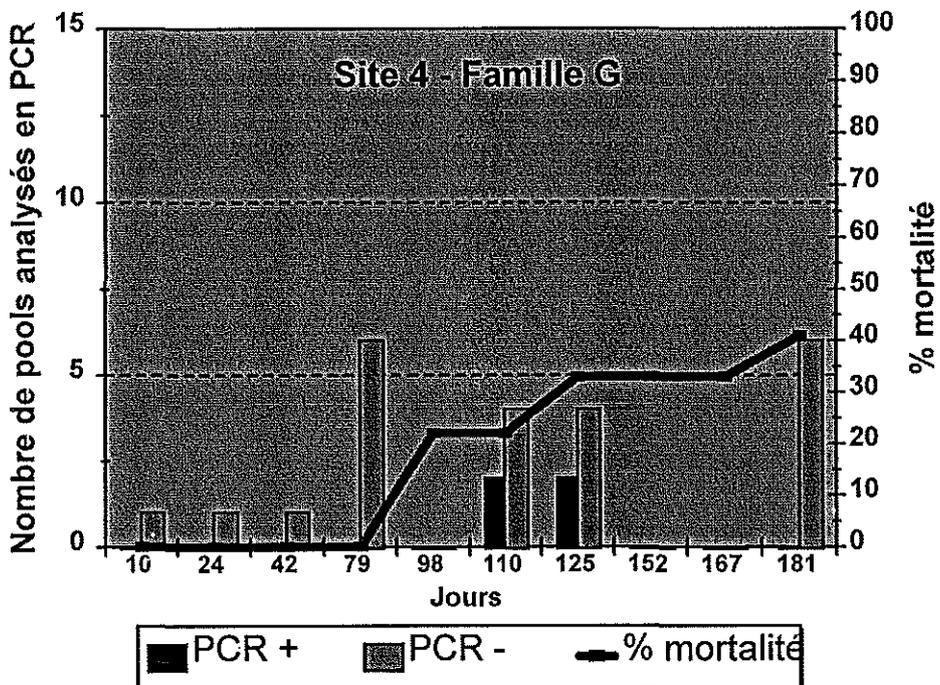


Figure 9

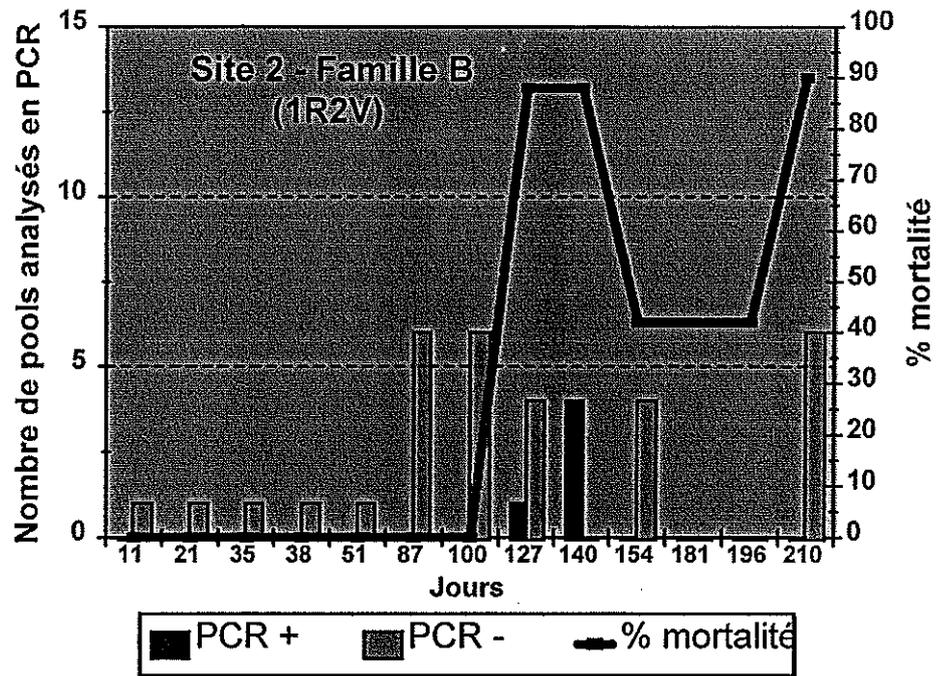


Figure 10

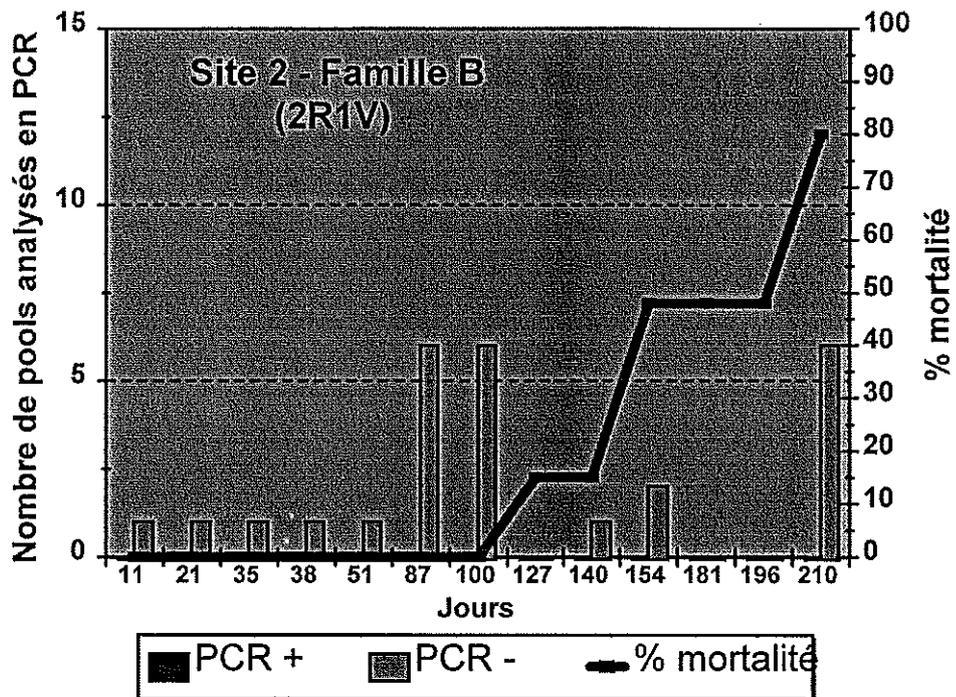


Figure 11

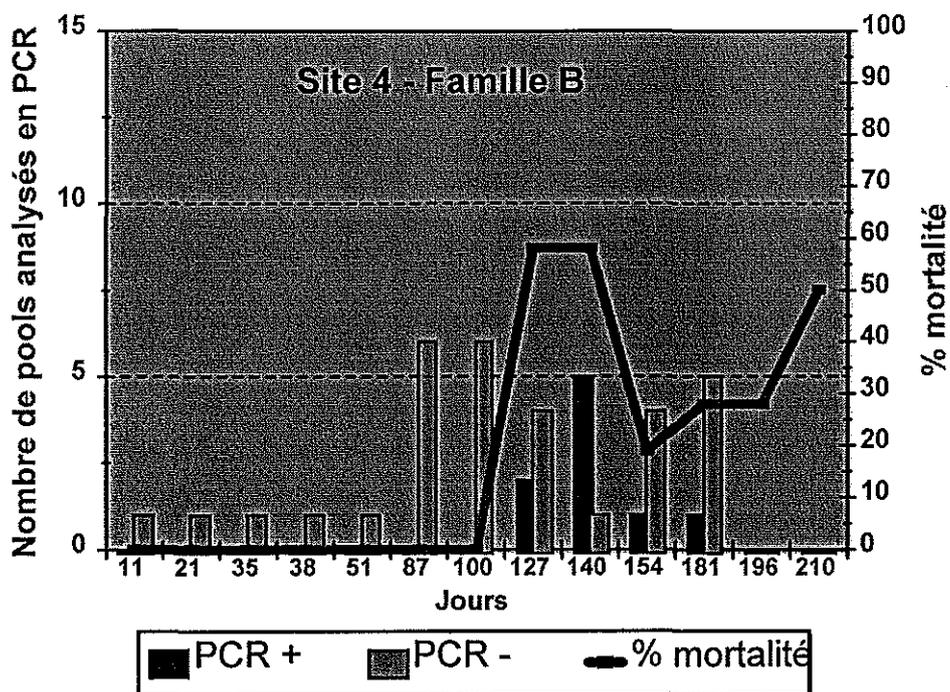


Figure 12

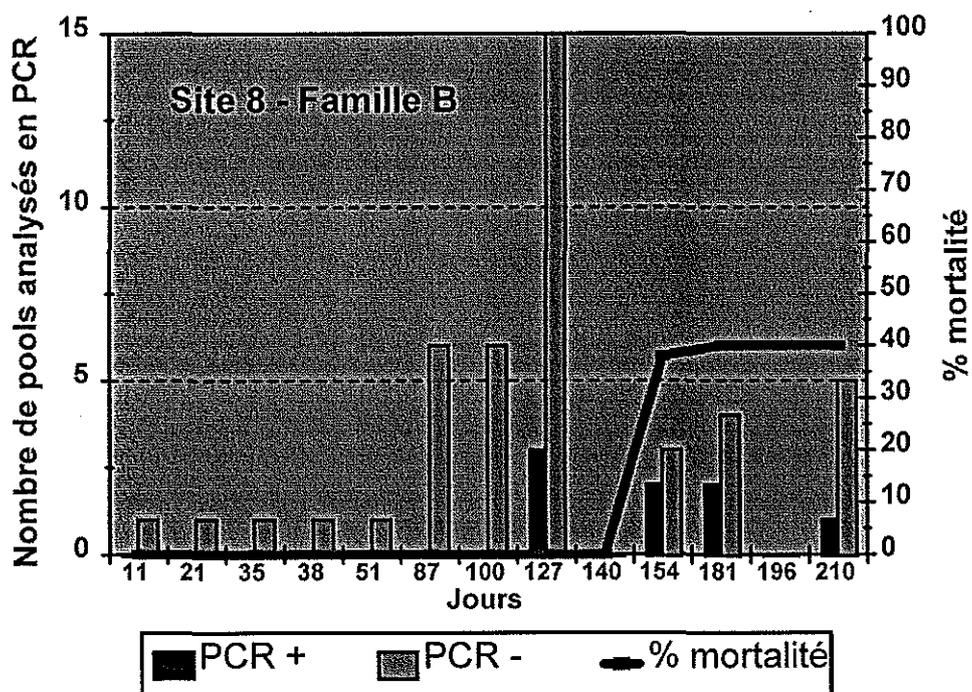


Figure 13

