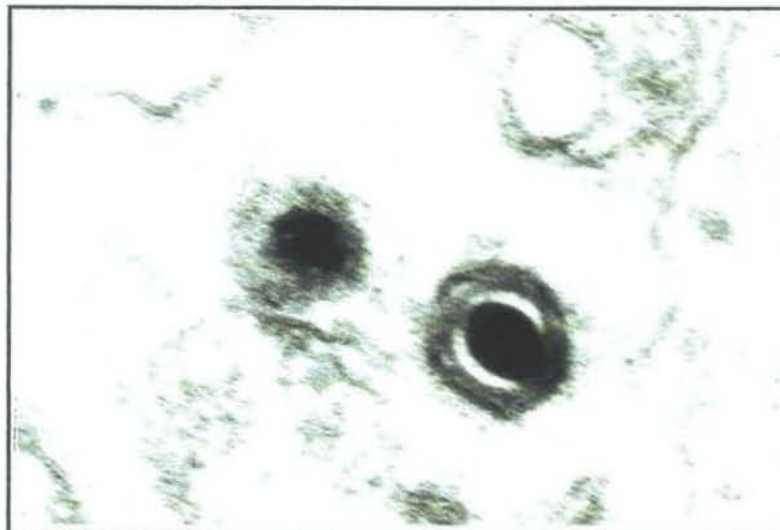


Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation
Décision d'Aide à la Recherche n° 95-07-01

RAPPORT INTERMEDIAIRE

Rédacteur : T. Renault

Février 1997



IFREMER

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie

B.P. 133 - 17390 La Tremblade

Tel : 46 36 98 36

Fax : 46 36 37 51



Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation
Décision d'Aide à la Recherche n° 95-07-01

RAPPORT INTERMEDIAIRE

Rédacteur : T. Renault

Février 1997

IFREMER

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie

B.P. 133 - 17390 La Tremblade

Tel : 46 36 98 36

Fax : 46 36 37 51

Introduction

Le Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie (GAP) de la Station IFREMER de La Tremblade, se propose dans le présent projet d'étudier le virus de type herpes observée chez les huîtres (pouvoir pathogène, conditions d'expression de l'infection, transmission, etc...) et de développer des réactifs permettant de réaliser un diagnostic rapide, sensible et fiable de l'infection qu'il occasionne. Les diagnostics proposés seront basés sur la détection directe du virus, soit au moyen de réactifs immunologiques spécifiques des antigènes viraux, soit par des techniques de biologie moléculaire permettant de détecter l'ADN viral (hybridation de sondes nucléiques et réaction PCR : Polymerase Chain Reaction).

Ce projet, proposé sur une durée de trois années (1995-1998), s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés, depuis 1992, au sein de l'équipe de Pathologie du GAP.

Objectifs et programme

Objectifs : Etude de l'herpès virus de l'huître

Programme : la recherche consiste à évaluer les effets et le rôle du virus dans les mortalités estivales et à évaluer la relation de ce virus avec les virus répertoriés pathogènes pour l'homme.

Principaux résultats 1996

Les travaux concernant le virus de type herpès, observé chez les huîtres, ont été poursuivis en 1996. Divers travaux ont été menés afin de reproduire la maladie au laboratoire sur des huîtres au stade naissain. Par ailleurs, les travaux ont porté également sur la mise au point d'un protocole de PCR et de son amélioration dans le but de disposer d'un outil efficace pour détecter l'ADN du virus de type herpès.

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 contaminé, 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 contaminés.

Ainsi, des essais ont été également réalisés sur naissain en utilisant des larves conventionnelles infectées expérimentalement comme source de virus. Les résultats obtenus sont rapportés dans ce rapport (cf. chapitre II).

Par ailleurs, les travaux ont permis d'aboutir à la mise au point d'un protocole de PCR permettant de détecter l'ADN viral dans les échantillons de larves et de naissain d'huître. Les résultats obtenus sont rapportés dans les pages qui suivent.

