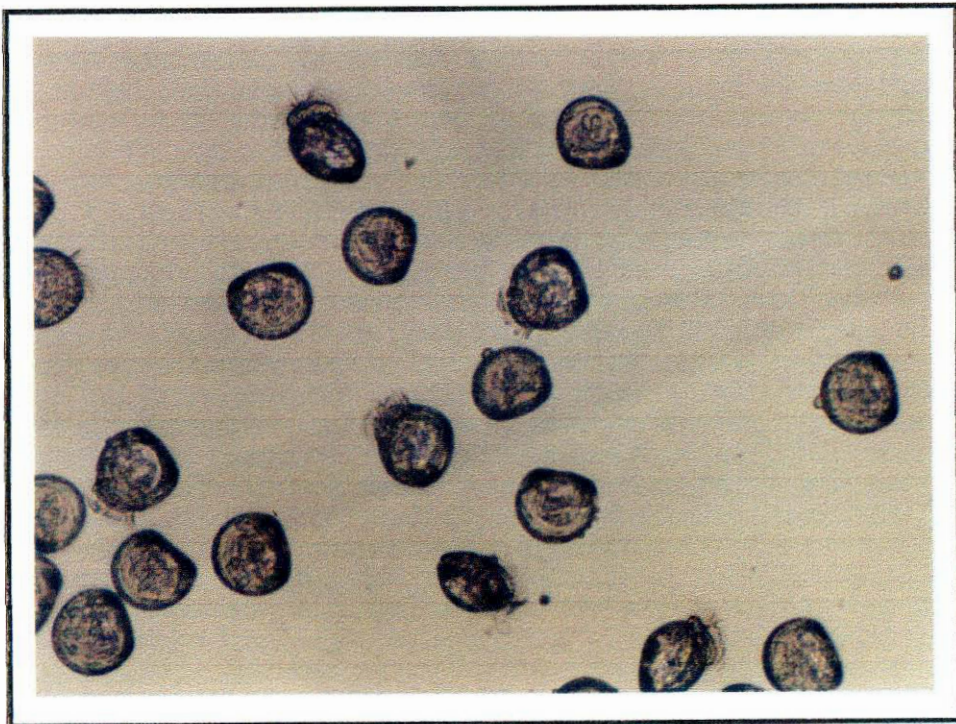


**Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes  
Formation en Aquaculture et Pathologie Aquacole**

**Rapport de stage (mars - juin 1996)**

**Patricia SEVERIN**

**Technique de PCR appliquée à la détection du virus de  
type herpes de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* :  
diagnostic et applications expérimentales**



**Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie  
B. P. 133 - 17390 La Tremblade**

## TABLE DES MATIERES

<b>1.- INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>2.- UTILISATION DE LA PCR POUR LE DIAGNOSTIC DE L'HERPESVIRUS</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Matériels et méthodes</b>	<b>6</b>
2.1.1 Principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR)	6
2.1.2 La PCR appliquée à la détection de l'ADN de l'herpèsvirus	9
2.1.3 Matériel biologique	10
2.1.4 Traitement des échantillons	11
2.1.5 Quantité d'échantillon à amplifier	11
2.1.6 Sensibilité de la méthode	12
<b>2.2 Résultats</b>	<b>12</b>
2.2.1 Quantité d'échantillon à amplifier	12
2.2.2 Sensibilité de la méthode	15
<b>2.3 Discussion</b>	<b>19</b>
<b>3.- UTILISATION DE LA PCR A DES FINS EXPERIMENTALES :</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Matériels et méthodes:</b>	<b>22</b>
3.1.1 Matériel biologique	22
3.1.1.1 Infection de arves axéniques virosées	22
3.1.1.2 Infection de larves conventionnelles virosées	24
3.1.2 Suivi en élevage de la cinétique de développement du virus	24
3.1.3 Transmission du virus par l'eau d'élevage	25
3.1.4 Conservation du pouvoir pathogène du virus dans l'eau d'élevage.	26
3.1.5 Action de la température sur le pouvoir infectieux du virus	27
<b>3.2 Résultats</b>	<b>28</b>
3.2.1 Cinétique de développement du virus	28
3.2.2 Transmission de l'herpèsvirus par l'eau d'élevage :	32
3.2.3 Conservation du pouvoir pathogène de l'herpèsvirus dans l'eau d'élevage :	34
3.2.4 Sensibilité de l'herpèsvirus au facteur température	35
<b>3.3 Discussion</b>	<b>37</b>
<b>4.- CONCLUSION GENERALE</b>	<b>40</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>41</b>



## 1.- INTRODUCTION

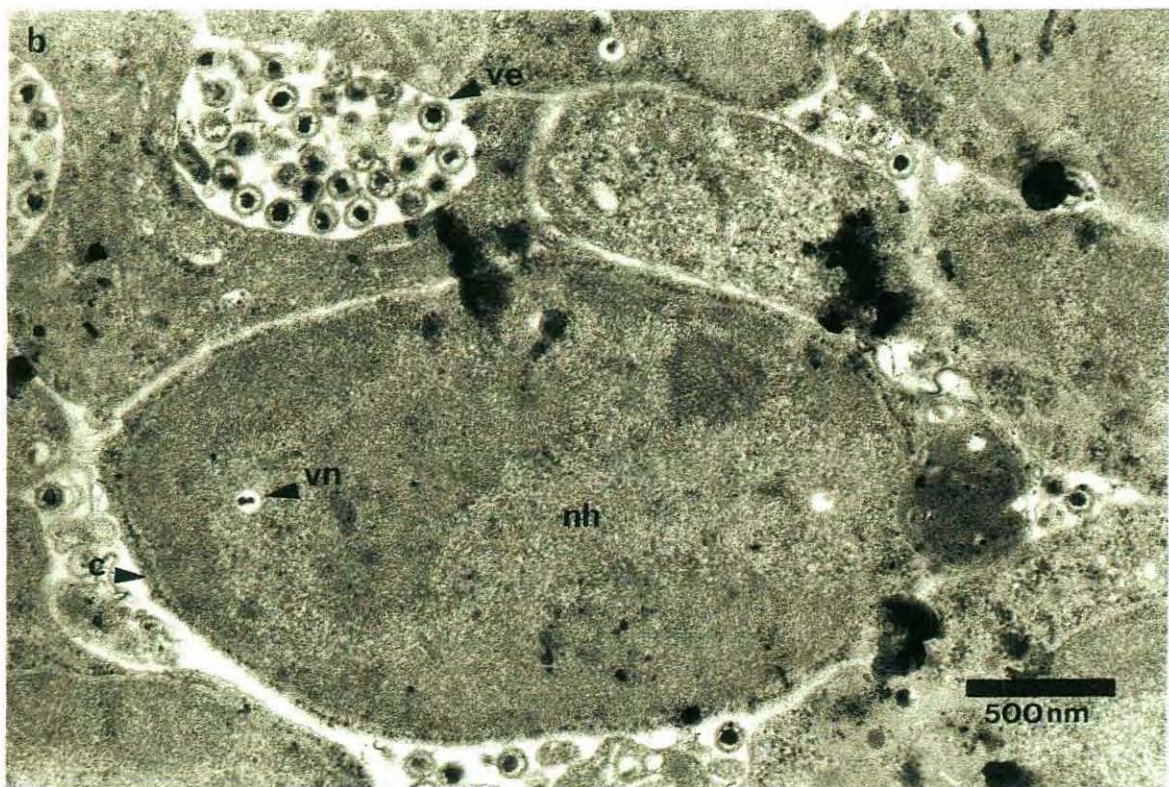
En 1991, des mortalités importantes de larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été observées en France dans des écloséries de bivalves (Comps *et al.*, 1992). Dans le même temps des mortalités ont été constatées sur des naissains d'huître plate, *Ostrea edulis*, (Comps et Cochenec, 1992). Ces mortalités pouvaient atteindre de 60 % à 100%. Des observations en histologie et microscopie électronique à transmission (figure 1) (Nicolas *et al.*, 1992 ; Comps et Cochenec, 1992) ont permis de révéler la présence de particules virales semblant appartenir à la famille des *Herpesviridae*. A la même période, des mortalités importantes ont également été décrites par Hine (1992) en Nouvelle- Zélande. L'agent pathogène décrit était également un virus de type herpès. Dans les deux cas, les observations réalisées ont portées sur des larves présentant des mortalités .

Depuis 1991, ces mortalités estivales se répètent dans les écloséries (Renault *et al.* 1994 a). De plus, en juillet et août 1993, des mortalités anormales ont également été observées sur des lots de naissains d'huître creuse, *C. gigas*, âgés de trois à sept mois et provenant d'écloserie (Renault *et al.*, 1994 b). Des observations en microscopie électronique à transmission révèlent à nouveau la présence de particules virales de type herpès ( Renault *et al.*, 1994). Jusqu'en 1993, le virus n'a été décrit que sur des lots provenant d'écloserie du fait de la plus grande facilité à suivre les mortalités en milieu confiné. Mais, en 1994 et 1995, il a été décrit sur des lots de naissains provenant aussi bien d'écloserie que du captage naturel.

Jusque là, l'impact de cet agent pathogène sur la production semble relativement limité (Renault *et al.*, 1994 b). Cependant, l'information d'un point de vue épidémiologique reste partielle. En effet, la recherche de l'agent pathogène reposait jusqu'en 1995, sur les techniques d'histologie et de microscopie électronique à transmission pour lesquelles la multiplication des analyses reste difficile. De plus, elles nécessitent d'utiliser du matériel le moins dégradé possible. Dans le milieu naturel les mortalités ne peuvent être suivies quotidiennement, aussi, lorsque des échantillons présentant des mortalités sont prélevés, les tissus sont trop dégradés pour pouvoir faire l'objet d'analyse. Cependant, depuis 1991, plusieurs écloséries privées ont subi des pertes importantes de lots de larves. Les pontes présentant des mortalités ont été trouvées infectées par un virus de type herpès. Par ailleurs, depuis 1993, des cas de mortalité anormale, associés à la détection de virus de type herpès, sont régulièrement rapportées, au cours de la période estivale, sur des lots de naissain d'huître creuse et d'huître plate aussi bien dans des nuseries que dans le milieu naturel (Renault, com. pers.).

La production de *C. gigas* représente la part la plus importante de la production française de coquillages. La seconde espèce d'huître élevée en France est l'huître plate, *O. edulis*. Depuis 1970, sa production a chuté considérablement : de 20 000 tonnes par an, elle est tombée à 1800 tonnes en 1992.





**Figure 1** : Clichés en microscopie électronique à transmission de tissus de larve d'huître creuse, *C. gigas*, infectée par le virus de type herpès. 1a : Cellules à noyau hypertrophié (nh) ; présence de particules virales intranucléaire (vn), intracytoplasmique (vc) ou extracellulaire (ve). 1b : Cellule présentant un noyau hypertrophié (nh) et un cytoplasme réduit à une frange périnucléaire (c) ; des particules virales intranucléaires (vn) et extracellulaire (ve) sont également visibles. Barres : 500 nm. Clichés : T. Renault.



L'apparition et le développement de deux parasitoses dues à *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae* en sont les causes. Afin d'éviter que ce type de situation ne se produise pour l'huître creuse, *C. gigas*, il est important d'étudier l'herpèsvirus, son mode de transmission et d'éviter son éventuelle extension en trouvant les moyens de l'éradiquer ou au moins de prévenir son développement.

Suite à différents essais en laboratoire (1993-1994), le postulat de Koch a été vérifié, en ce qui concerne les larves. Des larves axéniques de *Crassostrea gigas* ont été infectées expérimentalement avec des ultrafiltrats de broyât de larves de *C. gigas* infectées. L'analyse en microscopie électronique des larves de *C. gigas* expérimentalement infectées a révélé la présence de particules virales de type herpès (Le Deuff *et al.*, 1993); de même si l'ultrafiltrat est obtenu à partir d'un broyat de larves d'*O. edulis* infectées. A ce stade il n'a pas encore été possible de reproduire expérimentalement l'infection sur du naissain ou des adultes d'huître creuse ou plate.