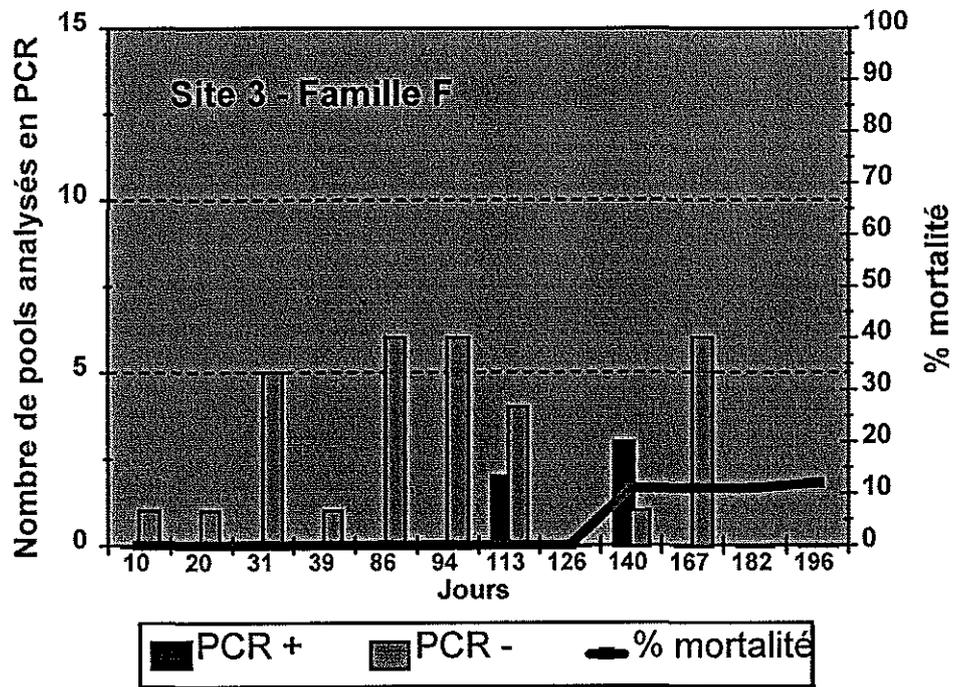


Figure 14

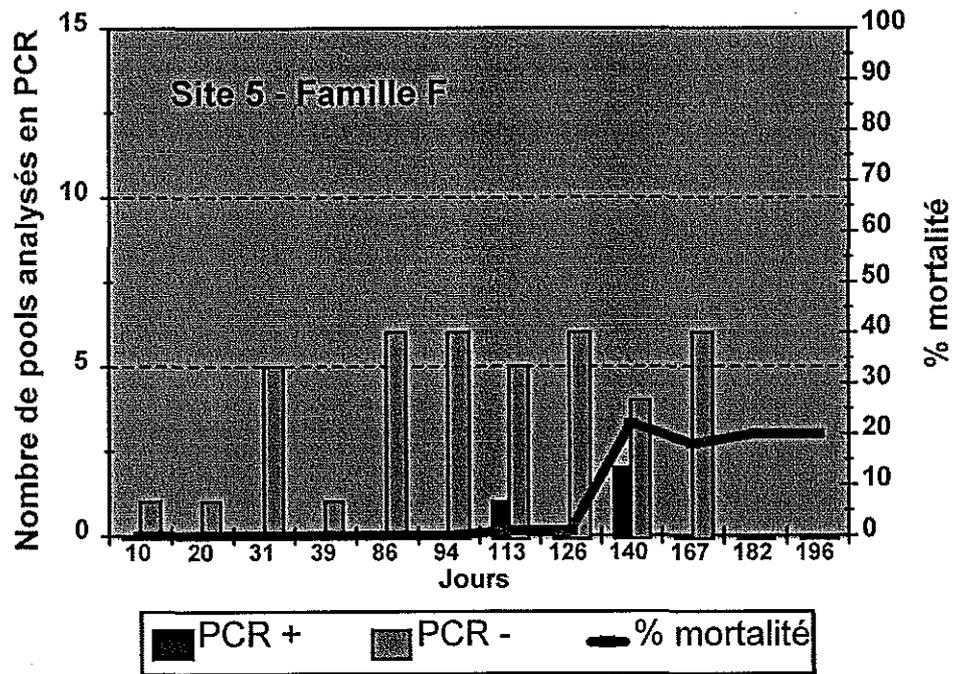


Figure 15

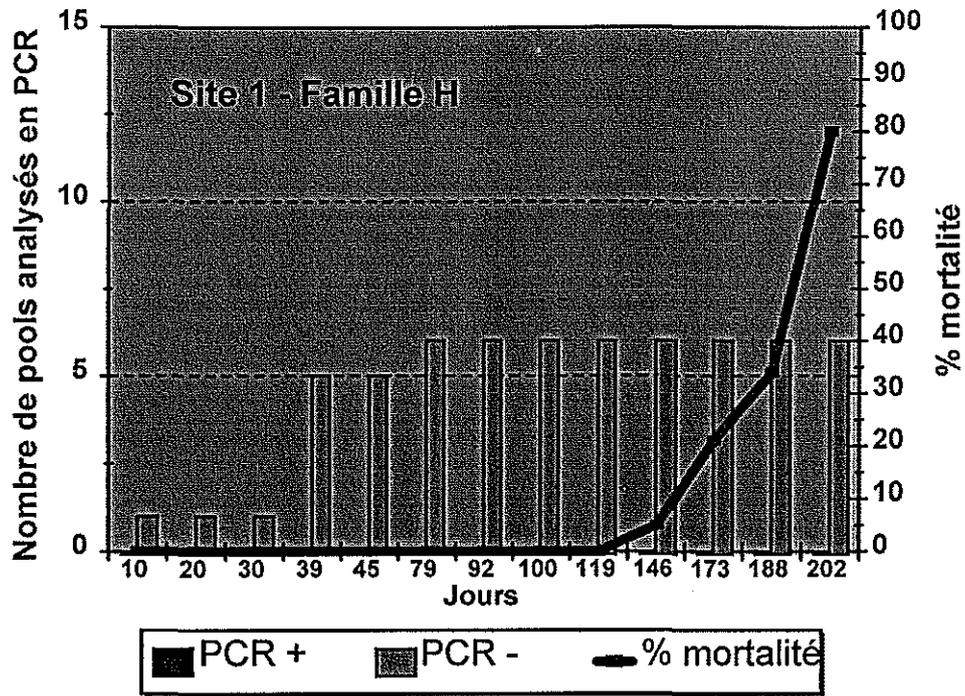


Figure 16

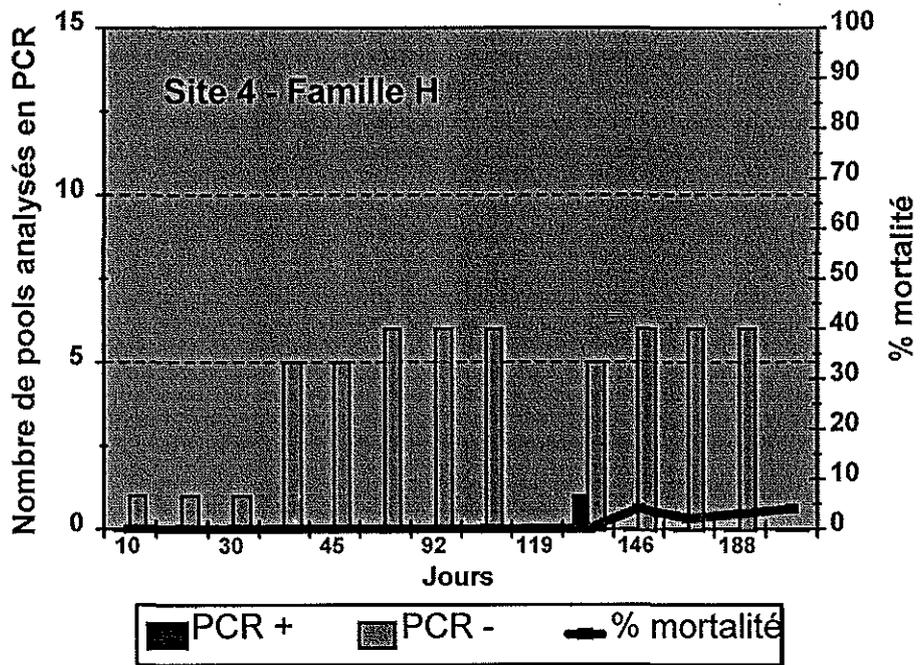


Figure 17

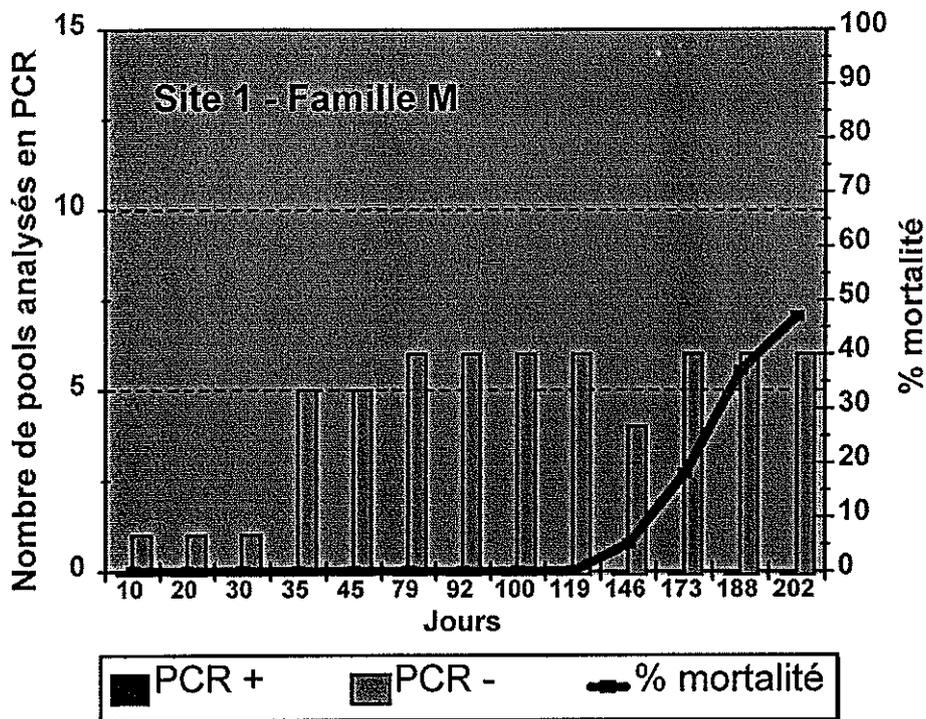
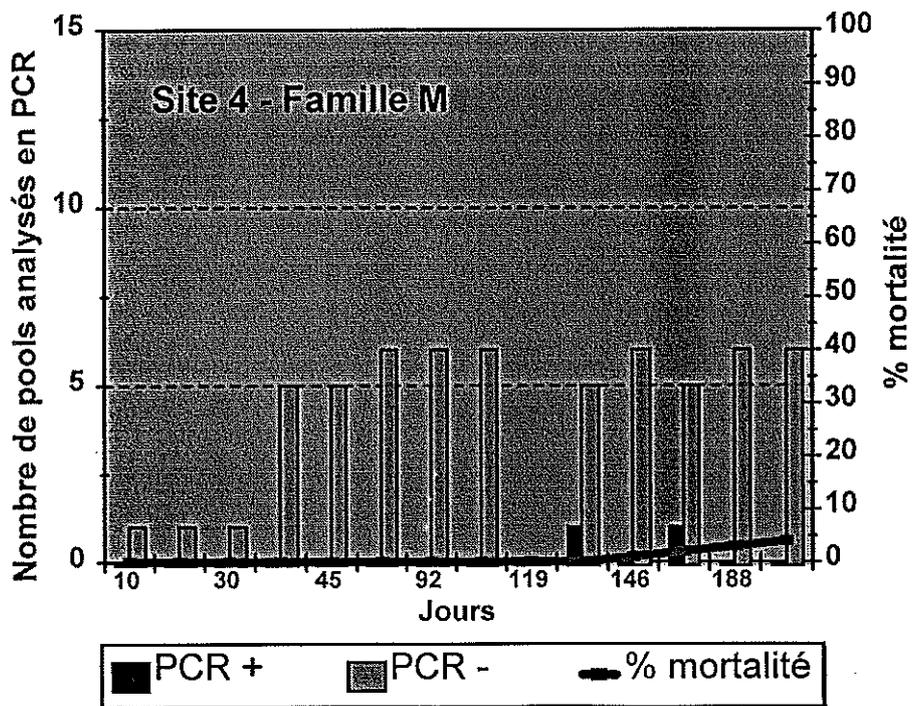