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

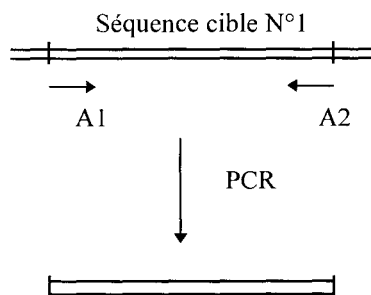
I.1 - Mise au point d'un protocole de détection de l'ADN viral par PCR

I.1.1 - Obtention d'ADN viral cloné

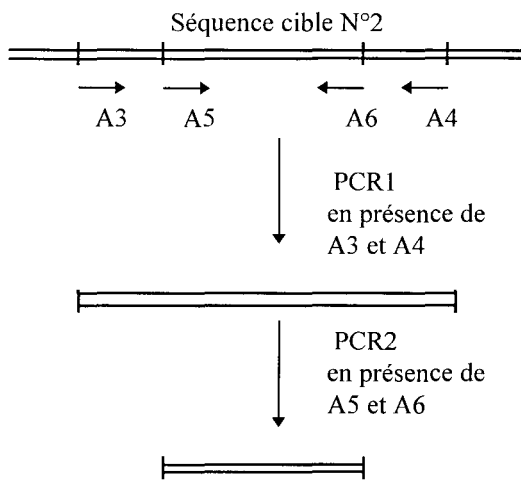
La purification des particules virales à partir de larves de *Crassostrea gigas* infectées à la fin de l'été 1995 a permis d'extraire l'ADN viral. Cet ADN, dont la taille a été estimée à 180 kpb (ou 0,2 fg ou $1,2 \cdot 10^8$ Da), a été cloné dans un plasmide, sous forme de fragments (fragments de restriction *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.

I.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).

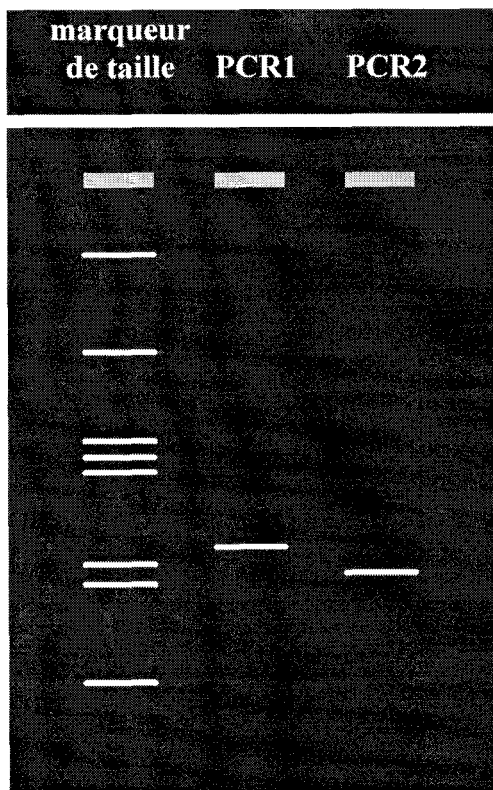


Le premier couple (A1+A2) testé n'a pas été retenu, car la sensibilité de l'amplification ne s'est pas avérée suffisante. De plus, du fait de leurs séquences, la spécificité de ces amorces n'était pas satisfaisante. En effet, si un fragment spécifique était amplifié à partir d'ADN viral, de façon intense,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

I.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 amélioration) 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 I.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 (Figure 2).

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.

I.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 la méthode.

I.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

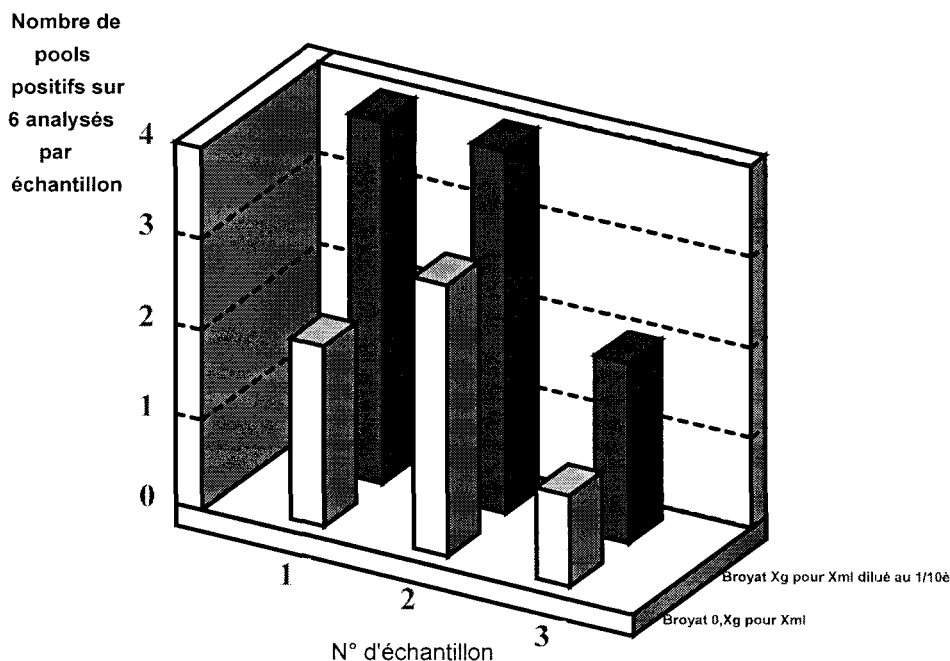
Pour limiter l'effet inhibiteur des surnageants de broyat au cours de la réaction de PCR et obtenir une amélioration de la détection de l'ADN viral d'un facteur de 10 000 à 100 000, il semblait donc nécessaire de limiter la quantité de tissus dans les tubes.