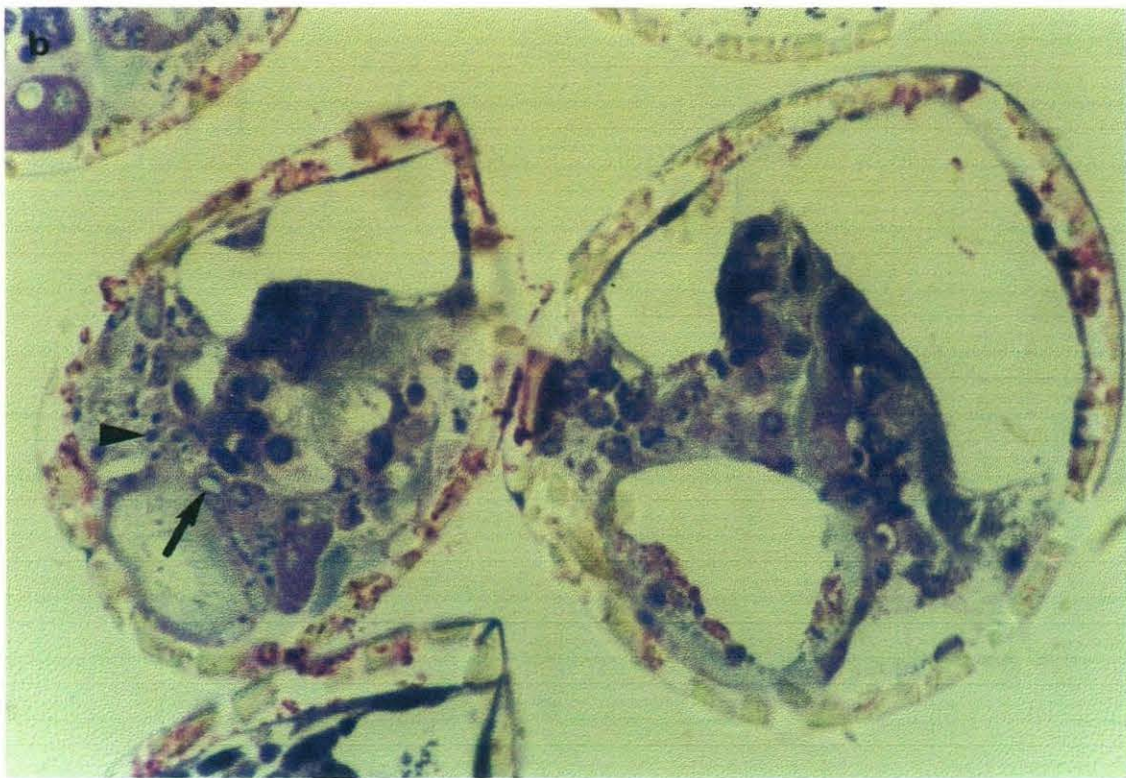
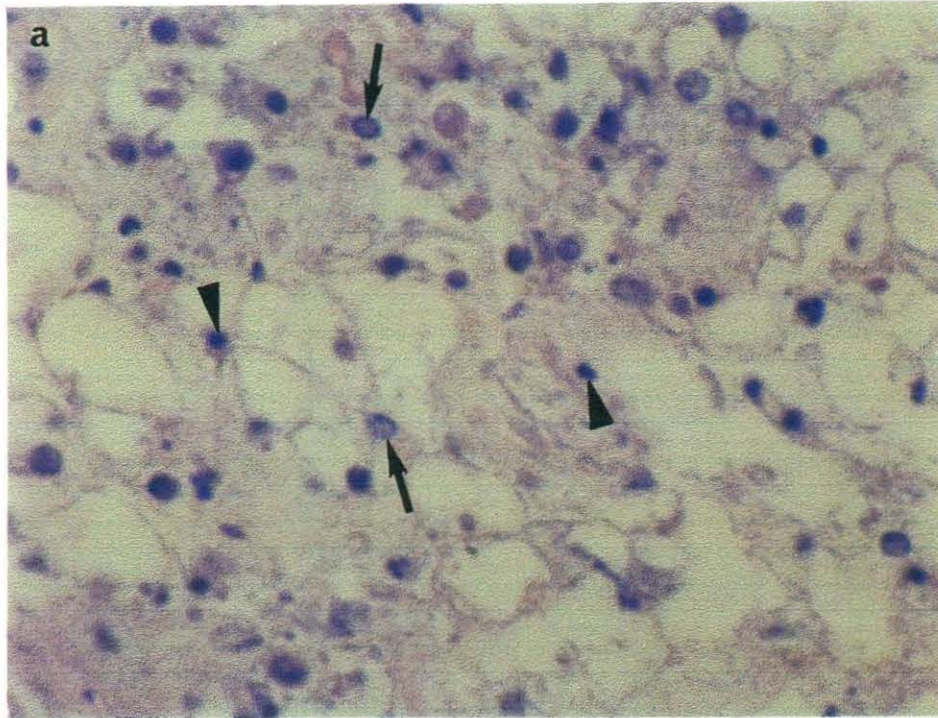
Diverses expérimentations menées en 1994 font apparaître un développement préférentiel du virus à des températures élevées, de l'ordre de 25-26°C (Le Deuff *et al.*, 1996).

Il est difficile de mettre en oeuvre des moyens de lutte contre cet agent pathogène. La culture des huîtres se pratique essentiellement en milieu ouvert, l'agent pathogène en cause est un virus, il est impossible d'imaginer appliquer un traitement quelconque. Les coquillages infectés sont des invertébrés qui ne possèdent pas d'anticorps. De ce fait, la vaccination ne peut être envisagée comme moyen de lutte contre des agents pathogènes les infectant. Le seul moyen de lutte efficace contre ce pathogène reste la prophylaxie. Elle nécessite des moyens de diagnostic adéquats. Par conséquent, il est nécessaire de mettre au point des techniques de diagnostic qui soient efficaces et rapides.

Les techniques diagnostiques disponibles chez les mollusques bivalves sont assez peu nombreuses. Du fait de symptômes macroscopiques non spécifiques développés par les larves et en l'absence d'anticorps spécifiques chez les mollusques marins, il faut ici rechercher l'agent pathogène lui-même et non sa trace. D'autre part, il n'existe pas de lignées cellulaires de bivalves marins qui permettraient d'étudier l'agent pathogène par le biais de ses effets cytopathogènes. Cependant, des essais de propagation du virus *in vitro* sur cultures cellulaires hétérologues et primocultures homologues ont été tentés sans résultats probants (Le Deuff, 1995).

L'histologie classique permet d'observer des réactions inflammatoires des tissus conjonctifs et dans différents organes (Comps et Cochenec, 1992, Renault *et al.*, 1994), ou des anomalies nucléaires chez les animaux infectés (figure 2). Ces observations ne permettent toutefois pas de conclure à la présence du virus, elles ne sont pas spécifiques de cette infection. Il ne s'agit là que d'un diagnostic de présomption. Il est nécessaire de confirmer le diagnostic par la microscopie électronique à transmission.





**Figure 2** : Lésions histologiques associées à l'infection de naissain (2a) et de larves (2b) de *C. gigas* par le virus de type herpès. Les lésions nucléaires sont de deux types : certains noyaux apparaissent hypertrophiés, leur chromatine est condensée en périphérie (flèches) ; d'autres noyaux, hyperbasophiles, sont très condensés (têtes de flèches). Grossissement 1000. Clichés R. Le Deuff.



Cette technique est lourde et coûteuse, notamment, en ce qui concerne le naissain et les adultes, car elle nécessite le traitement de nombreux échantillons, chaque individu étant traité séparément. Elle ne peut être, dans ce cadre, envisagée comme une technique diagnostique de routine.

La recherche et la mise au point d'autres techniques de diagnostic apparaissent comme prioritaires. Les progrès réalisés dans le domaine des biotechnologies et de la biologie moléculaire peuvent permettre d'améliorer les connaissances dans le domaine de la virologie des bivalves marins. L'ensemble de ces techniques est basé sur la recherche de l'agent pathogène à l'aide de réactifs spécifiques. Certains de ces réactifs sont aujourd'hui disponibles pour l'herpèsvirus.

En 1995, la purification du virus réalisée à partir de larves fraîches infectées et fournies par des écloseries a permis la levée du point de blocage que représentait l'obtention de particules virales en nombre suffisant pour le développement de ces outils de diagnostic. L'obtention de virus purifié a permis dans un premier temps de caractériser l'agent pathogène en cause. L'extraction de l'ADN viral a montré qu'il s'agit bien ici d'un ADN double brin, d'une taille d'environ 180kpb (Le Deuff, 1995). Ces données confirment les observations effectuées en microscopie électronique et la probable appartenance du virus à la famille des *Herpesviridae*. Le clonage des fragments d'ADN, réalisé au laboratoire IFREMER de Ronces Les Bains (Charente Maritime), a permis de réaliser des sondes nucléiques et de sélectionner quatre fragments pour vérifier leur spécificité. Une fois celle-ci vérifiée, il a été possible de le séquencer et de construire des amorces spécifiques de l'ADN viral recherché (IFREMER Sète, C. Delsert). Ainsi la technique de PCR (Polymérase Chain Reaction) peut être utilisée pour détecter la présence de l'ADN viral dans des lots de larves ou de naissains d'huître. Des amplifications sur ADN viral purifié, ADN extrait de larves virosées et sur broyat de larves et de naissains infectés (infection constatée par microscopie électronique) ont été réalisées et se sont révélées positives. Par contre, aucune amplification sur ADN d'huîtres creuses adultes présumées indemnes n'a été obtenue. Les amorces sélectionnées peuvent donc être considérées comme spécifiques de l'herpèsvirus. L'ensemble de ces travaux a permis d'envisager une méthodologie pour le traitement des échantillons de larves et de naissains présentant des mortalités afin de rechercher la présence de l'herpès. De plus, du fait de la grande sensibilité de la méthode, il serait envisageable de détecter le virus en phase de latence.

L'objet de ce travail rapporté ici était de mettre au point un protocole de traitement des échantillons qui soit fiable, reproductible et rapide, en utilisant la PCR comme outil de détection du virus. Il s'agissait de déterminer le mode de traitement de chacun des échantillons, larves, naissain ou adultes, les quantités de matériel à doser afin d'éviter les faux négatifs et, de définir la sensibilité de la méthode. Ce protocole, une fois établi, a été utilisé dans le domaine expérimental afin de définir quelques caractéristiques du virus : mode de transmission, survie, thermosensibilité.



## 2.- UTILISATION DE LA PCR POUR LE DIAGNOSTIC DE L'HERPESVIRUS

### 2.1 Matériels et méthodes

#### 2.1.1 Principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR)

La technique de PCR mise au point en 1985 par Saiki (Saiki *et al.*, 1988) est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un segment d'acide nucléique situé entre deux séquences connues. Cette technique est d'utilisation courante en biologie moléculaire grâce notamment à l'utilisation d'une ADN polymérase thermorésistante : la Taq polymérase issue de bactéries thermophiles (*Thermus aquaticus*)

Dans le cas de l'herpèsvirus, nous nous intéresserons à la PCR directe, car il est question ici d'un virus à ADN. Cette amplification de l'ADN comprend plusieurs cycles de trois étapes chacun. Chacune des étapes est réalisée à une température particulière.

La première étape réalisée à 95°C consiste en une dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin. Chacun des brins ainsi dédoublé servira de matrice pour l'amplification ultérieure. La seconde étape réalisée à 50°C permet l'hybridation des amorces qui serviront de point de départ à la polymérisation. Ces amorces s'hybrident de façon spécifique sur les brins d'ADN de part et d'autre d'une séquence cible. La troisième étape réalisée à 72°C provoque l'allongement des amorces grâce à l'ADN polymérase thermorésistante (schéma 1).