Figure 18



Une première analyse statistique a été effectuée pour les résultats obtenus en PCR. Ainsi, les tests du χ^2 réalisés montrent de manière significative une corrélation entre la détection d'ADN viral par la technique de PCR et l'origine des animaux (familles et écloséries de production).

En effet, la valeur du χ^2 est de 59,1 (Tableau 9) lorsque que l'on compare les résultats obtenus en PCR en fonction des familles. Cette valeur est supérieure à 22,45 (ddl = 6 et $\alpha = 0,001$). Les différences observées pour les résultats des analyses réalisées en PCR sont corrélés de manière significative à la famille d'origine des animaux ayant fait l'objet de l'examen.

La valeur du χ^2 est de 27,3 (Tableau 10) lorsque les résultats des analyses réalisées en PCR sont comparées en fonction de l'écloserie d'où proviennent les individus ayant fait l'objet de l'examen. Cette valeur est supérieure à 10,8 (ddl = 1 et $\alpha = 0,001$). Les différences observées pour les résultats des analyses PCR sont corrélées de manière significative à l'écloserie dont sont originaires les animaux.

La valeur du χ^2 est de 51,3 lorsque les résultats des analyses réalisées en PCR sont comparées en fonction de la famille (H, K, M et I) pour l'écloserie 1 (Tableau 10). Cette valeur est supérieure à 16,26 (ddl = 3 et $\alpha = 0,001$). Pour l'écloserie 1, les différences observées pour les résultats de PCR sont corrélées de manière significative à la famille dont sont issus les animaux ayant fait l'objet de l'examen. Ce type de résultat met en exergue le fait que chacune des productions d'huîtres (familles) a été effectuée à partir d'un couple de parents particuliers et que ce fait peut conditionner les résultats obtenus ultérieurement quant à la détection d'ADN viral par PCR (importance de l'hypothèse de la transmission verticale de l'agent infectieux).

Il est important de rappeler que nous avons utilisé pour effectuer ce premier niveau d'analyses statistiques des résultats d'examens réalisés en PCR à des dates différentes et selon un protocole ayant évolué au cours du temps. Ces conditions font que les analyses statistiques effectuées n'ont qu'une valeur d'orientation quant à l'interprétation que l'on peut faire des résultats obtenus.

Par ailleurs, le fait que la totalité des familles ne soit pas représentée sur tous les sites de mise en élevage en baie de Pen Bé rend difficile toute analyse statistique ayant pour objectif de mettre en évidence des corrélations pouvant exister entre le comportement des animaux vis à vis des mortalités, les résultats des analyses effectuées en PCR et les familles dont sont issus les individus ayant fait l'objet d'un examen.

Tableau 9

Familles / Analyses en PCR	B	F	G	K	H	M	I	Total
PCR +	31 (19,2)	12 (8,8)	14 (7,9)	20 (10,8)	1 (10,4)	2 (13,5)	1 (10,4)	81
PCR -	69 (80,7)	34 (37,1)	27 (32,9)	36 (45,2)	53 (43,6)	68 (56,5)	53 (43,6)	340
Total	100	46	41	56	54	70	54	421
% d'analyses positives en PCR	31	26	34	36	1	2	1	19,2

N. B. : () : effectifs théoriques (calculés)

Tableau 10

Ecloséries / Analyses en PCR	Eclosérie 1	Eclosérie 2	Total
	Familles H, K, M et I	Familles B, F et G	
PCR +	24 (45)	57 (36)	81
PCR -	210 (189)	130 (151)	340
Total	234	187	421
% d'analyses positives en PCR	10,2	30,5	19,2

N. B. : () : effectifs théoriques (calculés)

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus, différentes hypothèses peuvent être proposées :

- Le pourcentage d'animaux porteurs latents peut conditionner le comportement global d'une famille en ce qui concerne les phénomènes de mortalités. Dans ce cas, lors de conditions favorables à l'expression du virus (température, facteurs de stress pour les animaux, etc...) une famille pour laquelle ce pourcentage est important présentera de fortes mortalités, alors que des individus issus d'une ponte pour laquelle le portage est faible ne présenteront que peu de mortalité. Les cas intermédiaires semblent également possibles.

Pour vérifier cette hypothèse, il sera nécessaire de disposer d'une technique sensible permettant de détecter un petit nombre de copies de génome viral correspondant à un stade d'infection latente. Les analyses réalisées sur les animaux en éclosion, micronurserie et nurserie, en 1996, au cours du protocole expérimental, n'ont pas permis de détecter de l'ADN viral en absence de mortalité. Cependant, après mise en élevage sur sites en baie de Pen Bé, il a été possible pour certaines familles d'observer des résultats positifs en PCR sur des pools d'animaux, trois semaines à un mois avant l'apparition de phénomènes de mortalité. Il est probable que dans ce cas, il a été mis en évidence des débuts d'infection qui ne s'accompagnaient pas immédiatement de mortalités.

Cette hypothèse implique qu'il existe une transmission verticale de l'agent infectieux. De plus pour que le virus induise une infection exprimée, les conditions doivent lui être favorables : intervention des conditions environnementales (notion de site d'élevage).

- Il semble possible d'observer des mortalités pour lesquelles les causes sont autres (*Gymnodinium?*) que l'infection à virus de type herpès et que dans ce cas, la notion de site d'élevage soit fondamentale.

- Enfin, il est possible que des individus issus de couples de parents particuliers possèdent des capacités de résistance différentes vis à vis des infections et plus particulièrement vis à vis de l'infection à virus de type herpès. Dans ces conditions, le comportement différentiel des familles au regard des phénomènes de mortalités peut être expliqué par une capacité différente des animaux à supporter l'infection virale. Cette dernière hypothèse nécessite toutefois une étude plus approfondie pour vérifier sa validité.

IV.2 - Résultats des analyses réalisées dans le cadre de la Cellule de Veille Zoosanitaire de La Tremblade

Des analyses ont été effectuées en PCR pour la recherche de virus de type herpès sur des lots prélevés en 1996, dans le cadre de la veille zoosanitaire, au laboratoire de La Tremblade. Ces analyses concernent les mortalités observées sur les secteurs de Marennes-Oléron et de la Baie de Bourgneuf (57 lots).

Les résultats obtenus (cf. Tableaux joints) tendent à confirmer la corrélation entre mortalité et détection possible d'ADN viral par PCR, pour les lots de naissain (Figures 19a et 19b). Cependant, pour certains lots présentant de fortes mortalités, la technique de PCR donne des résultats négatifs. Pour certains de ces lots, une explication des mortalités peut être facilement proposée (problème zootechnique, etc...). Par ailleurs, les analyses en PCR donnent pour certains échantillons, hors mortalité, un résultat positif. Pour ces échantillons, il est possible que le prélèvement ait été réalisé en début d'infection, en l'absence de mortalité déclarée.

Pour les mortalités observées sur animaux adultes (banc de Ronces les Bains), il n'a pas été possible de détecter le virus par PCR.

Figure 19a

Analyses en PCR de lots de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*

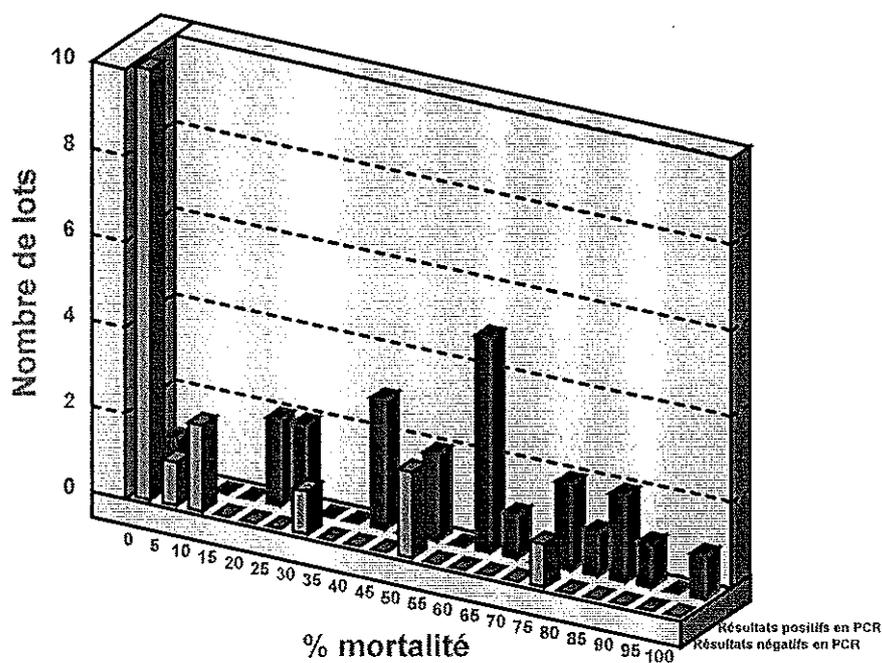
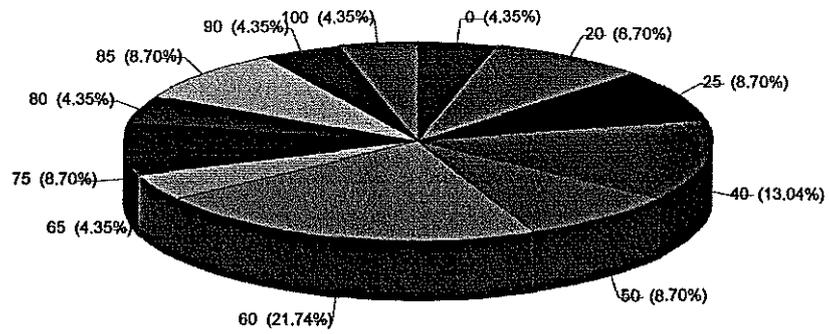