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 1). De plus, ce type de protocole facilite le broyage des tissus.

Figure 1

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

I.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

I.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	5.10 ²	10 ³	2,5.10 ³	5.10 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	10³	2,5.10³
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 5.10³ copies de génomes viraux - 0,1 µl de produit de PCR1 en PCR2)**

Volume d'enzyme	Resultats PCR
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).

I.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.

I.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.

Figure 2
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)

1.3 - 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 sur culture cellulaire. Elle est composée de virus d'origines diverses, pathogènes pour l'homme ou les poissons (Figure 3).

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 3

Origine des ADN viraux disponibles à La Tremblade

Désignation	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

II - Essais de reproduction expérimentale de la maladie sur 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 4.

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 4). 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 herpès. 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 4

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

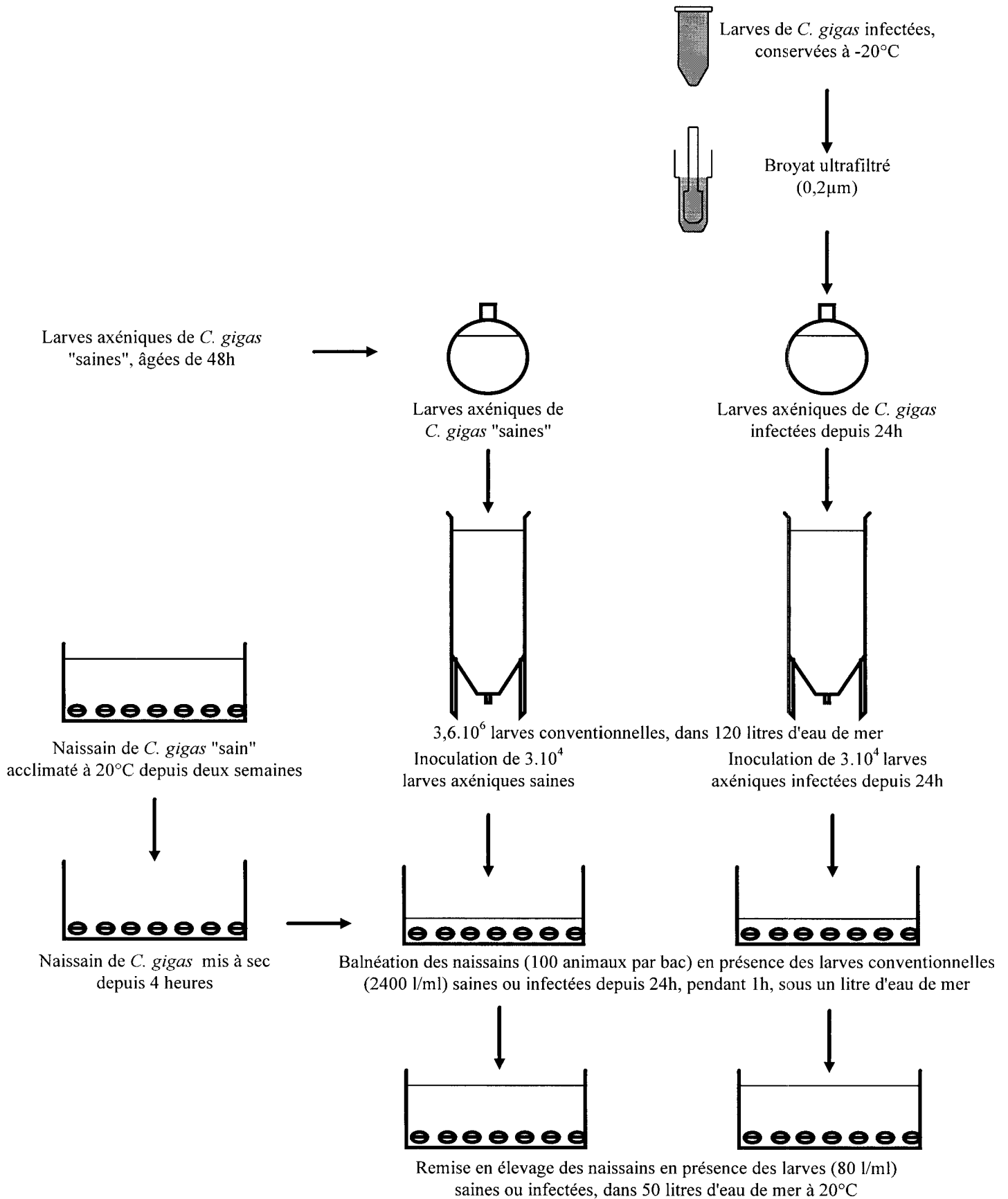
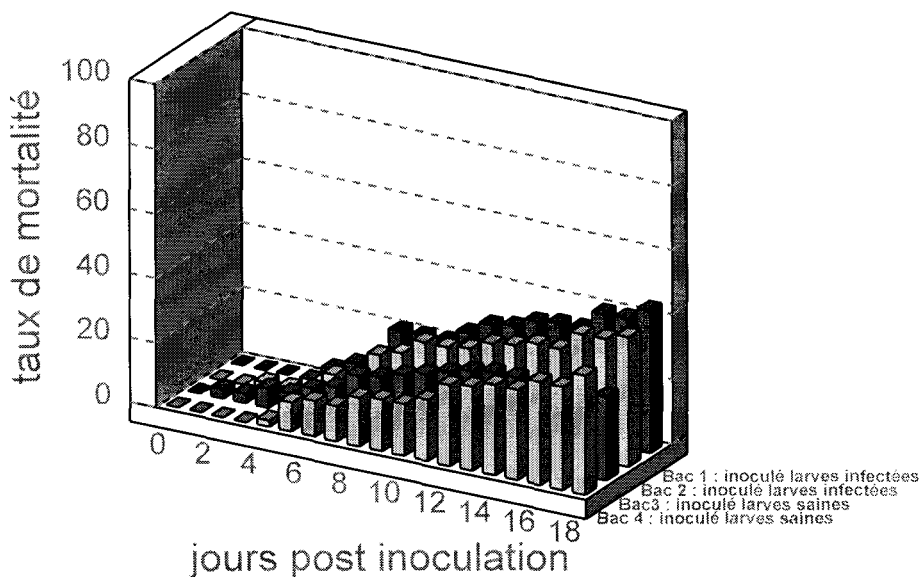