Le cycle décrit précédemment peut être répété une trentaine de fois sans qu'il soit nécessaire de modifier ou d'intervenir sur le mélange réactionnel. Au-delà, l'enzyme (la Taq polymérase) a été totalement utilisée ou est trop dénaturée pour être encore efficace.

Par cette technique, la quantité de cible initiale peut être multipliée par un million ( $10^6$ ).

Une seconde amplification (nested PCR ou PCR gigogne) peut être réalisée à partir de l'échantillon amplifié en première PCR. Elle nécessite un deuxième couple d'amorces qui s'hybrident de façon spécifique à l'intérieur du premier fragment d'ADN déjà amplifié. Le poids moléculaire du fragment amplifié en seconde PCR est plus faible, mais la spécificité de l'amplification est accentuée. Les taux d'amplification peuvent alors atteindre  $10^9$  à  $10^{10}$ .

L'ADN amplifié est ensuite visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose, l'ADN étant coloré au bromure d'éthidium (figure 3). Après la migration, les échantillons déposés sur le gel sont visualisés sur une table lumineuse en lumière U.V. Si les produits d'amplification sont en quantité suffisante, ils apparaissent sous la forme d'une bande rose fluorescente. Un marqueur de poids moléculaire déposé sur le gel en même temps que les échantillons permet de vérifier que le fragment d'ADN amplifié possède le même poids moléculaire que le segment d'ADN cible.

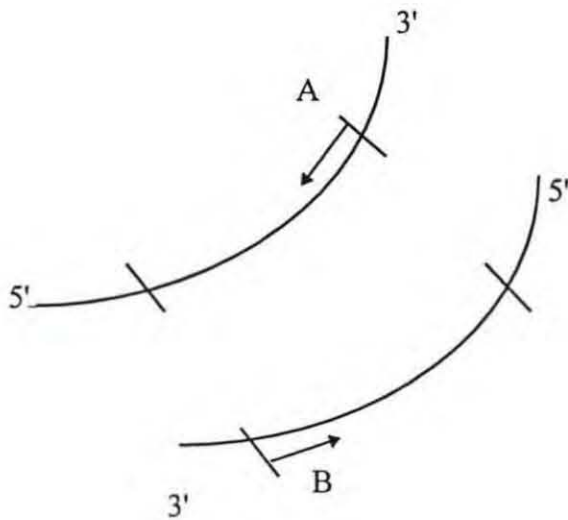
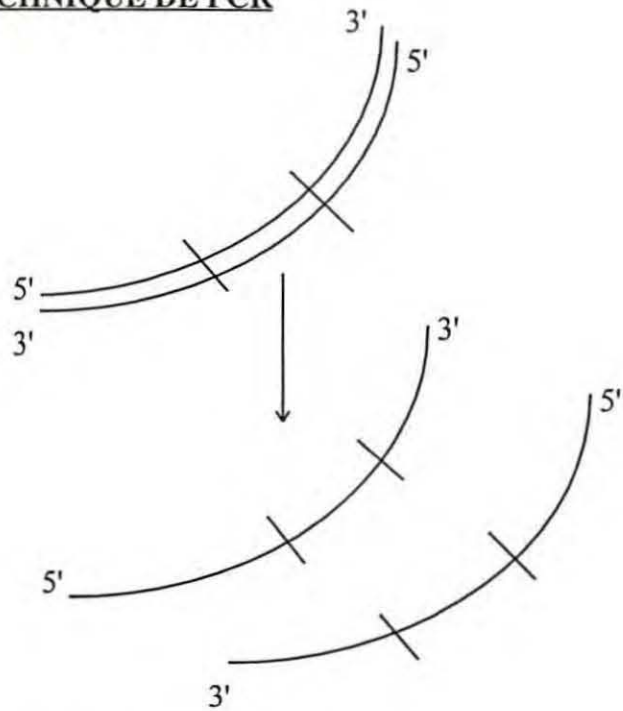


## SCHEMA 1 : LA TECHNIQUE DE PCR

### **DENATURATION**

94°C pendant 1 minute.

Sous l'effet de la température, les deux brins constituant l'ADN sont séparés.



### **HYBRIDATION**

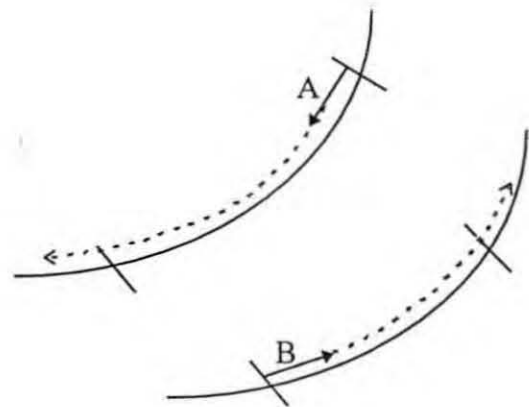
50°C pendant 1 minute.

A cette température, les amorces A et B, qui serviront de départ à la polymérisation s'hybrident de façon spécifique sur l'ADN matrice, de part et d'autre de la séquence cible d'amplification.

### **ELONGATION**

72°C pendant 1 minute.

C'est l'étape d'allongement des amorces par polymérisation de l'ADN. L'enzyme utilisée est une ADN polymérase thermorésistante (= Taq polymérase) purifiée à partir de bactéries thermophiles.

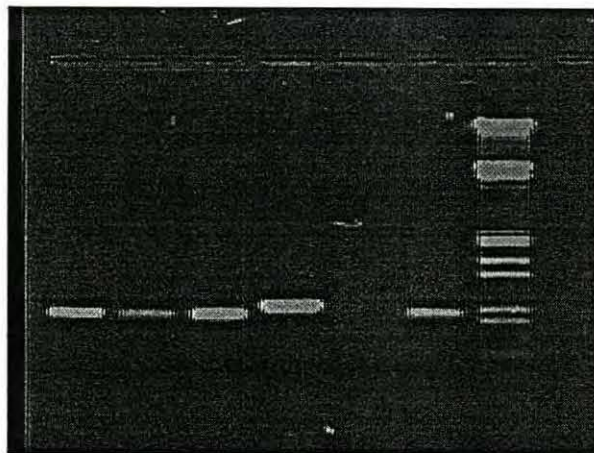




**Figure 3**

Marqueur de taille - témoin négatif et positif

1 2 3 4 5 6 mt



mt : marqueur de taille

5 : témoin négatif

6 : témoin positif en PCR1 (ADN viral)

4 : témoin positif en PCR2 (ADN viral)

1, 2, 3 : échantillons virosés



Le milieu réactionnel de la PCR est composé d'un tampon de réaction, de chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ). La concentration en cations divalents dans le milieu réactionnel conditionne la réussite de l'amplification. Si la quantité de  $Mg^{++}$  augmente, l'amplification est plus importante mais le bruit de fond augmente également. Trop de cations  $Mg^{++}$  peuvent également inhiber l'enzyme. Leur concentration optimale sera déterminée spécifiquement selon l'ADN à amplifier, le type d'enzyme et selon chaque couple d'amorces.

Les nucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) sont indispensables à la polymérisation de l'ADN. Il est nécessaire d'y ajouter les amorces qui sont des oligonucléotides de synthèse de 16 à 24 bases de long et la polymérase thermorésistante.

### **2.1.2 La PCR appliquée à la détection de l'ADN de l'herpèsvirus**

#### **Type de PCR**

Chaque analyse est réalisée en PCR gigogne (nested PCR). La quantité d'échantillon à prélever pour la seconde PCR sera déterminée en fonction du résultat obtenu en première PCR : 1  $\mu$ l si aucune bande n'est visible lors de la migration par électrophorèse, 1  $\mu$ l d'une dilution au 1/50<sup>ième</sup> si la bande est nettement visible. Une trop grande quantité de fragment d'ADN cible inhibe la seconde PCR.

Les amorces portent les numéros suivants : 3 et 4 pour la première PCR ou PCR1, 5 et 6 pour la seconde PCR ou PCR2. Leur concentration dans le milieu réactionnel est de 2 ng/ $\mu$ l. Les séquences de ces amorces ne sont pas fournies dans ce rapport car pas elles n'ont pas encore été publiées. Les nucléotides sont fournis par Eurogentech (composition en annexe 1), leur concentration d'utilisation est de 0,2 mM dans le mélange réactionnel et 0,05 mM pour chaque nucléotide triphosphate..



## Composition du milieu réactionnel

Le mélange réactionnel par tube de PCR est le suivant :

	PCR1	PCR2
Echantillon	a $\mu$ l	1 $\mu$ l*
Tampon	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Mg Cl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Nucléotides	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Amorce 3 ou 5	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Amorce 4 ou 6	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Taq polymérase	0,1 $\mu$ l	0,1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O distillée	(qsp 32,9 $\mu$ l- a.)	49 $\mu$ l
	-----	-----
Volume total	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l

a : volume d'échantillon variable selon les expérimentations.

\* : 1  $\mu$ l de l'échantillon amplifié en PCR1 ou 1  $\mu$ l d'une dilution au 1/50<sup>ième</sup> de cet échantillon.

## Les témoins

Deux types de témoins négatifs sont utilisés. D'une part de l'eau bidistillée ultrapure et, d'autre part de l'ADN de *C. gigas* présumées saines. En répartissant les témoins eau distillée dans la série à analyser, la présence d'éventuelles contaminations dues aux manipulations est contrôlée. Le second (ADN de *C. gigas*) permet de contrôler la spécificité des amorces, que celles-ci ne se fixent pas sur des séquences autres que la séquence cible.

Le témoin positif, composé d'ADN extrait de virus purifié permet de vérifier l'efficacité du milieu réactionnel et la qualité de la réaction de PCR.

### 2.1.3 Matériel biologique

Larves et naissain indemnes : Les larves, ont été fournies par une écloserie privée en l'absence de mortalité. Leur état sanitaire a été contrôlé au préalable par PCR.

Le naissain provient de captage naturel de La Seudre (Marennes Oléron) réalisé en août 1995. Les animaux ont une taille de 15-20 mm et ont été récoltés en mars 1996. L'absence d'herpèsvirus dans les tissus a été vérifié par PCR. 30 animaux ont été analysés par pool de 5. Un autre échantillon de ces mêmes animaux a été fixé dans du fixateur de Carson dans le but de conserver du matériel pour une analyse éventuelle en microscopie électronique.



Après analyse, ces deux lots (larves et naissain) sont conservés à -20°C.

Larves et naissain contaminés Ces échantillons ont été fournis par les professionnels. La présence d'herpèsvirus a été observée en histologie et microscopie électronique au moment de leur prélèvement en septembre 1995 pour les larves et au courant de l'année 1994 pour le naissain. Ensuite, ces échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les larves proviennent d'un lot fortement infecté (Le Deuff, com. pers.) (larves de 200µm avec 60% des animaux sédimentés au fond des bacs).

Virus purifié : l'ADN, extrait à partir de particules virales provenant de larves infectées (Le Deuff, 1995) a été purifié et quantifié. En solution de stockage, il se trouve à une concentration de 6,6µg/µl. Le poids d'un génome viral est de l'ordre de  $0.2 \cdot 10^{-9}$  µg.

#### **2.1.4 Traitement des échantillons**

Dans le cadre du diagnostic, les éleveurs font parvenir des échantillons de larves ou de naissains égouttés et congelés. Différents essais ont été menés afin de définir les quantités à traiter ainsi que la façon de traiter les échantillons.

Les protocoles utilisés sont les suivants. 50 mg de larves ou de naissain de petite taille sont broyés entièrement en présence de 50 µl d'eau distillée dans un tube type Eppendorf de 1,5 ml à l'aide d'un piston plastique jetable.

Le naissain et les individus de plus grande taille sont préalablement décoquillés et égouttés sur papier absorbant. Des lots de 30 individus sont traités par pools de cinq. Ils sont préalablement dilacérés avec une lame de rasoir dans une boîte de Pétri. 0,5g de chair ainsi dilacérée est broyée avec 0,5 ml d'eau distillée dans un tube type Eppendorf de la même façon que les larves

Les échantillons, larves et naissains, sont ensuite portés à 80-90°C dans un bain marie pendant 10 minutes. Cette étape permet de libérer l'ADN total et rend ainsi la cible d'ADN viral accessible à l'amplification enzymatique. Ils sont alors passés au vortex, puis centrifugés pendant 5 minutes à 4°C à 8000 trm. Le surnageant, contenant l'ADN viral, sera utilisé soit directement, soit après congélation pour la PCR.