Figure 19b

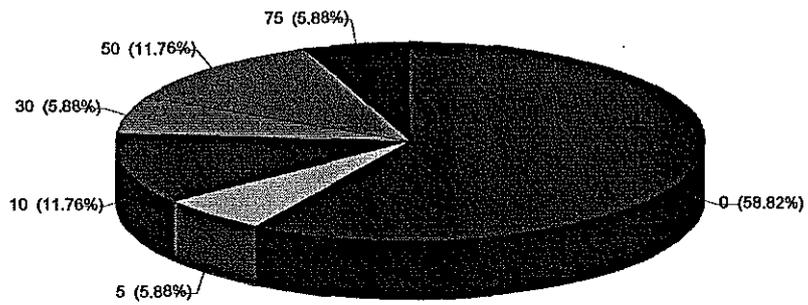
Analyses en PCR de lots de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Résultats positifs en PCR



% de lots analysés en fonction des taux de mortalité

Résultats négatifs en PCR



Une première analyse statistique a été réalisée pour les résultats concernant 40 lots analysés. Ainsi, aussi bien le test du χ^2 qu'un test de comparaison de moyennes montrent de manière significative une forte corrélation entre mortalité et détection d'ADN viral par la technique de PCR.

En effet, la valeur du χ^2 est de 16,9 (Tableau 9). Cette valeur est supérieure à 10,8 (ddl = 1 et $\alpha = 0,001$). Les différences observées entre lots à mortalité et sans mortalité, concernant les résultats des analyses réalisées en PCR sont significatives.

Pour le test de comparaison de moyennes, la valeur de l'écart réduit est égale à 4,1 lorsque l'on compare les pourcentages de lots présentant une réaction positive ou négative en PCR (aussi bien pour les lots présentant des mortalités que pour les lots ne présentant pas de mortalité). Cette valeur est supérieure à 1,96. Les différences observées sont donc significatives.

Tableau 11

	Résultats positifs en PCR2	Résultats négatifs en PCR2	Total
Nombre de lots présentant moins de 5% de mortalité	1 - [8,3%] (6,9)	11 - [91,7%] (5,1)	12
Nombre de lots présentant plus de 5% de mortalité	22 - [78,6%] (16,1)	6 - [21,4%] (11,9)	28
Total	23	17	40

N. B. : () : effectifs théoriques (calculés)

[] : pourcentages en fonction du total de lots par ligne

Ces résultats ne permettent en aucun cas de conclure à une relation de cause à effet entre mortalité observée et détection possible d'ADN de virus de type herpès par la technique de PCR. Seuls les essais de reproduction de l'infection virale qui sont en cours au laboratoire de La Tremblade permettront de trancher et de savoir si le virus de type herpès peut être ou non un agent causal de mortalité.

De plus, il est important de rappeler que nous avons utilisé des valeurs de pourcentages de mortalité pour réaliser des comparaisons, mais que ces valeurs correspondent à une donnée ponctuelle dans le temps et que par ailleurs, leur source n'est pas toujours identique (professionnels, laboratoires préleveurs, comptage à réception des échantillons au laboratoire de La Tremblade).

V - Utilisation
du protocole de PCR
pour préparer des réactifs de
diagnostic spécifique
et étudier le virus .

V - Utilisation du protocole de PCR pour préparer des réactifs de diagnostic spécifique et étudier le virus

V.1 - Préparation de sondes marquées à la digoxigénine et southern blotting

V.1.1 - Préparation d'une sonde marquée à la digoxigénine par PCR

Cette sonde est représentée par un fragment d'ADN viral spécifiquement amplifié en nested PCR, à l'aide des amorces A3, A4, A5 et A6 et à partir d'ADN viral purifié. La PCR a lieu en présence de nucléotides couplés à la digoxigénine (Boehringer) qui sont incorporés au fragment pendant son amplification.

Deux contrôles sont réalisés à ce stade. Le contrôle de l'efficacité de l'amplification est réalisé par électrophorèse des produits de PCR2 en gel d'agarose 1%. Ceci permet de visualiser une bande d'ADN correspondant au fragment amplifié (Figure 20). Il faut noter que la digoxigénine "alourdi" le fragment amplifié. Celui-ci apparaît donc sur le gel en position légèrement plus haute qu'un fragment de même longueur mais non marqué.

Le second contrôle a pour objet de vérifier le marquage du fragment amplifié, c'est à dire dans ce cas, l'incorporation effective de résidus digoxigénine sur le fragment amplifié. A cette fin, les produits de PCR2 séparés sur gel d'agarose (voir paragraphe précédent) sont transférés sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est donc une réplique inversée du gel. L'incorporation de digoxigénine sur la sonde est contrôlée à l'aide d'un anticorps anti-digoxigénine et une révélation de type immunologique (Figure 20). Les bandes brunes observées après révélation de la membrane correspondent à la sonde marquée.

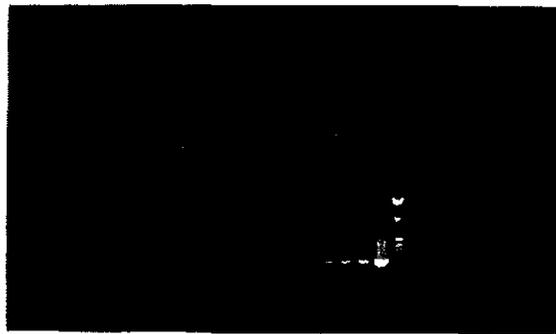
V.1.2 - Analyse de la spécificité de la sonde produite

La spécificité de la sonde marquée à la digoxigénine par PCR a été testée par hybridation sur de l'ADN viral natif et digéré par les enzymes de restriction *EcoRI* et *BglII*. Cette méthode nécessite de réaliser un gel d'agarose (Figure 21), qui est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose. Puis, la membrane est mise en présence de la sonde, dans un tampon d'hybridation. Ainsi, la sonde peut s'hybrider sur les ADN de séquence complémentaire. Après une série de lavages qui permettent d'éliminer l'excès de sonde, l'hybridation éventuelle est visualisée comme au paragraphe précédent, à l'aide d'un anticorps anti-digoxigénine et une révélation de type immunologique (Figure 21). L'ensemble de cette méthode est appelé southern blotting.

L'observation d'un marquage sur les pistes correspondant à de l'ADN viral, alors que l'ADN d'huîtres présumées saines n'est pas marqué, permet de conclure à la spécificité de la sonde utilisée pour l'ADN viral. De plus, le marquage observé correspond à des fragments d'ADN de différentes tailles selon l'état de l'ADN déposé (natif ou digéré par enzyme de restriction) et selon l'enzyme utilisée (*EcoRI* ou *BglII*). Cette observation confirme la spécificité de la sonde pour une séquence virale donnée, localisée sur des fragments de restriction de tailles différentes selon l'enzyme utilisée.

Figure 20

Préparation d'une sonde nucléique marquée à la digoxigénine par PCR



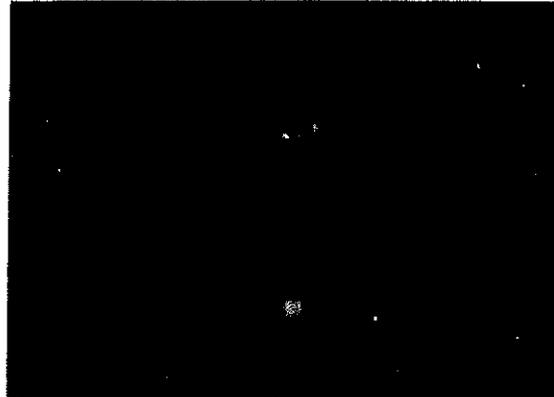
Gel d'agarose : Contrôle de l'amplification



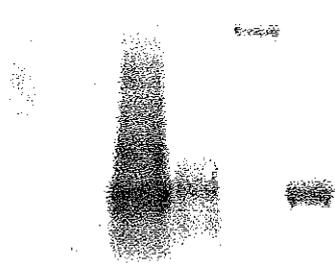
**Révélation des produits de PCR marqués, après
transfert sur membrane de nitrocellulose, à l'aide
d'un anticorps anti-digoxigénine**

Figure 21

**Southern blotting : test de la spécificité de
la sonde nucléique marquée à la
digoxigénine par PCR**



**Gel d'agarose : ADN viral total / ADN viral digéré
par les enzymes de restriction EcoRI et BglII**



**Hybridation et révélation après transfert sur
membrane de nitrocellulose**

V.1.3 - Analyse de produits de PCR en southern blotting

La méthode de southern blotting est applicable à l'analyse de produits de PCR. Dans ce cas, des produits de PCR sont déposés sur un gel d'agarose (Figure 22), cette étape permet de contrôler le bon déroulement de la réaction de PCR (*i.e.* témoins positifs et négatifs). Le gel d'agarose est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose. Cette dernière est alors hybridée avec une sonde marquée, comme décrit au paragraphe précédent (Figure 22).

Lorsqu'elle est appliquée à l'analyse de produits de PCR, la méthode de southern blotting représente un contrôle de la spécificité de l'amplification. En effet, si la réaction de PCR a conduit à l'amplification d'un fragment non spécifique, ce qui est toutefois extrêmement rare en nested PCR, la sonde ne pourra pas s'hybrider sur ce fragment de séquence différente.

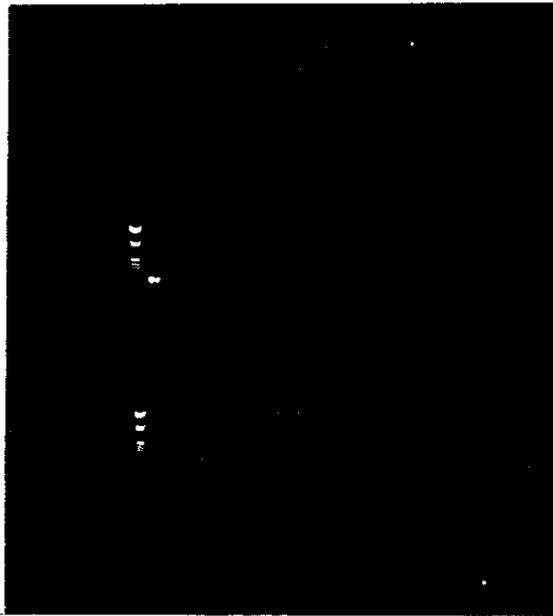
Ici, il est possible d'observer une hybridation sur le fragment amplifié par PCR, ce fragment correspond donc bien à la séquence cible virale recherchée.