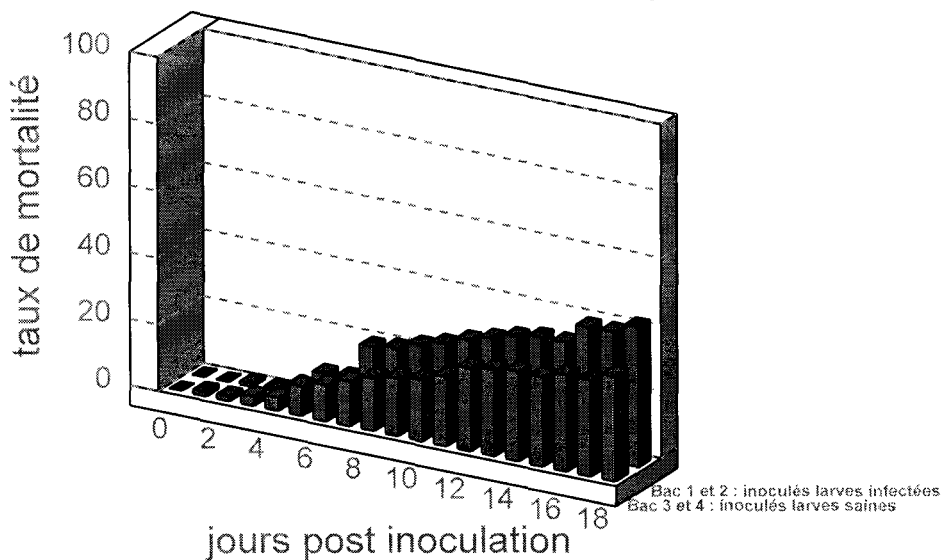
Figure 5

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

Taux de mortalité cumulée pour chaque bac expérimental



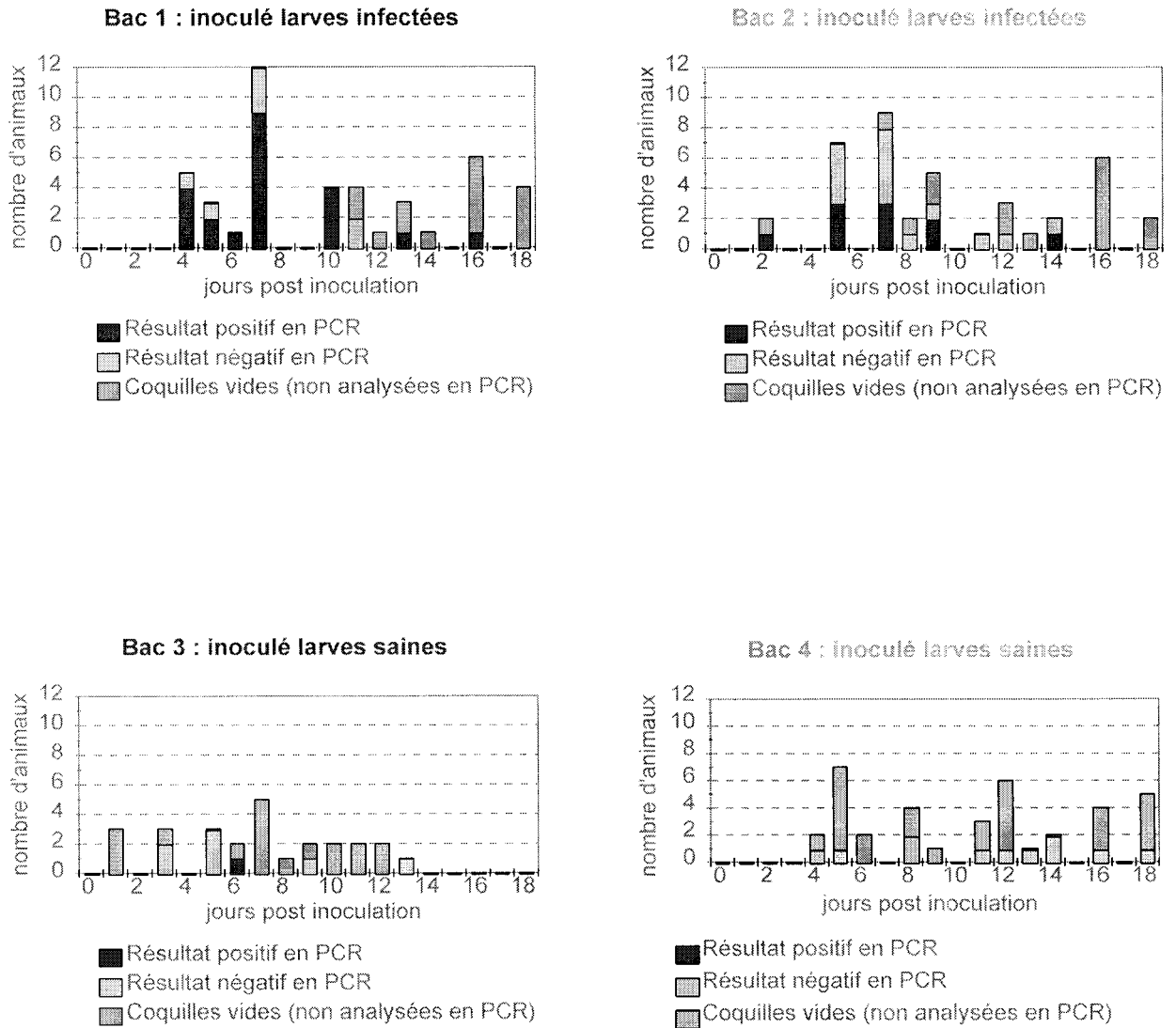
Moyenne des taux de mortalité observés sur les bacs en répliquat



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 6

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 5. 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 6, 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 8). Cette valeur est supérieure à 1,96. Les différences observées sont donc significatives.

Tableau 8

	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 9). 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 9

	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.