#### **2.1.5 Quantité d'échantillon à amplifier**

Neuf fractions aliquotes des échantillons initiaux, larves et naissain infectés, sont réalisés : 0,125 - 0,25 - 0,50 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 et 6 µl. Le volume de chacun de ces



prélèvements est ajusté à 6  $\mu$ l avec de l'eau distillée. Chacune de ces dilutions est ensuite incorporée en totalité dans le milieu réactionnel de PCR. (paragraphe 2.1.2).

L'analyse comporte deux PCR consécutives (nested PCR).

### **2.1.6 Sensibilité de la méthode**

Une "gamme étalon" d'ADN viral dans l'eau distillée est réalisée à partir de la solution d'ADN extrait de particules virales. Le nombre de génome viral introduit par tube de PCR est de 1, 5, 10, 25 et 50.

Différentes gammes sont réalisées en mélangeant du surnageant de broyat de larves ou naissains présumés indemnes à des quantités données d'ADN viral. Pour les larves, à 2  $\mu$ l de surnageant de broyat sont ajoutés 1  $\mu$ l des solutions d'ADN viral suivantes : 0,5 - 5 - 50 - 500 - 5000 - 50 000 - 500 000 - 5 millions (M) - 50 M et 500 M de génomes viraux par  $\mu$ l. En ce qui concerne le naissain, ces mêmes dilutions sont ajoutées à 6  $\mu$ l d'échantillon. La gamme étudiée varie de 0,25 à 250 millions de virus par mg d'échantillon de larves et de 0,08 à 83 millions par mg d'échantillon de naissain.

Une autre gamme est réalisée pour les larves et le naissain. Les dilutions virales sont de 1, 5, 10, 25, et 50 génome viral par  $\mu$ l. 1  $\mu$ l de ces dilutions est ajouté à 1  $\mu$ l d'échantillon larvaire, ces 2  $\mu$ l étant ensuite incorporés aux 48  $\mu$ l du milieu de réaction. La gamme étudiée est alors de 1 à 50 génomes viraux par mg d'échantillon.

Pour le naissain, la gamme est étendue à 500, 5 000, 50 000, 500 000 et 5 millions de génomes viraux par  $\mu$ l. A 1  $\mu$ l de ces dilutions est ajouté 2  $\mu$ l d'échantillon de naissain. Ces 3  $\mu$ l sont ajoutés à 47  $\mu$ l de milieu réactionnel. La gamme étudiée est de 0,25 à 2,5 millions de génomes par mg d'échantillon.

## **2.2 Résultats**

L'apparition d'une bande fluorescente d'intensité plus ou moins marquée, après migration des échantillons amplifiés sur gel d'agarose indique une bonne détection de l'herpèsvirus (réaction positive). Une absence de bande indique une absence d'ADN amplifié ou une trop faible quantité pour être détectable. La réaction est considérée comme négative.

### **2.2.1 Quantité d'échantillon à amplifier**

Pour les larves, la quantité d'échantillon nécessaire à l'obtention d'une réaction nettement positive en PCR1 se situe entre 0,125 et 3  $\mu$ l d'échantillon. La quantité d'ADN viral amplifié est suffisante pour être visualisé après migration sur gel d'agarose (tableau 1). Au



delà, la lecture s'avère plus difficile, légèrement visible en PCR1 et PCR2, voire absente en PCR1 à 6 µl de surnageant de broyat introduit dans les tubes en PCR1.

Pour le naissain, quel que soit le volume utilisé en PCR1, il y a amplification de l'ADN viral (tableau 2) (figure 4).

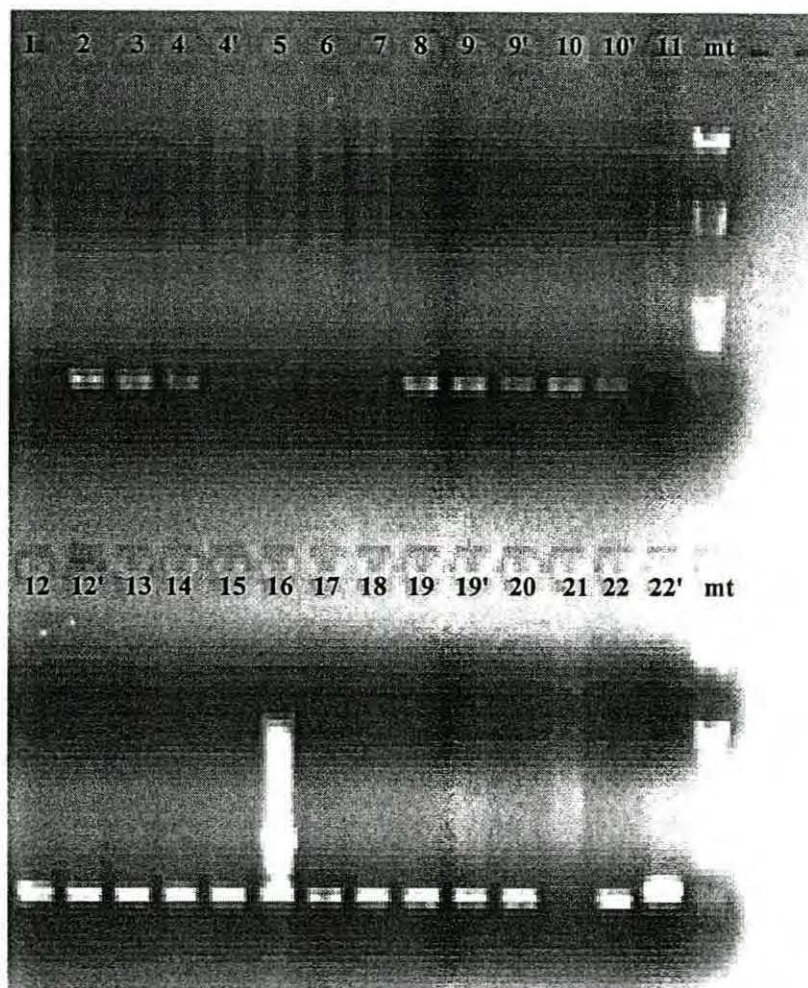
**Tableau 1** : Résultats d'amplification obtenue suite à l'introduction de quantités variables de surnageant de broyat de larves en PCR1.

LARVES										
Volume d'échant. en µl		0,125	0,25	0,50	1	2	3	4	5	6
Résultats	PCR1	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	-
	PCR2	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)
N° fig. 4		10	9	8	2	3	4	5	6	7

**Tableau 2** : Résultats d'amplification obtenus suite à l'introduction de quantités variables de broyats de naissain en PCR1.

NAISSAINS										
Volume d'échant. en µl		0,125	0,25	0,50	1	2	3	4	5	6
Résultats	PCR1	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+
	PCR2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N° figure 4		20	19	18	12	13	14	15	16	17

Figure 4 : Electrophorèse sur gel d'agarose après PCR2  
Quantité d'échantillon à doser.



mt : marqueur de taille

2 à 10 : échantillons larvaires (voir gamme en tableau 1)

1, 11 et 21 : témoins négatifs (eau distillée) 12 à 20 : échantillons de naissain. (voir gamme en tableau 2)

22 et 22' : témoin positif (ADN viral)

N' : dilution au  $1/50^{\text{ième}}$  de la PCR1 avant la PCR2



### 2.2.2 Sensibilité de la méthode

Les différentes gammes d'ADN viral étudiées permettent de déterminer la quantité minimale d'ADN viral détectable par la technique de PCR lors de l'analyse des échantillons de larves ou de naissains.

En eau distillée, en l'absence de tissus d'huîtres, la détection de l'ADN viral par PCR est possible à partir de 50 génomes introduit dans un tube de PCR (tableau 3).

**Tableau 3** : Amplification d'une gamme d'ADN viral dilué en eau distillée.

		Nombre de génomes par tube				
		1	5	10	25	50
Résultats	PCR1	-	-	-	-	-
	PCR2	-	-	-	-	+

En ce qui concerne les larves, le seuil limite de détection se situe à 25 génomes par mg d'échantillon lors du premier test (tableau 4a) et au delà de 50 génomes par mg d'échantillon lors du deuxième test (tableau 4b). Dans le premier cas 50 génomes viraux par tube PCR sont détectables, dans le second cas ils ne le sont pas.

Pour le naissain, le seuil de détection est de 5 million de génomes par tube, ce qui correspond, selon les gammes étudiées, soit à 0,8 (tableau 5a), soit à 2,5 millions par mg d'échantillon (tableau 5b) (figure 5).

**Tableau 4a**: Amplification par PCR de quantités de génomes viraux données en présence de 1 mg (surnageant de broyat) de tissus larvaires.

		LARVES									
Nombre de génomes par tube de PCR		0,5	5	50	500	5 000	50 000	0,5 M	5 M	50 M	500 M
Nombre de génomes par mg d'échantillon		0,25	2,5	25	250	2 500	25 000	0,25 M	2,5 M	25 M	250 M
Résultats	PCR1	-	-	-	-	-	-	-	(+)	+	+
	PCR2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
N° figure 5		10	9	8	7	6	5	4	3	2	1

Tableau 4b : Amplification par PCR de quantités de génomes viraux données en présence de 1 mg (surnageant de broyat) de tissus larvaire.

		LARVES				
Nombre de génomes par tube		1	5	10	25	50
Nombre de génomes par mg d'échantillon		1	5	10	25	50
Résultats	PCR1	-	-	-	-	-
	PCR2	-	-	-	-	-

Tableau 5a : Amplification par PCR de quantités de génome viral données en présence de 6 mg de tissus de naissain (6 µl de 500 mg de tissus broyés avec 500 µl d'eau distillée).

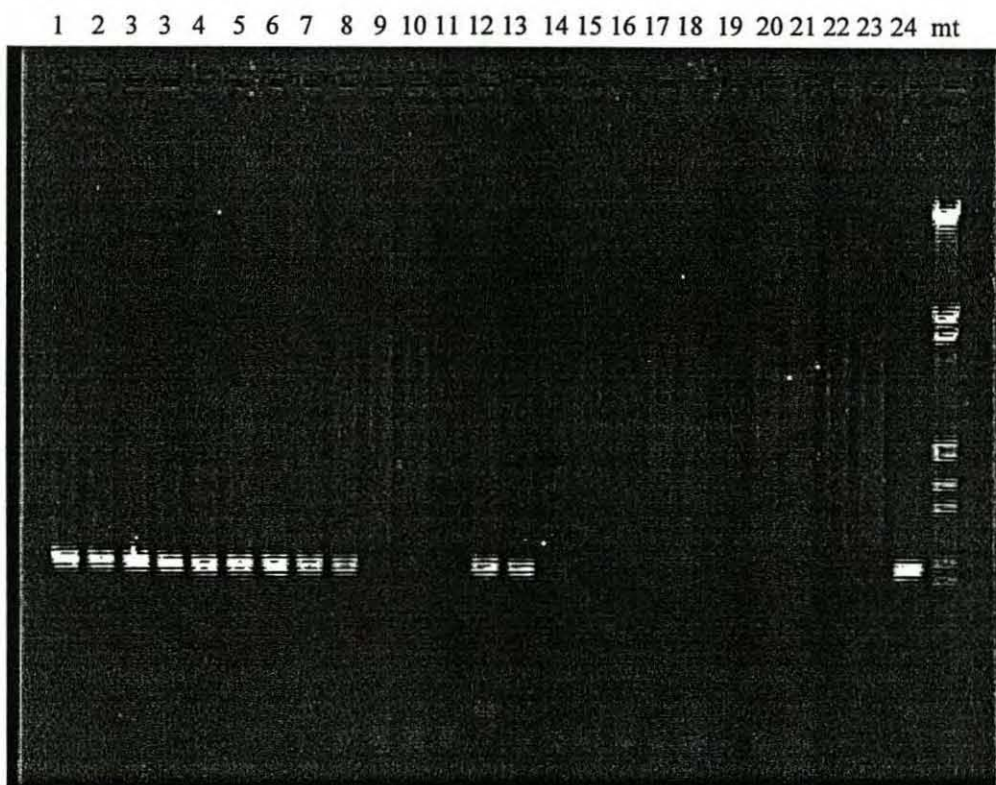
		NAISSAINS									
Nombre de génomes par tube de PCR		0,5	5	50	500	5 000	50 000	0,5 M	5 M	50 M	500 M
Nombre de génomes par mg d'échantillon		0,083	0,83	8,3	83	830	8 300	83 000	0,83 M	8,3 M	83 M
Résultats	PCR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PCR2	-	-	-	-	-	-	-	(+)	+	+
N° figure 5		21	20	19	18	17	16	15	14	13	12



Tableau 5b : Amplification par PCR de quantités de génome données en présence de 2 mg de tissus de naissain.