Réaliser un southern blotting sur des produits de PCR peut en outre, permettre d'améliorer la sensibilité de la détection d'ADN cible. C'est à dire que cette méthode peut permettre de visualiser un fragment amplifié par PCR, mais peu ou pas visible sur un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

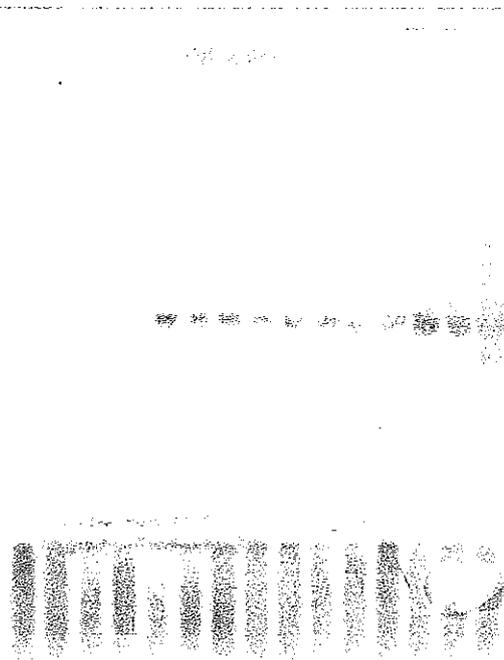
Les résultats déjà obtenus indiquent qu'il est en effet possible d'améliorer la sensibilité de la détection du virus de type herpès, d'un facteur minimum 4 à 50. Le travail de mise au point et de standardisation n'étant pas achevé, ce facteur reste à confirmer et à préciser. Néanmoins, cette méthode n'est pas standardisable pour l'analyse d'un très grand nombre d'échantillons. Pour cette raison, et du fait de la lourdeur du protocole, le southern blotting restera principalement un outil de recherche, appliqué à la détection de très faibles quantités de matériel viral.

Figure 22

Southern blotting : analyse des produits de PCR



Gel d'agarose : Contrôle de l'amplification



Hybridation avec une sonde nucléique marquée à la digoxigénine

V.2 - Séquençage partiel d'un fragment amplifié par PCR

Le séquençage du fragment de PCR amplifié à l'aide des amorces A5 et A6 a été initié en utilisant le kit de séquençage Omnibase DNA Cycle Sequencing System (Promega). Ce fragment présente une taille d'environ 1000 pb. Le séquençage, entrepris à partir des deux extrémités simultanément, a permis de définir respectivement environ 150 pb et 250 pb.

A partir de cette séquence partielle, la recherche d'homologies avec les séquences disponibles dans les banques de données a été réalisée. Cette recherche d'homologie de séquence a été réalisée à partir de la séquence nucléotidique brute, mais aussi à partir de la traduction de ses six cadres de lectures en protéines potentielles.

Il n'a pas été possible de montrer une quelconque homologie avec des séquences connues, même parmi les séquences disponibles pour d'autres *Herpesviridae* ou d'autres familles virales. Outre la vérification de la spécificité du fragment amplifié, aucune autre conclusion ne peut actuellement être retirée de ces informations.

N. B. : Une information plus complète concernant le génome du virus de type herpès de l'huître devrait être disponible au cours du premier semestre 1997 (travail de séquençage entrepris par Dr. A. Davison - MRC - Glasgow). En effet, 50% du génome viral a déjà été cloné et 20% environ séquencé.

VI - Essais de reproduction
expérimentale de la maladie

VI - Essais de reproduction expérimentale de la maladie

VI.1 - Naissain d'huître creuse

Des essais d'infection de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été réalisés par balnéation en présence de larves d'huître creuse infectées vivantes, produites expérimentalement. L'ensemble du protocole expérimental d'infection est représenté sur la Figure 23. Le choix du mode de transmission (utilisation de matériel vivant infecté expérimentalement) a été dicté par le fait que le virus étudié (virus enveloppé) doit être dégradé facilement dans le milieu extérieur. Des expériences menées au laboratoire IFREMER de La Tremblade, en 1996, ont montré que l'ADN viral (ultrafiltrat de broyat de larves infectées) n'était plus détectable par PCR, après 48 heures de contact avec de l'eau de mer non stérile. Lorsque l'ultrafiltrat est dilué en eau de mer stérile, il est par contre possible de détecter en PCR l'ADN viral après 13 jours.

Ce protocole a été élaboré en fonction des résultats obtenus lors de nos précédents essais d'infection expérimentale de naissain et d'adultes. Ceux-ci avaient été réalisés par balnéation de naissain en présence de broyats ultrafiltrés de larves et de naissain infectés, conservés congelés à -20°C, et chez les adultes, par inoculation intracardiaque de ces mêmes broyats. Aucun phénomène de mortalité n'avait alors été observé. Il faut noter que les particules virales présentes dans les broyats de larves infectées, sont libérées par dissociation mécanique des tissus larvaires et peuvent, de ce fait, avoir été altérées. De plus, les particules virales infectieuses (nucléocapsides enveloppées extracellulaires) présentes dans les tissus larvaires sont relativement peu nombreuses, par rapport à l'ensemble des particules (capsides, nucléocapsides nues et enveloppées).

Au vu de ces résultats, les essais ultérieurs d'infection de naissain d'huître ont été réalisés par contact avec des larves infectées vivantes, produites expérimentalement (Figure 23). De cette façon, des particules virales infectieuses sont produites dans les tissus larvaires et sont libérées dans le milieu extérieur, à mesure que l'infection des larves se poursuit. La mise au point préalable d'une méthode d'infection de larves conventionnelles en grand volume a permis de réaliser ces essais.

Une première expérience a été conduite sur un lot de naissain âgé de huit mois, issu de captage naturel en Seudre et élevé à Mornac (Charente-Maritime). Les animaux ont été acclimatés à 20°C, sur une période de deux semaines. Aucune mortalité anormale n'a alors été observée. A l'issue de cette période et avant infection expérimentale, l'analyse en PCR d'un échantillon de trente animaux n'a pas permis de révéler la présence de virus de type herpes.

Deux bacs d'élevage ont été inoculés avec des larves infectées vivantes, deux autres bacs avec des larves saines vivantes (témoin). Chaque bac contenait 100 animaux au début de l'expérience. Les animaux ont été maintenus sans renouvellement d'eau pendant toute la durée de l'expérience (18 jours), ils ont été alimentés quotidiennement. Deux fois par jour, les animaux morts ont été prélevés dans les bacs, puis stockés individuellement à -20°C.

Figure 23

Essais de reproduction expérimentale de l'infection à virus de type herpès
chez le naissain de *Crassostrea gigas*.

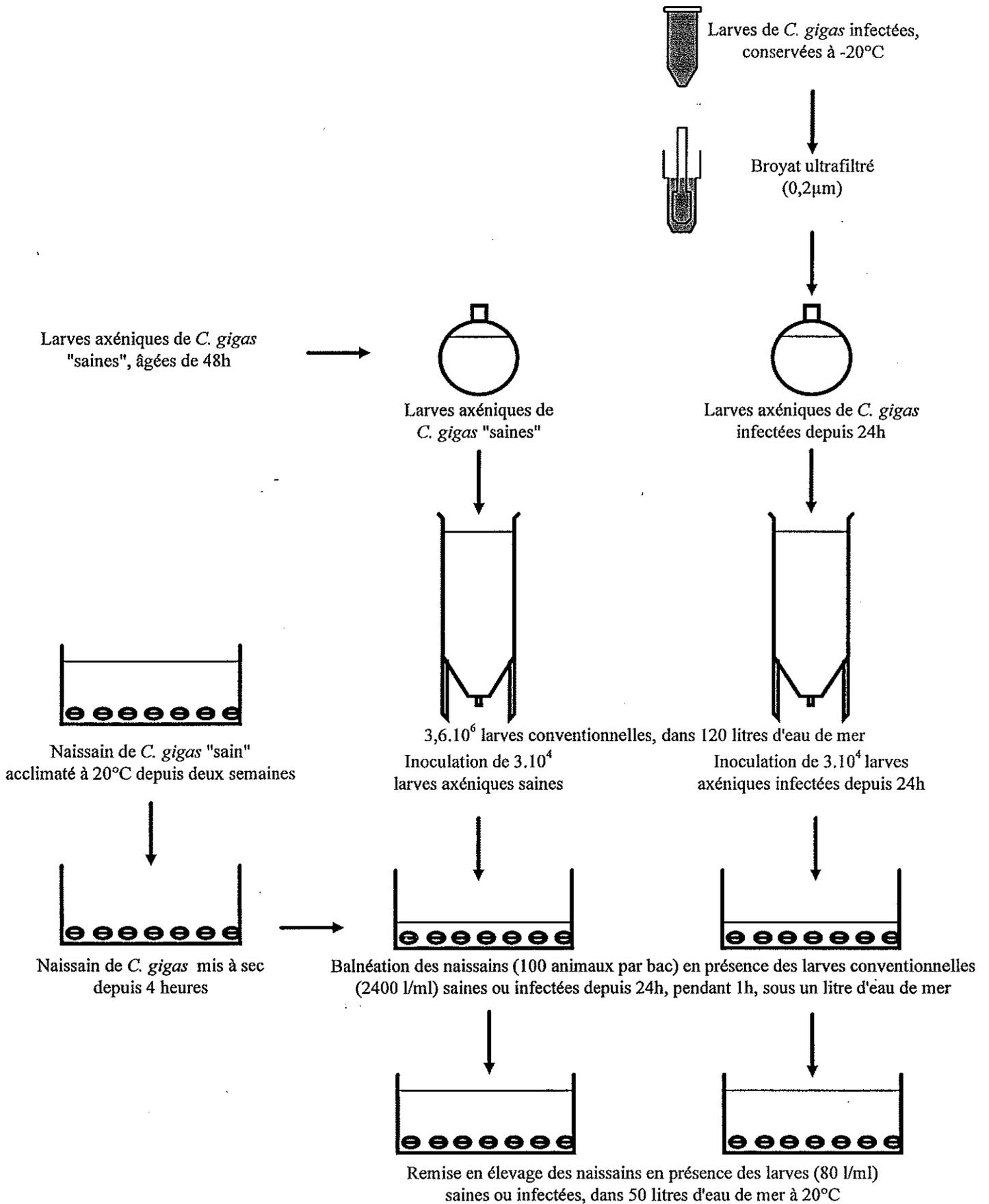
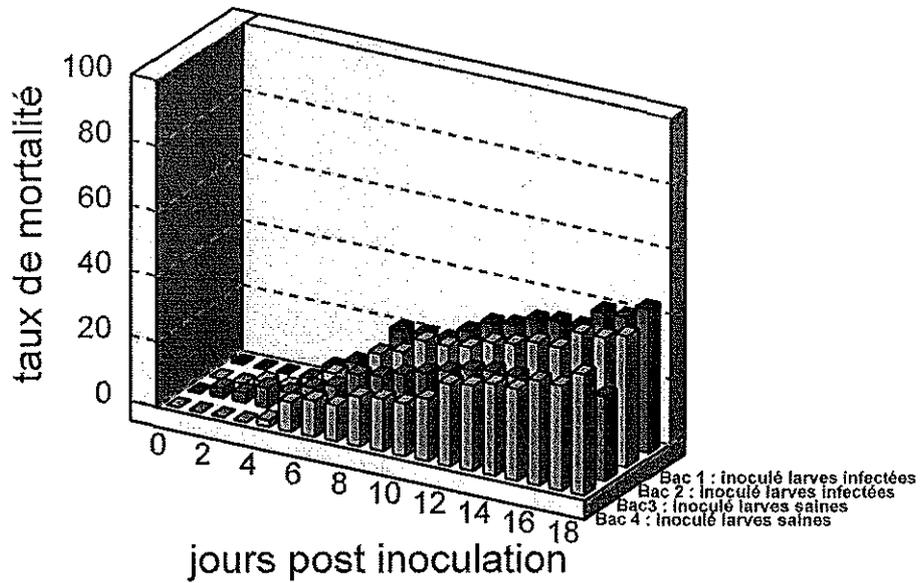


