

Infection à virus de type herpès chez les larves de coquilles Saint-Jacques

⁴I. Arzul, ²J. L. Nicolas et ⁴T. Renault

⁴Laboratoire de Génétique et Pathologie, La Tremblade –
²Laboratoire de Physiologie des Invertébrés, Plouzané, Brest

Des mortalités massives de larves de coquilles Saint Jacques (*Pecten maximus*) ont été observées au cours de l'été 2000 au sein d'une éclosérie en Bretagne. Des échantillons ont été prélevés et ont fait l'objet de différents types d'analyses.

Dans un premier temps, des essais de reproduction de mortalités ont permis de démontrer l'implication d'un agent ultra-filtrable dans le phénomène, ainsi que l'absence de sensibilité de cet agent aux traitements antibiotiques.

Des analyses en microscopie électronique à transmission ont ensuite permis de mettre en évidence, chez les larves ayant présenté des mortalités, un virus aux caractéristiques ultra-structurales se rapprochant de celles des herpès-virus. En effet, ce virus présente une capsidie à symétrie icosaédrique d'environ 70 nm de diamètre et une enveloppe pour les particules extracellulaires.

Enfin, des outils moléculaires ont été utilisés afin de préciser la nature de ce virus. Ainsi, trois couples d'amorces de PCR, spécifiques de trois zones distinctes du génome d'un virus de type herpès infectant les larves d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, ont été testés sur des broyats de larves de coquilles Saint Jacques infectées. Deux de ces couples ont permis d'obtenir un produit d'amplification de taille attendue, tandis que le troisième donnait un produit de PCR plus petit que celui escompté. Ces résultats ont permis de suspecter la présence chez les larves de coquille Saint Jacques d'un variant viral détecté au préalable chez des larves d'huître creuse et de palourde. Cette hypothèse a été confirmée par un travail de séquençage.

Les outils de diagnostic des infections à virus de type herpès développés ces dernières années ont ainsi permis de démontrer l'implication d'un virus de type herpès dans des mortalités massives de larves de coquille Saint Jacques. En moins d'un mois, il a ainsi été possible de visualiser le virus en microscopie électronique, de démontrer son pouvoir infectieux et d'analyser son génome. Ces résultats montrent également que cinq espèces différentes de bivalves (*Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Ruditapes philippinarum*, *Ruditapes decussatus* et *Pecten maximus*) peuvent être infectées en France par des virus de type herpès et qu'un même virus peut être retrouvé chez plusieurs coquillages différents.

Infection à virus de type herpès chez des larves de coquille Saint Jacques, *Pecten maximus*

I. Arzul, J. L. Nicolas et T. Renault

Infection à virus de type herpès chez des larves de coquille Saint Jacques, *Pecten maximus*

- ❖ Essais d'infection expérimentale
- ❖ Analyses en microscopie électronique à transmission (MET)
- ❖ Analyses en PCR
- ❖ Séquençage de produits de PCR
- ❖ Recherche d'ADN viral par hybridation *in situ* chez des géniteurs

Essais d'infection expérimentale

Objectif :

suspicion d'une étiologie virale



Reproduction des mortalités sur larves saines à partir
de matériel infecté ultrafiltré

Essais d'infection expérimentale

Broyat de larves
moribondes
ultrafiltré



Larves
saines

Incrimination d'un
agent ultrafiltrable



Mortalité des
larves saines

Analyse en microscopie électronique

Objectif :

Identifier l'agent ultrafiltrable incriminé

- ❖ chez des larves moribondes provenant de l'écloserie
- ❖ chez des lots de larves expérimentalement infectés

Analyse en microscopie électronique



- ❖ Capsides icosaédriques (75 nm) vides ou pleines (nucléocapsides) en position intranucléaire
- ❖ Particules virales enveloppées en position extracellulaire (120 nm)



Morphologie compatible à celle des Herpesviridae

Analyse en microscopie électronique

Conclusion :

Détection de particules virales de type herpes chez des larves moribondes provenant de l'écloserie et chez des lots de larves expérimentalement infectés confirmation de l'étiologie virale des mortalités



Confirmation de l'étiologie virale des mortalités

Analyse en PCR

Objectif :

Déterminer s'il s'agit du virus de type herpes « habituellement » rencontré chez les bivalves marins



Utilisation d'amorces spécifiques du virus herpes infectant les larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Analyse en PCR

3 zones du génome viral explorées:

- ❖ Amorces GP : amplification de fragments d'un gène codant pour une glycoprotéine putative
- ❖ Amorces IAP : amplification de fragments d'un gène codant pour une molécule homologue à des protéines inhibitrices de l'apoptose
- ❖ Amorces C : amplification de fragments dans une région codant pour deux gènes de fonction inconnue

Analyse en PCR



❖ Amplification par les amorces GP et IAP : produits de tailles attendues

❖ Amplification par les amorces C : produits présentant une taille inférieure à notre ADN référence



Séquençage produits de PCR C2-6



Deletion?

Séquençage de produits de PCR

C2

```

Tgcaatgtagtatactagagatgagtgtagggatgattctaa
acfgcaaatcgcgectattatacttttcccggggttaant
tcctggecccaatggttttaatttagatgtattcattggc
atgatacacagigagatgattatctcaatggaagaga
    
```

C6



Délétion de 280 pb
Insert de 27 pb

Séquençage de produits de PCR

Conclusion :

- ❖ Présence d'une délétion dans la région O du génome viral identique à celle détectée pour un variant viral retrouvé chez des larves d'huître creuse et de palourde japonaise
- ❖ Un même virus semble être capable d'infecter les larves de trois espèces de bivalve différentes
 - Huître creuse, *Crassostrea gigas*
 - Palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*
 - Coquille Saint Jacques, *Pecten maximus*

Analyse en hybridation *in situ* de gènes

Objectif :

recherche chez des gènes de la présence d'ADN de virus de type herpès au moyen de sondes moléculaires spécifiques sur coupes histologiques

Analyse en hybridation *in situ* de gènes



Marquage nucléaire et cytoplasmique dans différents tissus des gènes

Analyse en hybridation *in situ* de gènes

Conclusion :

- ❖ Présence de virus de type herpès chez les adultes de coquille Saint Jacques
- ❖ Transmission verticale du virus possible

Conclusions

- ❖ Une nouvelle espèce décrite comme infectée par un virus de type herpès : cinq espèces différentes infectées en France (*Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Ruditapes philippinarum*, *R. decussatus* et *Pecten maximus*)
- ❖ Un même virus présent et capable d'induire des mortalités de larves chez trois espèces différentes: *Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* et *Pecten maximus*
- ❖ Un virus présent chez les adultes de coquille Saint Jacques en absence de mortalité : portage et transmission verticale
- ❖ Des techniques de diagnostic performantes : ensemble des analyses réalisées en moins d'un mois (septembre 2000)

MERCI DE
VOTRE
ATTENTION