NAISSAINS										
Nombre de génomes par tube de PCR		1	10	25	50	500	5000	50 000	0,5 M	5 M
Nombre de génomes par mg d'échantillon		0,5	5	12,5	25	250	2 500	25 000	0,25 M	2,5 M
Résultats	PCR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PCR2	-	-	-	-	-	-	-	-	+

**Figure 5**  
Sensibilité PCR2



mt : marqueur de taille

1 à 10 : échantillons larvaires (voir gamme en tableau 4a)

11, 22, 23 : témoins négatifs

12 à 21 : échantillons de naissain (voir gamme en tableau 5a)



### 2.3 Discussion

Dans un premier temps, le témoin négatif constitué par de l'ADN de *C. gigas* présumée indemne a permis de vérifier la spécificité des amorces. Après plusieurs utilisations successives, du fait d'une contamination accidentelle au cours des différentes manipulations, il s'est révélé être positif en PCR2. C'est pourquoi il a été écarté, seuls les témoins négatifs en eau distillée ont été conservés.

Un phénomène d'inhibition de l'amplification de l'ADN viral est observé à partir de 4 µl d'échantillon par les surnageants des broyats de larves infectées introduit en PCR1 dans le milieu réactionnel. A 6 µl il n'y a plus de bande observable en PCR1. L'inhibition semble apparaître progressivement. Dans un premier temps, les produits inhibiteurs sont en faible quantité et n'entrent pas en compétition avec les réactifs de la PCR. L'augmentation de la quantité d'échantillon dans le milieu réactionnel s'accompagne d'une augmentation de la quantité de constituants provenant des tissus larvaires (enzymes, sels...). Ceux-ci sont susceptibles d'inhiber l'amplification par divers processus. Dans un premier temps, l'inhibition induite par ces substances est partielle, les bandes d'acide nucléique observées suite à la migration par électrophorèse sont plus ténues, moins nettes, en PCR1. Par la suite, l'amplification de l'ADN viral n'est plus détectable en PCR1 (tableau 1). L'augmentation de la quantité d'inhibiteurs rend l'ADN cible inaccessible.

En ce qui concerne le naissain, aucun phénomène d'inhibition n'est observé pour la gamme étudiée. Il semble, au vue des résultats obtenus, que les surnageants des broyats de larves contaminées induisent une plus forte inhibition que ceux des naissains infectés, la concentration en constituants inhibiteurs de l'amplification serait plus élevée dans les larves que dans le naissain.

Cependant, les traitements des deux types d'échantillons sont similaires. Les proportions respectives d'eau distillée et de broyat sont identiques. La quantité d'échantillon introduite dans les tubes de PCR correspond pour les larves, et, pour le naissain à 1 mg de tissus pour 1 µl de surnageant. Les principales différences résident dans la dilacération préalable des naissains et, la présence des coquilles pour les larves. Ce qui laisse envisager une plus grande "concentration" en ADN viral dans les échantillons de naissain en raison de l'absence de dilution par la coquille. Les tissus des naissain sont plus riches en enzymes ou autres pouvant inhiber l'amplification (glande digestive, gonade riche en lipides ou glycogène). Un effet d'inhibition important pourrait être attendu pour les broyats de naissain.

Cependant, les composants de la coquille pourraient également entrer en compétition avec le chlorure de magnésium du milieu réactionnel et, dans ce cas, empêcher l'amplification d'avoir lieu dans de bonnes conditions.

Les résultats de ces deux expérimentations restent toutefois difficiles à interpréter et à analyser, les stades d'infection de chacun des lots étant inconnu. Dans l'état actuel des



connaissances, ils ne sont pas comparables. Afin de définir ces stades plus précisément, il serait intéressant d'utiliser une technique de PCR quantitative.

Cependant, au vu de ces résultats et de ceux acquis précédemment au laboratoire IFREMER de Ronce les Bains, la quantité de surnageant de broyat de larves ou de naissain à incorporer dans les tubes de PCR1 a été fixé à 1µl soit, à l'équivalent de 1 mg de tissus.

La gamme, réalisée avec l'ADN viral extrait de particules purifiées, permet de tester la sensibilité de la technique PCR appliquée à la détection de l'ADN de l'herpèsvirus. Elle permet de définir la quantité minimale d'ADN viral détectable par cette technique en l'absence de substances inhibitrices provenant des larves, du naissain ou du milieu d'élevage. Dans ce cas, la quantité minimale d'ADN viral amplifiable est de 50 génomes par tube de PCR.

Les gammes réalisées avec des tissus de larves et de naissain présumés indemnes permettent d'observer l'effet inhibiteur du aux constituants libérés lors des broyats et du traitement par la chaleur. Cette étude est réalisée pour une "concentration" de 1mg de tissus broyé par µl d'eau distillée ajoutée dans les conditions de PCR retenues.

Pour un nombre de génome par mg de broyat donné, l'effet d'inhibition est différent entre des larves et du naissain présumés indemnes.

C'est ainsi que, en ce qui concerne les larves, des tissus présumés sains ne semblent pas modifier la sensibilité de la méthode. La détection de l'ADN viral, dans certains cas se fait dès 50 génomes par tube (à 25 génomes par mg d'échantillon), tout comme pour la gamme étalon en eau distillée.

Par contre, des broyats issus de naissain semblent inhiber l'amplification de l'ADN viral. Il n'y a pas de détection en deçà de 5 millions de génomes viraux introduits dans les tubes de PCR. Ceci est observé aussi bien à 2,5 millions qu'à 0,8 million de génomes par mg d'échantillon. Dans ce cas, cinq millions de génomes par tube de PCR représentent un minimum à incorporer pour détecter l'herpèsvirus lorsqu'il s'agit de naissain. Il faut donc que l'ADN viral se trouve au moins à cinq millions de génomes par mg de naissain pour être détecté par PCR. Un tel taux est significatif d'une phase active de multiplication de l'herpèsvirus.

En ce qui concerne les larves, la détection peut se faire dès 50 génomes par mg de tissus. Cette grande sensibilité permet d'envisager la détection de porteurs asymptomatiques ou de stades très précoces d'infection.

Pour compléter cette étude et, afin de préciser ces résultats, d'autres expérimentations sont à réaliser. En ce qui concerne le naissain, pour une quantité de génome donnée par tube de PCR il serait intéressant de faire varier les conditions de réalisation du broyat d'une part (broyage, ébullition,...) ou encore, étudier d'autres proportions de mélange tissu/eau distillée. Ceci dans le but d'abaisser le seuil de détection de 5 millions à 50 génomes par lot de naissain analysé (seuil de détection de l'ADN viral dans les conditions de PCR retenues).



L'extraction de l'ADN total des échantillons pourrait constituer un autre type d'approche. Cette technique permettrait d'éliminer certains facteurs inhibiteurs dus notamment aux tissus et au milieu.

En ce qui concerne le naissain, un autre moyen d'éliminer certains facteurs inhibiteurs serait de prélever sur les échantillons certaines catégories de tissus afin de réaliser l'amplification uniquement sur des tissus *a priori* plus riches en particules virales et pauvres en enzymes ou autres inhibiteurs potentiels (manteau, branchies...).

### **3.- UTILISATION DE LA PCR A DES FINS EXPERIMENTALES :**

#### **3.1 Matériels et méthodes:**

##### **3.1.1 Matériel biologique**

###### **3.1.1.1 Infection de larves axéniques**

###### Ponte axénique

Le prélèvement des gamètes est réalisé en conditions stériles et l'élevage larvaire se déroule en milieu stérile.

La surface externe des valves des géniteurs matures provenant des structures de maturation de l'écloserie IFREMER de Ronce les Bains sont brossés grossièrement et désinfectés à l'alcool à 70° afin d'éliminer l'épifaune et flore (micro-organismes, algues). Ils sont ensuite ouverts stérilement avec un scalpel désinfecté à l'alcool et rincés en eau de mer filtrée à 0,22 µm, stérile et additionnée de Tween 80 (Polyoxyéthylène Sorbitan Mono-Oleate ) avant d'être décontaminés par un bain de Bétadine pendant une dizaine de minutes.

Les gamètes sont ensuite prélevées stérilement dans les gonades. La fécondation est réalisée dans de l'eau de mer filtrée à 0,22µm et autoclavée. Une trentaine de minute après la fécondation, les embryons sont répartis dans des enceintes d'élevage (ballons Pyrex, flacons en polyéthylène, bouteilles en verre) à raison de 20 ou 25 larves par ml. L'eau d'élevage identique à celle utilisée pour la fécondation est complétée en antibiotiques (Pénicilline G, Fluméquine ou/et Erythromycine selon les cas). Ceux-ci ne sont pas présents lors de la fécondation de crainte qu'ils inhibent celle-ci. Pendant toute la durée de l'élevage, il n'y a ni bullage, ni apport de phytoplancton. Les larves se développent normalement jusqu'au stade larves D et survivent jusque J7 environ (Le Deuff, com. pers.).

###### Inoculation du virus

L'inoculation du virus est réalisée par l'intermédiaire d'ultrafiltrats de broyat de larves infectées (de l'ordre de 400 mg de larves virosées pour un élevage de 300 000 à 500 000 larves). Les larves infectées utilisées pour cette étude ont été fournies par des éclosiers privées. Elles ont été congelées et sont stockées à -20°C depuis quelques mois. La présence de virus sur ces lots de larves a été vérifiée en microscopie électronique et par PCR.

La suspension virale est obtenue après broyat des larves virosées: le broyat est réalisé dans un Potter avec de l'eau de mer filtrée à 0,22 µm et autoclavée. Après avoir été broyée, la suspension est clarifiée par centrifugation à 2000 tpm pendant 5 mn à 4°C. Le surnageant est ensuite filtré sur une membrane stérile de 0,22 µm ce qui permet d'éliminer tous les agents pathogènes autres que les virus (bactéries, champignons ...). L'ultrafiltrat viral ainsi obtenue est alors répartie entre les différents élevages larvaires.



La virulence des ultrafiltrats provenant des différents lots infectés a été préalablement observée sur des larves axéniques. Tous les lots sont positifs par PCR sauf le lot 95R149

Le lot retenu a été choisi sur la base de l'observation macroscopique des larves infectées : la sédimentation après 48 heures d'élevage et l'aspect du vélum . La confirmation de présence du virus a été obtenue suite à une amplification par PCR (tableau 6). Le lot retenu est le 95-201-2, il induit un taux important de sédimentation des larves et des nécroses marquées du vélum. De plus, pour ce lot, les analyses par PCR montrent un résultat positif dès la PCR1. D'autre part, le laboratoire dispose de quantités importantes d'animaux appartenant à ce lot qui sont conservés congelés à - 20°C.

Tableau 6 : Analyse de différents lots de larves avant leur utilisation pour les expérimentations de transmission de l'herpèsvirus.