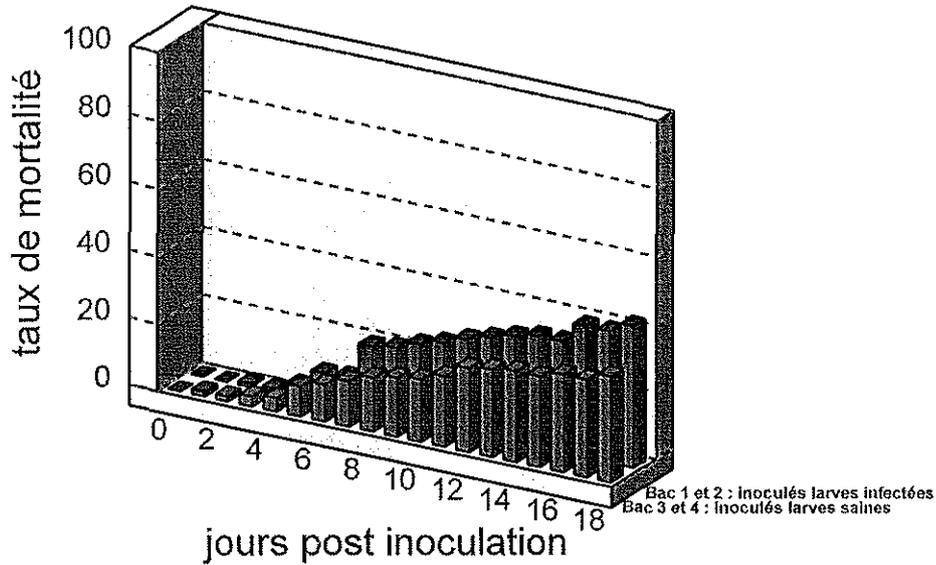
Figure 24

Essais de reproduction expérimentale du virus de type herpès
chez le naissain de *Crassostrea gigas*.

Taux de mortalité cumulée
pour chaque bac expérimental



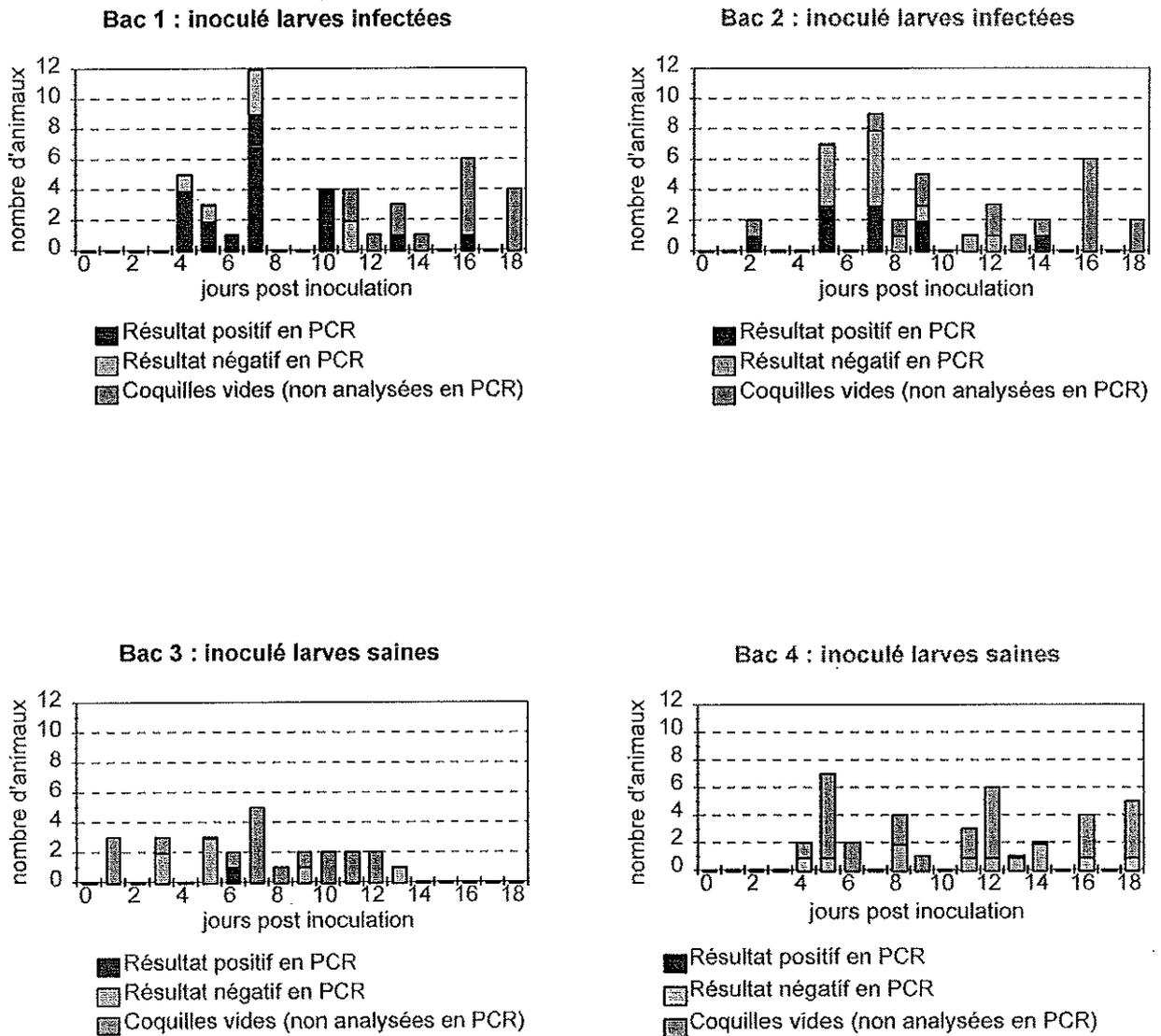
Moyenne des taux de mortalité
observés sur les bacs en répliquat



Les taux de mortalité ont été déterminés quotidiennement pour chaque bac et sont représentés dans cette Figure, ainsi que les taux moyens pour les bacs en répliquat.

Figure 25

Essai de reproduction expérimentale du virus de type herpès
chez le naissain de *Crassostrea gigas*.



Les individus morts, prélevés dans les bacs expérimentaux, ont été analysés individuellement en PCR pour la détection du virus.

Les mortalités observées au cours de l'expérience sont représentées sur la Figure 24. Les mortalités cumulées sont indiquées pour chaque bac expérimental ainsi que les mortalités moyennes obtenues dans les bacs en répliquats.

Les animaux morts ont été analysés individuellement en PCR, pour la recherche de virus de type herpès. Le résultat de ces analyses est indiqué dans la Figure 25, pour chaque bac expérimental.

Un contrôle en histologie a été réalisé sur sept animaux positifs en PCR, afin de confirmer ou d'infirmer le résultat. L'observation des tissus a révélé, pour tous les animaux analysés la présence d'anomalies nucléaires caractéristiques de l'infection à virus de type herpès.

Une première analyse statistique a été réalisée pour les résultats concernant les mortalités ainsi que les résultats de PCR obtenus pour l'ensemble des bacs expérimentaux.

Ainsi, dans le test de comparaison de moyennes, la valeur de l'écart réduit est égale à 2,42 lorsque l'on compare les pourcentages d'animaux morts et d'animaux vivants pour les bacs inoculés par des larves infectées ou saines (Tableau 12). Cette valeur est supérieure à 1,96. Les différences observées sont donc significatives.

Tableau 12

	Nombre d'animaux morts	Nombre d'animaux vivants	Total
Nombre d'animaux inoculés par des larves infectées	84	118	202
Nombre d'animaux inoculés par des larves saines	63	146	209
Total	147	264	411

Le test du χ^2 montre de manière significative une forte corrélation entre l'inoculation de matériel infecté et la détection d'ADN viral par la technique de PCR. En effet, la valeur du χ^2 est de 15,67 (Tableau 13). Cette valeur est supérieure à 10,8 (ddl = 1 et $\alpha = 0,001$). Les différences observées entre lots inoculés par des larves infectées et lots inoculés par des larves saines, concernant les résultats des analyses réalisées en PCR sont significatives.

Il faut noter par ailleurs la présence d'un résultat positif dans le bac N°3. Celui ci est interprété comme le résultat d'une probable contamination du prélèvement. Toutefois, ce résultat "positif" ne remet pas en cause la signification statistique des résultats.

Tableau 13

	Résultats positifs en PCR2	Résultats négatifs en PCR2	Total
Nombre de naissains inoculés par des larves infectées	32 (24,75)	22 (29,25)	54
Nombre de naissains inoculés par des larves saines	1 (8,25)	17 (9,75)	18
Total	33	39	72

N. B. : () : effectifs théoriques (calculés)

Un deuxième essai de reproduction expérimentale de l'infection a été réalisé sur un lot de naissain provenant d'écloserie. Le même protocole expérimental a été appliqué dans cet essai.

Les animaux ont été maintenus en élevage pendant 30 jours après l'inoculation. Les mortalités observées au cours de cette période sont respectivement de 1 et 2% dans les bacs inoculés par des larves "infectées" et de 0 et 3% dans les bacs inoculés par des larves saines. Après contrôle des larves "infectées" inoculées, il s'est avéré que l'infection des larves elles mêmes avait échoué. Une explication de cet échec peut être apportée par la qualité médiocre de la ponte.

De plus, il semble important de noter que la difficulté majeure rencontrée lors des ces essais repose sur l'approvisionnement en naissains indemnes. En effet, deux autres essais ont été réalisés sur des lots d'animaux provenant de captage naturel. Ces derniers étant déjà infectés par le virus, ont présenté des mortalités importantes au début de la période d'acclimatation (contrôles réalisés en PCR).

Il apparaît, d'après ces résultats, que l'utilisation de larves infectées vivantes permet de reproduire expérimentalement l'infection au stade naissain. De plus, l'infection de ces animaux est associée à des mortalités significatives.

D'autres expériences seront réalisées afin de confirmer ce résultat, en prenant tout particulièrement en compte les conditions zootechniques, afin de limiter les mortalités dues à d'autres facteurs.

VI.2 - Larves de palourde japonaise

Des essais d'infection expérimentale de larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, par le virus de type herpès ont été réalisés. En effet, des mortalités concomitantes de larves de palourde japonaise et d'huître creuse avaient été observées en 1991, en éclosérie. Le virus de type herpès avait alors été détecté dans les larves d'huître creuse, les larves de palourdes n'ayant elles, pas été analysées lors de cet épisode de mortalité (J.L. Nicolas, communication personnelle).

Des larves de palourde âgées de huit jours (J8) ont été gracieusement fournies par une éclosérie privée. Elles ont été inoculées à J9 par des larves d'huître creuse axéniques, infectées vivantes (J3, 24 heures post infection). Les conditions expérimentales sont résumées dans la Figure 26.

Des prélèvements de larves et d'eau d'élevage ont été réalisés à J3, J4, J7 et J10 après l'infection pour une analyse en PCR. Les larves ont été tamisées sur des filtres en papier et rincées trois fois par 200 ml d'eau de mer stérile avant d'être congelées à -20°C. L'eau d'élevage, passée sur un filtre en papier afin d'éliminer les larves, a été congelée à -20°C.

Des prélèvements de larves ont été réalisés à J0, J3, J4, J7 et J10 après l'infection pour une analyse en microscopie électronique. Les larves recueillies sur un filtre en papier ont été fixées par le glutaraldéhyde 3% et conservées à 4°C avant d'être traitées selon une procédure classique.

L'ensemble des observations réalisées et des résultats d'analyse est donné dans le Tableau 14.

L'observation au microscope inversé, réalisée à J0, J3, J4, J7 et J10 après l'infection, n'a pu révéler aucune anomalie macroscopique chez les larves de *R. philippinarum* jusqu'au septième jour post infection. Dix jours post infection, 90 à 100% de mortalité ont été notées parmi les larves de *R. philippinarum* inoculées par des larves de *C. gigas* infectées, alors que les larves témoin ne présentent pas de mortalité ni d'anomalie macroscopique.

L'analyse des échantillons en PCR a été réalisée uniquement pour les élevages inoculés par des larves infectées à J4, J7 et J10. La présence d'ADN viral est détectée dans les larves à J4, mais plus à J7 et J10. La présence d'ADN viral est détectée dans l'eau d'élevage à J4 et J7. A J10, la PCR ne permet plus de détecter l'ADN viral dans l'eau d'élevage. Ces résultats semblent indiquer une "disparition" de l'ADN viral présent dans les larves et, de façon plus tardive, dans l'eau d'élevage.

Ce phénomène est interprété comme le reflet de l'évolution de l'infection dans les larves d'huître infectées (l'inoculum), plutôt que comme celui de l'infection des larves de palourde. L'ADN viral détecté à J4 post infection correspondrait alors à des larves d'huître infectées. Puis, les coquilles des larves d'huîtres se vident et, à J7 et J10, l'ADN n'est plus détecté dans les prélèvements de larves, celles-ci étant rincées trois fois par de l'eau de mer stérile. La détection d'ADN viral dans l'eau d'élevage à J4 et J7, mais plus à J10, correspond à cette interprétation.

L'analyse des échantillons en microscopie électronique à transmission a été réalisée pour les élevages inoculés par des larves infectées à J3, J4, J7 et J10 ainsi qu'à J10 pour les élevages témoins. Aucune anomalie caractéristique de l'infection à virus de type herpès n'a pu être visualisée chez les larves de palourde. Néanmoins, dès J3, de nombreux noyaux anormaux ont été observés dans les cellules épithéliales des larves de palourdes inoculées par des larves d'huîtres infectées.

En conclusion, l'infection à virus de type herpès n'a pas pu être reproduite chez les larves de *R. philippinarum*, dans les conditions expérimentales choisies. Les mortalités et les lésions nucléaires observées pourraient éventuellement correspondre à une toxicité de l'inoculum (larves d'huîtres infectées).

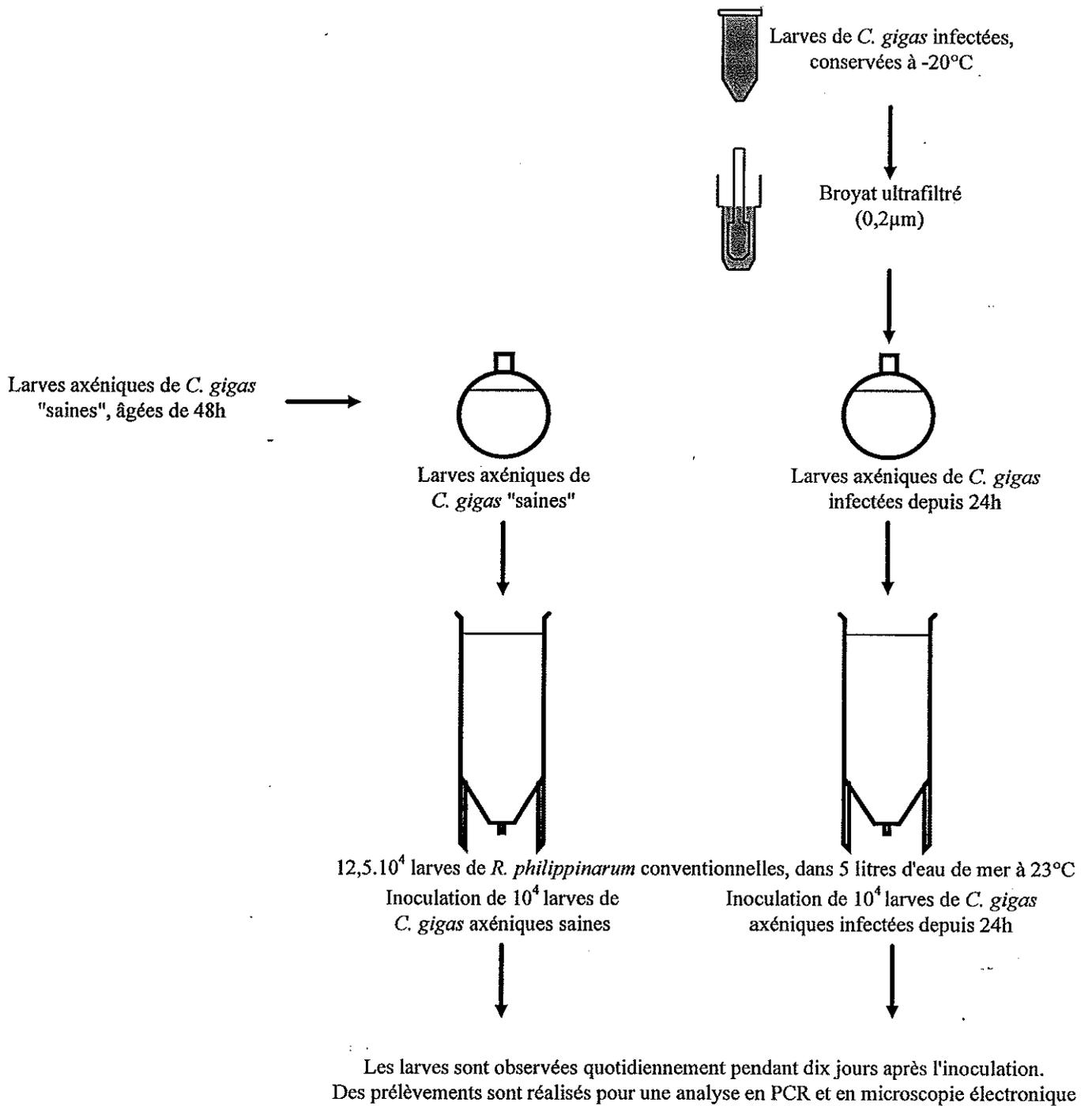
Tableau 14 : Observations et analyses réalisées sur les larves de *R. philippinarum* inoculées par des larves de *C. gigas* saines et infectées.

jour post infection	observations macroscopiques		analyses en PCR				observations en microscopie électronique	
	inoculum larves saines	inoculum larves infectées	inoculum larves saines		inoculum larves infectées		inoculum larves saines	inoculum larves infectées
			larves	eau	larves	eau		
J0	RAS	RAS	NF	NF	NF	NF	NF	NF
J3	RAS	RAS	NF	NF	NF	NF	NF	RAS (pas de noyaux typiques de l'infection à virus de type herpès, pas de particules virales)
J4	RAS	RAS	NF	NF	positif en PCR2	positif en PCR2	NF	
J7	RAS	RAS	NF	NF	négatif en PCR2	positif en PCR2	NF	
J10	RAS	90 à 100% mortalité	NF	NF	négatif en PCR2	négatif en PCR2	RAS	

RAS : Rien à signaler.
 NF : Analyse non faite.

Figure 26

Essais de reproduction expérimentale de l'infection à virus de type herpes chez les larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*.



Conclusion générale et perspectives
du programme herpèsvirus
à La Tremblade

Conclusion générale et perspectives du programme herpèsvirus à La Tremblade

Les applications et perspectives des travaux réalisés entre mars 1996 et février 1997, au laboratoire IFREMER de La Tremblade, sont principalement de deux ordres.

D'une part, les méthodes mises au point (PCR et hybridation sur membrane) pour la détection d'ADN de virus de type herpès dans des échantillons d'huître sont des outils pouvant permettre d'assurer un contrôle zoosanitaire. Ces outils nécessitent d'être encore améliorés et adaptés à ce type de travail (en particulier, vérification des thermocycleurs et intercalibration des techniques entre laboratoires). Cependant, ils possèdent des avantages évidents (spécificité et rapidité) par rapport à l'histologie classique qui ne permet que de poser un diagnostic de suspicion. Par ailleurs, il est nécessaire de développer d'autres outils de diagnostic tels que des anticorps monoclonaux spécifiques du virus. En effet, de tels outils sont indispensables pour disposer d'une panoplie de techniques de diagnostic fiables et sensibles.