N° d'échantillon	Critères de choix					
	Sédim. à 48H00	lésions du vélum	Analyse en PCR : résultats			
			PCR 1		PCR 2	
			dial.	non dial	dial	non dial
95R148	+	+/-	-	-	(+)	+
95R156	+	+/-	-	(+)?	+	+
95R 149	+	+	-	-	+	-
95R201-2	+	+	(+)	-	+	+
95R201-1	+	+/-	-	-	-	+
95R157	?	+	+	+	+	+
95R158	?	+	+	-	+	+
95R159	?	+	-	-	+	+
95R150	?	-	-	-	+	+
95R151	?	+/-	-	-	+	+
95R142	+	+	-	-	+	+

dial : échantillon dialysé

non dial. : échantillon non dialysé.

### 3.1.1.2 In fection de larves conventionnelles virosées

La transmission de l'herpèsvirus, par l'ultrafiltrat d'un broyat de larves virosées n'ayant pu être obtenue dans le cadre d'un élevage conventionnel (Le Deuff, 1995), il est nécessaire, dans ce cas, d'utiliser un intermédiaire constitué par des larves axéniques infectées. Celles-ci transmettront l'herpèsvirus aux larves conventionnelles. L'utilisation de larves conventionnelles permet d'avoir une grande quantité de matériel disponible.

#### Larves conventionnelles

La ponte est réalisée de manière conventionnelle par scarification, récupération des gamètes et fécondation en respectant un taux maximum de cent spermatozoïdes par ovocyte. Après une trentaine de minutes, les oeufs sont transférés dans les bacs d'élevage à une densité de 20 à 25 par ml. L'élevage se fait en eau de mer filtrée à 10µm, chauffée à 25-26°C. avec un bullage léger et sans apport de nourriture.

#### Inoculation des larves conventionnelles :

Quand les larves conventionnelles sont âgées de 24 heures, des larves axéniques expérimentalement infectées sont ajoutées dans l'élevage, à raison de 150 000 larves pour 2,4 millions de larves conventionnelles ; soit 6% de la population larvaire environ.

### 3.1.2 Suivi en élevage de la cinétique de développement du virus

L'objectif, dans cette étude est de se rapprocher le plus possible des conditions rencontrées en écloséries de production afin de déterminer à partir de quel moment le virus est décelable dans un élevage.

Dans ce but, la progression de l'infection virale est suivie au sein d'un élevage larvaire conventionnel, âgé de quatre jours. Celui-ci est infecté par des larves axéniques infectées âgées de quatre jours et infectées depuis 24 heures.

La progression de l'infection virale est suivie au sein de trois élevages larvaires conventionnels : deux réplicats (A et B) inoculés avec un même lot de larves axéniques virosées et un lot témoin non infecté. Chaque élevage est mené dans des bacs cylindroconiques de cent vingt litres utile..

Plusieurs types de prélèvements sont effectués au cours des six jours suivant le début de l'infection.

Les larves atteintes par l'herpèsvirus ont tendance à diminuer leur activité de nage du fait de la nécrose du vélum. Elles sédimentent dans le fond des bacs d'élevage. Aussi, pour



chaque bac, un échantillonnage est réalisé en surface et un autre à la vidange. Chaque prélèvement est divisé en deux afin d'être analysé selon deux techniques différentes. Une partie fixée en glutaraldéhyde permettra une observation en microscopie électronique, la congélation de l'autre partie du prélèvement permettra une analyse ultérieure par PCR.

Pour chaque prélèvement, un litre et demi d'eau d'élevage est filtré sur un tamis de 20µm. Le refus de tamis contenant les larves est recueilli pour être analysé. Après une centrifugation à 8000 tpm pour l'échantillon destiné à l'analyse PCR et à 4000 tpm pour celui destiné à la microscopie électronique à transmission, le surnageant, constitué de l'eau résiduelle, est éliminé. La centrifugation de l'échantillon destiné à la microscopie électronique est moins rapide afin de ne pas léser les tissus. Le culot destiné à la PCR est congelé à -20°C, celui pour la microscopie électronique à transmission est fixé avec 50µl glutaraldéhyde (annexe 2).

Le premier prélèvement est réalisé immédiatement après l'inoculation, les suivants deux heures et dix neuf heures plus tard puis un toutes les heures. jusque 48 heures après l'infection.

Quelques prélèvements sont effectués entre 4 heures et six jours après l'inoculation.

### **3.1.3 Transmission du virus par l'eau d'élevage**

Des larves issues d'une ponte axénique sont réparties dans 12 ballons d'une contenance de 2 litres remplis chacun avec 1,5 litres d'eau de mer stérile supplémentée en Pénicilline G et de la Fluméquine (annexe n°3 ). La densité larvaire est de 20 larves/ml. Les élevages sont maintenus à une température de 26°C +/- 1°C au bain-marie .

A J1, cinq élevages (1-2-3-4-5) sont inoculés avec un ultrafiltrat de virus.

A J2, ces cinq élevages sont stoppés, les larves sont filtrées et congelées pour analyse. L'eau d'élevage est aussi échantillonnée (1,5 ml) et récupérée stérilement. Les larves des élevages 6 à 10 sont mises en élevage dans cette eau ayant contenu des larves axéniques expérimentalement infectées.

A J3, les élevages virosés, 7 et 8 ainsi que le témoin correspondant 11 sont stoppés, les larves ainsi que des échantillons d'eau sont prélevés.

A J4, les élevages virosés, 9 et 10 ainsi que le témoin correspondant 12 sont stoppés.

Les larves et des échantillons d'eau sont prélevés (schéma n°2).

Schéma 2 : Transmission du virus par l'eau d'élevage.

J1

Inoculation de l'élevage larvaire avec un ultrafiltrat de larves virosées

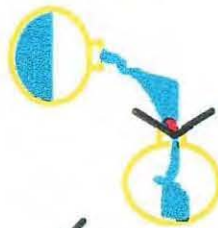
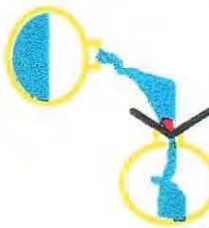
Elevage larvaire sain



J2

Elevage larvaire virosé

Elevage larvaire sain



eau

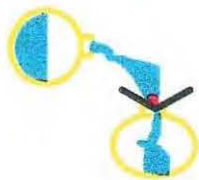
larves



Echantillonnage de l'eau et des larves

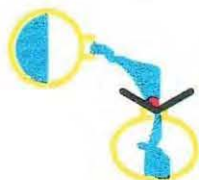
Les larves saines sont mises en élevage dans les eaux virosées

J3



Echantillonnage de l'eau et des larves

J4



Echantillonnage de l'eau et des larves



### **3.1.4 Conservation du pouvoir pathogène du virus dans l'eau d'élevage.**

Les flacons, A et B sont remplis d'eau de mer filtrée à 0,22 µm, stérile et supplémentée en antibiotiques, les flacons C et D avec de l'eau de mer non stérile, filtrée sur 1µm. Ils sont ensuite inoculés avec un ultrafiltrat de broyat de larves virosées.

Plusieurs prélèvements sont réalisés afin de détecter la présence de l'ADN viral dans l'eau d'élevage. Le premier réalisé immédiatement après inoculation, puis une heure trente après, 18 heures et 48 heures plus tard.

Quarante-huit heures après inoculation, des élevages de larves axéniques de *C. gigas* sont menés dans ces deux eaux de qualité différentes. Ceci permet d'observer s'il y a maintien ou non du pouvoir pathogène du virus après que celui-ci a subi un séjour prolongé dans le milieu d'élevage en l'absence de support vivant. Les prélèvements des larves et de l'eau d'élevage sont réalisés 48 heures après introduction des larves dans les récipients ayant reçu l'ultrafiltrat.

Un autre essai portant sur une plus longue période (treize jours) a été également réalisé mais uniquement sur eau stérile et sans élevage larvaire consécutif.

La virulence d'un ultrafiltrat initial, après conservation à 26-27°C pendant 48 heures, a également été étudié. Au bout de cette période, il a été inoculé à un élevage larvaire axénique, 48 heures plus tard, les larves et l'eau d'élevage sont prélevées pour vérifier l'infection des larves. Les larves avant analyse par PCR subissent un traitement intermédiaire. Après avoir été filtrées, elles subissent quatre "rinçages" successifs. Chaque rinçage consiste en une remise en suspension des larves dans environ 40 ml d'eau de mer stérile et filtrée à 0,22 µm. A chaque lavage, les larves en suspension sont centrifugées à 3000 tpm pendant 12 minutes à 4°C, l'eau de mer du surnageant est renouvelée.

### **3.1.5 Action de la température sur le pouvoir infectieux du virus**

Deux expérimentations sont réalisées. Les protocoles d'élevage et d'échantillonnage sont similaires, seul le traitement des larves après prélèvement est différent entre les deux expérimentations. Celles de la seconde expérimentation subissent des "rinçages" tels que décrits précédemment.

Des élevages axéniques de 4 jours sont infectés avec un broyat de larves virosées.

Les élevages sont réalisés dans une eau de mer stérile, en flacon polyéthylène sans bullage ni nourriture pendant toute la durée de l'expérimentation. La densité larvaire est de 25 larves/ml. La température est maintenue à 26°C par un bain marie. La concentration du broyat est de 4 mg de larves virosées congelées par ml d'eau de mer filtrée stérile.

Dans la première expérience, le pouvoir infectieux du virus est testé à six températures : 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C et 45°C, en réplicat pour chacune d'elle. Des tubes contenant chacun 10 ml de suspension virale sont placés dans différents bains marie maintenus aux températures souhaitées pendant 20 mn.

En ce qui concerne la seconde expérience, cinq températures sont testées : 10, 20, 30, 40 et 50°C, sans réplicat. Dans ce cas, les tubes de 5 ml de suspension virale sont placés dans les différents bain-marie pendant 30 minutes.

Ensuite, pour les deux expérimentations, les élevages sont inoculés chacun avec 5 ml de la suspension virale puis placés dans un bain marie à 26°C pendant 48 heures avant l'arrêt des élevages pour analyse.

## 3.2 Résultats

### 3.2.1 Cinétique de développement du virus

Les larves axéniques virosées servant à l'inoculation des élevages conventionnels ne semblent pas atteintes par l'herpèsvirus 30 minutes après leur infection. En effet, les résultats de la PCR montrent que l'ADN viral, s'il est présent n'est pas amplifié suffisamment pour être détecté. Cet échantillon, n'est composé que de très peu de larves, les analyses n'ont pu être dupliquées du fait du manque de matériel larvaire. Toutefois, ces mêmes larves juste avant transfert dans les bacs contenant larves conventionnelles, sont positives par PCR.

Au début de l'expérimentation, les prélèvements du bac témoin sont négatifs, les larves conventionnelles utilisées peuvent donc être considérées comme indemnes, d'autant plus que les prélèvements du lot témoins restent négatifs tout au long de l'expérience.

Trente minutes après transfert l'herpèsvirus est détecté dans les élevages ayant reçu les larves virosées et ce jusque 71 heures après transfert pour les deux réplicats et six jours pour le bac.

Parfois l'ADN viral n'est détecté que pour des échantillons de surface : 20 heures, bac A et 21 heures, bac B par exemple. D'autrefois, il ne sera détecté qu'au fond des bacs : 21 heures, bac A.

A 24 heures après inoculation, l'ADN viral est détecté pour le bac A au fond avec 1, 2 ou 4 µl l'échantillon introduit dans les tubes d'analyse. Pour le bac B au fond, il n'est détecté que pour 2 µl d'échantillon introduit alors que des essais ont aussi été réalisés avec 1, 4, 5 ou 10 µl.



Tableau 7 : Résultats PCR de l'expérimentation portant sur la cinétique de développement de l'herpèsvirus.

		Quantité d'échantillon testé en PCR1														
		Echantillon non dialysé										Echantillon dialysé				
		1 µl		2 µl		4 µl		5 µl		10 µl		2 µl		4 µl		
N° de PCR	1		2		1		2		1		2		1		2	
		l. axen. av. inoc	-	-					-	-	-	-				
	l. axen. 30mn ap.inoc.	-	-					-	-	-	-					
	l.ax.vir.av. transfert	-	+					-	-	-	-					
Avant transfert	Témoin	-	-					-	-	-	-					
	Bac A	-	-					-	-	-	-					
	Bac B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
30 minutes ap transfert	Bac A	-	+					-	+	-	-					
	Bac B	-	-					-	+	-	-					
2H00 après transfert	Témoin surface			-	-	-	-									
	Témoin fond			-	-	-	-									
	A surface			-	+	-	-									
	A fond			-	+	-	-									
	B surface			-	+	-	+									
	B fond			-	-	-	-									
19H00 après transfert	Témoin surface			-	-	-	-									
	Témoin fond			-	-	-	-									
	A surface			-	+	-	+									
	A fond			-	+	-	+									
	B surface			-	+	-	+									
	B fond			-	-	-	-									



Tableau 7 suite

		Quantité d'échantillon testé en PCR1													
		Echantillon non dialysé						Echantillon dialysé							
		1 $\mu$ l		2 $\mu$ l		4 $\mu$ l		5 $\mu$ l		10 $\mu$ l		2 $\mu$ l		4 $\mu$ l	
	N° de PCR	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
20H00 après transfert	Témoin surface			-	-	-	-								
	Témoin fond			-	-	-	-								
	A surface			-	+	-	-								
	A fond			-	-	-	-								
	B surface			-	+	-	-								
	B fond			-	+	-	-								
21H00 après transfert	Témoin surface			-	-	-	-								
	Témoin fond			-	-	-	-								
	A surface			-	-	-	-								
	A fond			-	+	-	-								
	B surface			-	+	-	-								
	B fond			-	-	-	-								
22H00 après transfert	Témoin surface			-	-	-	-								
	Témoin fond			-	-	-	-								
	A surface			-	+	-	+								
	A fond			-	+	-	+								
	B surface			-	+	-	+								
	B fond			-	+	-	+								
24H00 après transfert	Témoin surface	-	-	-	-			-	-	-	-				
	Témoin fond	-	-					-	-	-	-				
	A surface	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-				
	A fond	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-				
	B surface	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-				
	B fond	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-				



Tableau 7 suite

		Quantité d'échantillon testé en PCR1									
		Echantillon non dialysé						Echantillon dialysé			
		1 µl		2 µl		4 µl		5 µl	10 µl	2 µl	4 µl
<b>48H00</b> après transfert	Témoin surface	-	-	-	-	-	-				
	Témoin fond	-	-	-	-	-	-				
	A surface	-	-	-	-	-	+				
	A fond	-	-	-	+	-	+				
	B surface	-	-	-	-	-	+				
	B fond	-	-	-	+	-	+				
<b>71H00</b> après transfert	Témoin surface			-	-	-	-				
	Témoin fond			-	-	-	-				
	A surface			-	+	-	+				
	A fond			-	+	-	+				
	B surface			-	-	-	+				
	B fond			-	-	-	+				

### 3.2.2 Transmission de l'herpèsvirus par l'eau d'élevage

Les témoins non inoculés (ballon 11 et 12) sont négatifs en seconde PCR, les larves axéniques avant inoculation peuvent être considérées comme indemnes.

Les larves des ballons 1 à 5 ont été contaminées par le broyat. Les eaux des élevages 1 à 5 sont positives, l'ADN viral est présent dans l'eau avant apport des larves axéniques.

Après transfert, à 24H00 ou 48H00, les eaux d'élevages sont toujours positives. Les larves des ballons 7 à 10 sont positives.

**Tableau 8a:** Résultats PCR de l'expérimentation de transfert de l'herpèsvirus par l'eau d'élevage. (eau et larves inoculées avec le broyat virosé avant transfert)

	N° Ballon	Vol.éch. N°PCR	EAU D'ELEVAGE AVANTT RANSFERT						LARVES
			Volume introduit en PCR1						
			1 µl	2 µl	4 µl	6 µl	8 µl	10µl	1 µl
Inoculés  avec un broyat viral	1	1	+	+	+	-	-	-	-
		2	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+
	2	1	(+)		-				-
		2	+		+				-
	3	1	+		-				-
		2	+		+				+
	4	1	(+)		-				-
		2	+		?				+
	5	1	+		(+)				(+)
		2	?		?				+



**Tableau 8b** : Résultats d'analyse par PCR de la transmission par l'eau d'élevage de l'herpèsvirus (après transfert).

	N° Ballon	Origine de l'eau	Durée de contact	N° PCR	Volume d'eau en PCR1		Larves  1 µL
					1 µl	4 µl	
Non inoculés mais élevage dans eau contaminée	6	E 5	1H00	1			-
				2			+
	7	E 1	24H00	1	-		-
				2	+		+
	8	E.2	24H00	1	-		-
				2	-		+
	9	E 3	48H00	1	-		(+)
				2	+		+
	10	E 4	48H00	1	-		-
				2	+		+
Témoin	11		24H00	1	-	-	-
				2	-	-	-
Témoin	12		48H00	1	-	-	-
				2	-	-	-

### 3.2.3 Conservation du pouvoir pathogène de l'herpèsvirus dans l'eau d'élevage

Dans une eau non stérile, l'ADN viral est détecté pendant 18H00 et n'est plus détectable de 48H00 après inoculation, avec 1 µl d'échantillon en PCR1.

En eau stérile, l'ADN viral est décelable 13 jours après l'inoculation.

En eau stérile, la présence d'ADN viral est particulièrement nette à 48H00, en PCR1 et PCR2, avec 1 ou 4 µl d'échantillon introduit dans les tubes de PCR (tableau 9). Dans l'eau non stérile, cet ADN viral n'est pas détecté, en dosant 1 µl d'eau de mer. Les surnageants des broyats des larves mises en élevage dans ces différents types d'eau de mer ne présentent pas, 48 heures après, de réaction positive lors de la PCR. L'ADN viral est détecté dans l'eau de mer stérile mais pas dans l'eau d'écloserie.

Le passage à l'autoclave rendrait impossible la détection de l'ADN viral inoculé (tableau 9).

Tableau 9: survie de l'ADN viral dans l'eau de mer stérile ou non stérile.

	Sans élevage consécutif								Avec élevage ultérieur							
	Eau de mer stérile Réplicat 1				Eau de mer stérile Réplicat 2				E M S. R 1		E M S. R 2		E M écloserie R1		E d M écloserie R2	
	1 µl		4 µl		1 µl		4 µl		1 µl		1 µl		1 µl		1 µl	
Quant. d'éch.en PCR1																
N° PCR	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
20 mn	+	+	-	+					(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+
1H30	+	+	(+)	+					(+)	+	?	+	(+)	+	(+)	+
18H00									-	+	-	+	-	+	-	+
48H00	(+)	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)	+	-	-	-	-
8 jours	-	+			-	+										
13 jours*	-	-	-	-	-	+	-	-								

\* après passage à l'autoclave pour le flacon n° 1



**Tableau 10** : Conservation du pouvoir pathogène du virus dans l'eau d'élevage.  
pour 1 µl d'échantillon en PCR1.

N° PCR		Eau de mer stérile								Eau de mer d'écloserie					
		A		Témoin		B		C		témoin		D		E	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Avant mise en élevage des larves	Eau					(+)	+	(+)	+			-	-	-	-
	Larves	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48H00 après le début de l'élevage	Eau	-	+	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-	-
	Larves	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A : Eau de mer avec élevage larvaire . L'inoculum viral a été conservé pendant 48H00 à 26°C avant d'être introduit dans l'élevage.

B et C : Eau de mer stérile avec broyat viral maintenu à 26°C avant introduction des larves.

D et E : Eau de mer d'écloserie avec broyat viral maintenu à 26°C avant introduction des larves.

### 3.2.4 Sensibilité de l'herpèsvirus au facteur température

En ce qui concerne la première expérience, toutes les eaux d'élevages inoculées, quelle que soit la température subie par le broyat, réagissent positivement en PCR2, avec 1µl d'échantillon introduit en PCR1 (tableau 11). Les analyses des larves donnent un résultat positif à toutes les températures étudiées.

Dans la seconde expérience, suite à un passage à 10°C pendant 30mn, les larves analysées en PCR ne permettent pas de détecter de l'ADN viral. De 20°C à 50°C, l'analyse des larves donne un résultat positif (tableau 12). L'analyse des eaux d'élevage et de lavage est négative quelle que soit la température de traitement de l'ultrafiltrat.

Tableau 11 : Résultats de PCR en fonction de différentes températures appliquées aux broyats.

Température			Témoin		15°C		20°C		25°C		30°C		35°C		45°C	
Echan- tillon	N° PCR		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	Vol PCR1	Essais N°														
L A R V E S	1µl	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		A'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	2µl	A	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	(+)
		A'	-	-	-	+	-	-	-	-	(+)	+	-	(+)	-	-
	4µl	A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	(+)	-	-
		A'	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	+	-	-	-	-
EDM	1µl	A	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
		A'	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+



Tableau 12 : Résultats de PCR en fonction de différentes températures appliquées aux broyats.

Température			10°C		20°C		30°C		40°C		50°C		Témoïn	
N° PCR			1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Echan- tillon	Dilution	Vol. éch.												
Eau élevage.		1 µl et 2 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lavage 1	1/39	1 µl et 2 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lavage 2	1/8	1 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lavage 3	1/8	1 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lavage 4	1/8	1 µl et 2 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Larves		1 µl	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-

### 3.3 Discussion

Les essais menés sur la stabilité de l'ultrafiltrat dans l'eau d'élevage mettent en évidence la grande sensibilité de la PCR. En effet, l'ADN viral présent dans l'eau sous forme de particules virales ou d'ADN libre est détectée à de faibles doses (de l'ordre de 15 mg de larves infectées sous forme d'un ultrafiltrat pour un volume d'eau final de 400 ml) pendant une durée assez longue (tableau 6). Cependant, des différences sont observables en fonction de la nature de l'eau utilisée. En effet, en l'absence de larves, l'ultrafiltrat est détecté au moins jusqu'à 18 heures après l'inoculation en eau non stérile, et plus de 13 jours après l'inoculation en eau stérile (pour 1 µl d'eau échantillonné). Il est possible de supposer que les bactéries présentes dans l'eau de mer non stérile produisent des enzymes qui dégradent l'ADN viral. Dans ce cas, au cours de la réaction de PCR, les amorces ne trouvent plus la matrice nécessaire à la réaction.

Cependant, quelle que soit la nature de l'eau utilisée, la détection de l'ADN viral devient plus difficile au cours du temps. Il est possible d'envisager la dégradation de cet ADN

dans l'eau, sa détection par PCR devenant impossible. Ainsi, à partir de huit jours en eau stérile, l'ADN viral n'est plus détecté qu'en seconde PCR (tableau 6).

De plus, l'ADN viral en solution semble perdre son intégrité après avoir été autoclavé. L'action conjointe de la pression et de la température dénaturerait l'ADN viral dans le cas bien précis d'une eau de mer.

La stabilité de l'ADN viral détecté par PCR dans l'eau d'élevage en l'absence de larves met en exergue la difficulté d'analyser les résultats obtenus pour les expériences de cinétique de développement de l'infection sur animaux en conditions expérimentales. En effet, une demi-heure après l'inoculation des élevages, la PCR sur les larves conventionnelles est positive. Il peut difficilement s'agir d'une multiplication de l'ADN viral, le délai entre l'inoculation et la possibilité de détecter de l'ADN chez les animaux paraît trop court. Ceci est confirmé par les analyses réalisées en microscopie électronique à transmission. En effet, les premières anomalies nucléaires ne sont visibles que 24 heures après inoculation sans détection de particules virales. Ce résultat positif obtenu pour les larves en PCR serait à imputer à la détection de l'inoculum lui-même plutôt qu'à celle d'une contamination des larves conventionnelles.

L'activité des constituants de l'eau de mer et la présence d'inhibiteurs en quantité et qualité variable dans l'eau peuvent par ailleurs expliquer la variabilité des résultats observés, notamment lors de l'étude concernant la cinétique de détection de l'infection virale.