Les protocoles développés (PCR et southern blotting) peuvent être également utilisés pour mener à bien des travaux de recherche permettant de mieux comprendre l'infection à virus de type herpès. En effet, ces protocoles ont déjà pu être appliqués, par exemple à l'étude du comportement de différentes familles de naissain sur sites, en collaboration avec le SMIDAP. Cependant, l'utilisation de la technique de PCR s'est révélée difficilement applicable dans certains domaines de la recherche expérimentale. En effet, en l'absence de lignées cellulaires, des travaux ont été menés au laboratoire IFREMER de La Tremblade, au cours de l'année 1996, afin d'étudier la cinétique de développement du virus chez les larves ainsi que l'influence de divers facteurs sur la conservation de pouvoir pathogène de cet agent infectieux. Les analyses réalisées en PCR ont montrées que cette technique par sa grande sensibilité n'était pas adaptée aux recherches entreprises (détection de l'ADN viral contenu dans les inoculums ayant servis dans les expériences). Ce résultat met en exergue la nécessité de développer d'autres outils permettant de rechercher le virus de type herpès : réactifs immunologiques et cultures cellulaires.

D'autre part, d'autres travaux ont déjà été initiés, concernant la mise au point d'un modèle de propagation du virus *in vivo* chez le naissain et la démonstration du pouvoir pathogène de cet agent sur ce stade de développement, pourront être poursuivis grâce à la disponibilité de ces outils. Ce type de travail est indispensable pour démontrer l'implication du virus de type herpès dans les phénomènes de mortalité observés chez le naissain d'huître. Par ailleurs, le fait de disposer d'un modèle de reproduction expérimentale de l'infection virale permettrait d'explorer les conditions d'expression de la maladie (influence des facteurs de stress) et de proposer à terme aux professionnels des conduites à tenir vis à vis de cet agent infectieux.

Annexe :
Protocole de PCR optimisé
- Recommandations -

Annexe

PROTCOLE DE PCR POUR LA RECHERCHE D'ADN DE VIRUS DE TYPE HERPES CHEZ LE NAISSAIN D' HUITRE - RECOMMANDATIONS -

I - PREPARATION DES ECHANTILLONS (salle de préparation des échantillons).

- 1 - Congélation systématique des échantillons égouttés, dans leur coquille à -20 °C (en sacs plastiques ou piluliers identifiés), le plus rapidement possible après prélèvement.
- 2 - Conservation de 3 mois maximum au congélateur à -20 °C avant analyse en PCR.
- 3 - Mettre des gants.
- 4 - Ouverture des animaux encore congelés : 30 individus par lot en utilisant une lame de scalpel neuve pour chaque lot.
- 5 - Décongélation des animaux dans leur coquille après ouverture.
- 6 - Sortir les animaux des coquilles lorsque la décongélation est effective.
- 7 - Séchage sur papier absorbant jusqu'à ce qu'aucune trace d'humidité ne soit visible.
- 8 - Confection de pools de 5 individus en sachets Minigrippe.
- 9 - Recongélation à -20 °C des pools d'animaux.

RECOMMANDATIONS :

- Réalisation des broyats dans les 15 jours après la recongélation des échantillons.
- Après 3 mois de recongélation, les lots ne doivent plus faire l'objet d'une analyse.

II - PREPARATION DES BROYATS (salle de préparation des échantillons).

- Mettre des gants.
- Sortir les sachets Minigrippe du congélateur et les placer sur glace.
- La technique de broyage utilisée est fonction de la taille des animaux :
 - ❖ Animaux \leq T12 broyage en tube Eppendorf de 1,5 ml :
 - Tarer les tubes Eppendorf au fur et à mesure de leur utilisation.
 - Ouvrir le sac Minigrippe et récupérer les animaux à la pipette Pasteur.
 - Transférer les animaux d'un pools dans un tubes Eppendorf.
 - Peser les animaux.
 - Additionner X ml d'eau bidistillée pour de X g de tissus pesés.
 - Broyer au piston Pellet jusqu'à obtention d'un broyat homogène.
 - ❖ Animaux $>$ T12 broyage au maillet :
 - broyage au maillet en caoutchouc directement dans les sacs Minigrippe sans ajout d'eau bidistillée.
 - Changer de papier absorbant, mis sous les sacs, pour chaque pool (sec).
 - Lavage à l'eau courante du maillet après broyage de chaque pool.

- Regrouper dans le sac l'ensemble des tissus broyés avec le dos d'une lame de scalpel.
- Couper un coin du sac avec la lame de scalpel.
- Récupérer X g de broyat dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.
- Changer de lame de scalpel entre chaque sac.

REMARQUE : les tubes Eppendorf sont à conserver sur glace durant cette étape de préparation des broyats.

III - PREPARATION DES SURNAGEANTS DE BROYATS (salle de préparation des échantillons).

1 - Addition d'eau bidistillée :

- ❖ Animaux \leq T12 : déjà réalisée.
- ❖ Animaux $>$ T12 : ajouter X ml d'eau bidistillée pour X g de tissus pesés.
Après addition d'eau, vortexer les tubes et les conserver sur glace.

2 - Traitement des broyats en tube Eppendorf au bain marie bouillant pendant 10 min.

3 - Mise sur glace.

4 - Vortexer .

5 - Centrifugation 10 000 trs/min pendant 5 minutes.

6 - Récupération du surnageant de broyat, le volume est fonction de la catégorie de taille des animaux :

- ❖ Animaux \leq T12 récupération d'un volume de surnageant égal à $1/5^{\text{ème}}$ du volume d'eau bidistillée ajoutée pour réaliser le broyat et dilution immédiate au $1/10^{\text{ème}}$ (exemple : 100 μ l d'eau ajoutée pour réaliser le broyat \rightarrow récupérer 20 μ l de surnageant et le reprendre dans 180 μ l d'eau bidistillée).

- ❖ Animaux $>$ T12 récupération de 100 μ l de surnageant de broyat et dilution immédiatement dans 900 μ l d'eau bidistillée.

7 - Vortexer les dilutions de surnageant.

8 - Congélation immédiate.

RECOMMANDATIONS :

- Congélation du surnageant de broyats à -80°C , si possible plutôt qu'à -20°C .
- Réaliser les analyses en PCR dans les 8 jours qui suivent la congélation des dilutions de surnageants.

IV - MISE EN OEUVRE DE LA REACTION DE PCR (salle de préparation des réactifs et salle des thermocycleurs).

1 - Réalisation de la PCR1 :

- Mettre des gants.
- Décongélation des échantillons sur la pailleuse, puis les conserver sur un portoir, dans la glace dans la pièce où se trouve le thermocycleur.
- Retirer les gants.
- Passer dans la pièce de préparation des réactifs.

- Remettre des gants neufs.
- Préparer les tubes pour la PCR1, les fermer et les identifier. Les mettre sur un portoir dans la glace.
- Décongeler les réactifs (tampon 10X, MgCl₂, nucléotides...) dans les mains.
- Préparer le mélange réactionnel pour la PCR1 dans un Eppendorf, préparation pour un tube (à multiplier n fois pour n tubes) :

❖ H ₂ O	31,6 µl
❖ Tampon 10X	5 µl
❖ dNTPs	5 µl
❖ MgCl ₂	5 µl
❖ Amorces 3	1 µl
❖ Amorces 4	1 µl
❖ Taq	0,4 µl

- Distribuer le mélange réactionnel préparé (49 µl / tube) avec le même cône à filtre dans les tubes Eppendorf. Laisser les tubes ouverts sur glace.
- Passer les tubes contenant le mélange réactionnel dans la pièce où se trouve le thermocycleur et les échantillons (surnageants de broyats).
- Allumer le thermocycleur (CROCODILE III) afin de préchauffer le couvercle.
- Attendre 3 minutes après réglage de la pipette automatique sur 1 µl puis distribuer 1 µl d'échantillon (surnageant de broyat) et des différents témoins dans les tubes contenant les 49 µl de mélange réactionnel. Les tubes contenant les échantillons sont vortexés avant de prélever 1 µl. Fermer les tubes de PCR1 au fur et à mesure de l'addition des échantillons.
- Vortexer et centrifuger (10 sec dans une centrifugeuse de paillasse) les tubes de PCR1.
- Placer les tubes dans le thermocycleur.
- Lancer le programme de PCR choisi.

2 - Réalisation de la PCR2.

- La préparation du mélange réactionnel, sa distribution et l'addition des échantillons (produits de PCR1) sont identiques à celles mises en œuvre lors de la PCR1. Cependant, dans ce cas, le volume de mélange réactionnel est de 50 µl par tube et le volume d'échantillon (produits de PCR1) de 0,1 µl. Attendre 3 minutes, après réglage de la pipette automatique sur 0,1 µl, pour l'utiliser.

- Composition du mix de PCR2 :

❖ H ₂ O	32,6 µl
❖ Tampon 10X	5 µl
❖ dNTPs	5 µl
❖ MgCl ₂	5 µl
❖ Amorces 5	1 µl
❖ Amorces 6	1 µl
❖ Taq	0,4 µl

- Placer les tubes dans le thermocycleur.
- Mettre en route le programme de PCR choisi.

Laisser les tubes de PCR2 dans l'appareil toute la nuit.

RECOMMANDATIONS :

- Laisser ouvert durant toute l'étape de distribution des échantillons, le tube d'eau bidistillée utilisé pour réaliser les témoins négatifs (contrôle de la contamination ambiante sur la paillasse).
- Incorporer lors de la PCR1 :
 - ❖ des témoins négatifs (eau bidistillée) premier tube et un contrôle négatif entre chaque lot.
 - ❖ des témoins positifs (2500 et $5 \cdot 10^7$ copies de génome viral), les deux derniers tubes.
- Programmes PCR1 et PCR2 identiques.
- Conserver les produits de PCR1 au réfrigérateur le temps de préparer la PCR2.
- Faire la PCR1 et la PCR2 dans la même journée.
- Utiliser un Pipetman P2 pour distribuer les échantillons (1 μ l) en PCR1 et les produits de PCR1 (0,1 μ l) pour la PCR2.

V - ANALYSE DES PRODUITS DE PCR2 EN GEL D'AGAROSE (salle des thermocycleurs).

- 1 - Récupération des tubes de PCR2 dans le thermocycleur et les placer au réfrigérateur.
- 2 - Couler un gel d'agarose 1% contenant du BET.
- 3 - Déposer des gouttes (2 μ l avec une P20) de tampon de dépôt sur un Parafilm.
- 4 - Ajouter 10 μ l d'échantillon (produits de PCR2) par goutte de tampon de dépôt.
- 5 - Mélanger l'échantillon et reprendre la totalité de la goutte.
- 6 - Déposer le volume total (environ 12 μ l) par puits.
- 7 - Migration 150 volts (attendre que les deux bandes de bleu soient distantes d'au moins 2 cm).
- 8 - Lecture à la table UV :

- **Témoins négatifs : négatifs**
- **Deux témoins positifs (2500 et $5 \cdot 10^7$ copies) : positifs**

SI CES TEMOINS NE DONNENT PAS LE RESULTAT ATTENDU, L'INTERPRETATION DES RESULTATS N'EST PAS POSSIBLE.