En ce qui concerne la transmission du virus par l'eau d'élevage, le même type de problème se pose. Les eaux d'élevage en absence de larves sont toutes positives en PCR. Cependant, elles semblent conserver intègre le pouvoir pathogène du virus. En effet, toutes les larves réagissent positivement en PCR2 après 48 heures d'élevage et seulement 50% des élevages après 24 heures. Ainsi, cette étude semble montrer que le virus conserve son pouvoir pathogène dans l'eau, les larves élevées en eau provenant d'un élevage infecté montrant une détection possible de l'ADN viral. Cependant, l'hypothèse d'une détection de l'inoculum initial reste également possible.

La première expérience sur la sensibilité du virus au facteur température reste difficile d'interprétation. En effet, les larves ont eu un développement anormal pendant les cinq jours qu'a duré l'élevage. Elles sont soit restées au stade trochophore ou bien, elles ont légèrement dépassé ce stade, mais en ne développant qu'une seule valve. Des toxines présentes dans l'eau d'élevage pourraient être responsables de ces malformations (C. Ledu, com. pers.). Elles sont restées de petite taille. Le matériel vivant pour l'analyse en PCR était donc en faible quantité. Le broyat a été réalisé dans seulement 20 µl d'eau distillée. Au vue des résultats obtenus, il semble néanmoins que toutes les larves aient été infectées. Cependant, l'hypothèse d'une détection de l'inoculum initial reste également possible.



Pour la seconde expérimentation portant sur la thermosensibilité, un traitement intermédiaire (lavages) a été effectué sur les larves. Toutes les eaux d'élevage en absence de larves et de lavages sont négatives en PCR. Les larves en fin d'expérience sont, quant à elles, toutes positives en PCR, excepté pour l'échantillon ayant reçu l'ultrafiltrat traité à 10°C. Pour cette expérience, il semble que l'ADN viral détecté par PCR sur les larves, après 48 heures élevage, correspond bien à une infection des animaux et non pas à la détection de l'inoculum initial. De plus, il semble qu'un traitement de l'ultrafiltrat à une température de 10°C puisse agir sur le pouvoir infectieux du virus en le réduisant.

#### 4.- CONCLUSION GENERALE

La PCR est une technique très sensible qui peut permettre de détecter de façon précoce une infection à herpèsvirus chez les larves de *C. gigas*. L'extraction de l'ADN total des échantillons, le choix de certains tissus pour l'analyse ou encore la modification du traitement des échantillons permettrait d'améliorer la sensibilité de la méthode en ce qui concerne le naissain. En l'absence de lignées cellulaires homologues disponibles, la PCR pouvait être considérée comme un outil utilisable dans le domaine de la recherche expérimentale. Cependant la détection de l'ADN viral dans l'eau d'élevage nécessiterait des rinçages des larves au moment des prélèvements et avant analyse afin de supprimer les traces d'ADN viraux provenant de l'inoculum viral.

La difficulté à adapter la technique PCR aux exigences de l'expérimentation minimise l'intérêt de cette méthode dans un cadre expérimental.

C'est pourquoi, il est important de développer d'autres techniques, telles que les cultures cellulaires, afin d'améliorer les connaissances sur l'herpèsvirus (thermosensibilité, résistance au chlore, au formol etc....), et de pouvoir envisager la mise en oeuvre de moyens de lutte efficace contre cet agent pathogène.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Comps, M. et Cochenec, N., 1993. A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L. J. Inv. Pathol, 62.
- Hine P.M., Wesley B. et Hay B.E., 1992. Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Org. 12(2) : 135-142.
- Le Deuff R.M., 1995. Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux *Iridoviridae* et aux *Herpesviridae*. Thèse N°389, Université de Bordeaux II, 234 p.
- Le Deuff R.M., Nicolas J.L., Renault T. et Cochenec N., 1994. Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Fish Pathol., 142(2) : 69-71.
- Le Deuff R.M., Renault T. et Gérard A., 1996. " Thermal effects on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval oyster, *Crassostrea gigas* ". Dis. aquat. Org., 24 : 149-157.
- Renault T., Cochenec N., Le Deuff R.-M. et Chollet B., 1994b. Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 14(2) : 64-66.
- Nicolas J.L., Comps M. et Cochenec N. 1992. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12(1) : 11-13.
- Renault T., Le Deuff R.M., Cochenec N. et Maffart P., 1994a. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France - Comparative study. Revue Méd. Vét., 145(10) : 735-742.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. et Arnheim N., 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230 : 1350-1354.
- Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol. 1, 2 et 3.

## **ANNEXE 1 : Composition de la solution de nucléotides triphosphates**

Les nucléotides triphosphates utilisés pour la réaction de PCR sont commercialisés (Eurogentech) en solution aqueuse à la concentration de 20mM, dont 5mM de chaque nucléotide (dATP, dCTP, dGTP et dTTP). Cette solution est stockée à -20°C, sous forme de fractions aliquotes (0,1ml).

Lors de son utilisation pour la PCR, cette solution stock est diluée par addition d'eau distillée à la concentration de 2mM, puis divisée en fractions aliquotes (300 $\mu$ l) qui peuvent être recongelées à -20°C.



## ANNEXE 2 : Méthodes de microscopie électronique

La préparation des échantillons pour la microscopie électronique comporte plusieurs étapes :

- Fixation des tissus
- Décalcification éventuelle des échantillons
- Déshydratation, imprégnation et inclusion des échantillons
- Confection et contraste des coupes

### 1 - Préparation des solutions

Afin de mieux préserver les ultrastructures, les pièces sont traitées par des solutions d'osmolarité proche de celle des tissus. Ainsi, les tissus d'huîtres sont traités par des solutions d'osmolarité environ 1000 mOsm. L'osmolarité de ces solutions est ajustée par addition de NaCl.

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

Chlorure de sodium 10% en eau distillée

Tampon cacodylate pH 7,4 :

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

Glutaraldéhyde 3% :

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

Acide osmique 1% :

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

EDTA 5%

EDTA disodique	5 g
Tampon cacodylate	100 ml
Dissoudre par addition de quelques pastilles de soude. L'EDTA se dissout en effet lorsque le pH est supérieur à 8. Lorsque la solution est limpide, ajuster à nouveau le pH à 7,4 par addition d'HCl concentré.	

Mélange Epon

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

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

## 2 - Fixation des tissus

Il est très important de fixer convenablement les tissus devant être observés en microscopie électronique, afin de préserver l'ultrastructures aussi bien que possible.

Les pièces sont découpées de façon à ne pas excéder 3 à 4 mm de côté. Cette petite taille permet ainsi aux différentes solutions de pénétrer rapidement dans l'échantillon.

Si les échantillons ont été préalablement fixés et conservés en Carson, il est nécessaire de rincer par trois ou quatre bains de 24 heures en tampon cacodylate à froid (4°C) avant de fixer à nouveau en glutaraldéhyde 3%. Si les échantillons sont frais, la fixation est réalisée directement en glutaraldéhyde 3% (30 min à température ambiante ou 2 heures et plus à 4°C).

Les échantillons sont rincés en tampon cacodylate (trois fois 10 min), post-fixés par l'acide osmique 1% (1 heure à 4°C) et rincés à nouveau en tampon cacodylate (deux fois 10 min).

## 3 - Décalcification des échantillons

Les échantillons de larves et de naissains ayant été fixés avec leur coquille, doivent être décalcifiés par l'EDTA, afin de faciliter la préparation ultérieure des coupes.

Les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol (éthanol 70°, une fois 10 min ; éthanol 95°, deux fois 15 min ; éthanol absolu, trois fois 20 min), puis réhydratés partiellement par un bain de 10 min en tampon cacodylate. Cette déshydratation et réhydratation partielle des échantillons facilite en effet la décalcification ultérieure par l'EDTA.

Les échantillons sont décalcifiés par un bain d'EDTA 5%, pendant 15 à 20 heures, l'EDTA est alors éliminé par deux bains de 10 min en tampon cacodylate.

## 4 - Déshydratation, imprégnation et inclusion des échantillons

Les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol : éthanol 70°, une fois 10 min ; éthanol 95°, deux fois 15 min ; éthanol absolu, trois fois 20 min.

La déshydratation est achevée par deux bains de 15 min en oxyde de propylène. Ce solvant prépare également l'imprégnation ultérieure en résine Epon.

Les pièces sont imprégnées progressivement. Un premier bain d'une heure est réalisé dans un mélange d'oxyde de propylène-Epon (50-50). Un deuxième bain en Epon seul est alors réalisé. Ce dernier peut avoir une durée variable de une à 20 heures, un bain de longue durée permettant d'obtenir une meilleure imprégnation des tissus.

L'inclusion est réalisée en plaçant les échantillons dans des moules remplis de résine Epon. Ces moules peuvent être en forme de cercueils si les pièces sont de grande taille (2 à 3 mm). Si les échantillons sont de petite taille (des larves d'huître par exemple), des microtubes de type Eppendorf sont utilisés pour mouler les blocs. Dans ce dernier cas, les échantillons peuvent être concentrés au fond des tubes soit par sédimentation, soit par centrifugation.

Une étiquette, identifiant l'échantillon, est incluse dans chaque bloc. Puis ceux ci sont placés 48 heures à 60°C, température à laquelle la résine Epon polymérise.



## 5 - Confection des coupes et contraste

Les blocs sont taillés aux dimensions adéquates à l'aide de lames de rasoir, puis des coupes sont réalisés avec un couteau de diamant, à l'aide d'un ultramicrotome LKB. Des coupes semi-fines de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées et déposées sur lames de verre. Celles-ci permettront de contrôler la qualité des échantillons en microscopie photonique, et de localiser les zones intéressantes au niveau de la coupe. Les coupes ultrafines de 80 à 100 nm d'épaisseur sont elles, déposées sur des grilles de cuivre pour l'observation au microscope électronique à transmission.

Les coupes semi-fines sont colorées à chaud (90-100°C) par une solution de bleu de toluidine 1% dans une solution de borate de sodium ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  1%, pH environ 11), l'excès de colorant est éliminé par rinçage à l'eau distillée. Après séchage, les lames sont montées sous lamelle, avec une goutte de résine Eukitt, et observé au microscope photonique.

Les coupes ultrafines sont contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb comme suit.

### Préparation des réactifs

Acétate d'uranyle :

Solution stock à 5% en eau distillée

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

Citrate de plomb :

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

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

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

### Contraste

Les solutions d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb sont centrifugées deux fois 15 min à 12 000 g, afin d'éliminer les éventuels précipités contenus dans ces réactifs avant utilisation.

Acétate d'uranyle	10 min, à l'obscurité
Rinçages	10 passages de la grille dans une goutte d'alcool 25% 10 passages de la grille dans trois gouttes d'eau distillée
Séchage	20 min minimum à 37°C
Citrate de plomb	3 min, dans une boîte de Pétri contenant des pastilles de KOH, afin d'assécher l'atmosphère et ainsi limiter la précipitation du citrate de plomb pendant le contraste
Rinçages	10 passages dans une goutte de NaOH 0,1N 10 passages dans trois gouttes d'eau distillée
Séchage	20 min à 37°C

## **ANNEXE 3 : Préparation des solutions d'antibiotiques**

### **1 - Pénicilline**

La solution de pénicilline G est préparée par dissolution de l'antibiotique à la concentration de  $10^5$ U/ml dans de l'eau distillée. Cette solution est conservée à  $-20^\circ\text{C}$ . Dans les milieux d'élevage larvaire, elle est utilisée à la dilution 1/1000.

### **2 - Fluméquine**

La solution de fluméquine est préparée par dissolution de l'antibiotique à la concentration de 30mg/ml dans de l'eau distillée. Il est nécessaire d'ajouter quelques gouttes de NaOH 5N pour obtenir une solution limpide. Cette solution est conservée à  $-20^\circ\text{C}$ . Dans les milieux d'élevage larvaire, elle est utilisée à la dilution 1/1000.