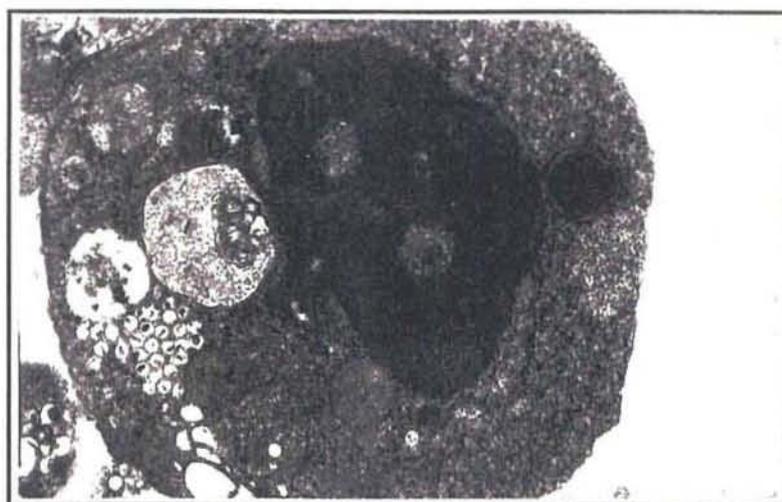


Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation
Décision d'Aide à la Recherche n° 95-07-01

RAPPORT FINAL
Rédacteur : T. Renault

Août 1998



IFREMER
Laboratoire de Génétique et Pathologie
B.P. 133 - 17390 La Tremblade
Tel : 05 46 36 98 36
Fax : 05 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 FINAL
Rédacteur : T. Renault

Août 1998

IFREMER
Laboratoire de Génétique et Pathologie
B.P. 133 - 17390 La Tremblade
Tel : 05 46 36 98 36
Fax : 05 46 36 37 51

RESUME

Depuis 1991, des mortalités massives sporadiques sont rapportées, en France, de manière régulière chez des larves et des juvéniles de différentes espèces de mollusques bivalves marins. Certains de ces épisodes de mortalité ont pu être associés à la détection de virus. Ces derniers par leur morphologie, leur cycle de réplication et leur localisation ont été apparentés à la famille des *Herpesviridae*.

Cependant, les outils de diagnostic disponibles jusqu'alors (histologie et microscopie électronique à transmission) n'étaient pas adaptés à l'étude de ces virus du fait de leur manque de spécificité et de la lourdeur de leur mise en œuvre.

Par ailleurs, se posait la question de l'implication des virus détectés dans les phénomènes de mortalité observés. En effet, les agents viraux étaient-ils responsables ou non des mortalités ?

Enfin, la présence de virus de type herpès chez des espèces de mollusques bivalves marins d'intérêt économique, largement consommés, amenait des interrogations quant à leur parenté avec des virus de la famille des *Herpesviridae* et tout particulièrement avec les herpèsvirus humains. Les coquillages devaient-ils être considérés comme des porteurs passifs d'herpèsvirus déjà connus, du fait de leur grande capacité de filtration, avec un risque potentiel s mortalités rapportées ?

Le programme développé au sein du laboratoire IFREMER de La Tremblade avait pour but de tenter de répondre à ces différentes questions.

◆ La mise au point d'un protocole de purification, à partir de larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, infectées, a permis d'obtenir des quantités importantes de particules virales pures ainsi que d'extraire le matériel génétique viral. Il a ainsi été possible de développer des outils de diagnostic spécifiques (anticorps polyclonaux, sondes nucléiques marquées et amorces de PCR). Ces outils permettent aujourd'hui d'analyser rapidement un grand nombre d'échantillons lors de l'observation de phénomènes de mortalités survenant chez des coquillages d'intérêt économique et de rechercher de manière spécifique la présence de virus de type herpès. Le rôle de ces virus dans les problèmes de mortalités peut être ainsi exploré de manière précise.

◆ Les essais portant sur la reproduction expérimentale de l'infection virale au laboratoire ont permis d'obtenir la démonstration du pouvoir pathogène du virus de type herpès chez les larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Il s'agit bien d'un virus responsable de phénomènes de mortalité à ce stade de développement chez cette espèce de bivalve. Cependant, pour les stades de développement plus avancés (juvéniles), les données sont moins claires. En effet, s'il a été possible de reproduire au laboratoire des phénomènes de mortalités associés à la détection de virus, les conditions expérimentales ne sont pas encore maîtrisées. Néanmoins, les résultats obtenus peuvent être expliqués par la nature même du virus en cause. Les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* nécessitent des conditions particulières pour s'exprimer et induire une infection.

◆ Enfin, les travaux réalisés pour mieux classer les virus de type herpès observés chez les coquillages ont montré qu'il n'existait pas de relation étroite ou d'identité avec les herpèsvirus déjà décrits, tout particulièrement avec les herpèsvirus humains. Les travaux de séquençage, entre autres, ont permis de mettre en lumière l'originalité de ces virus par rapport aux membres de la famille des *Herpesviridae*.

De plus, la démonstration de pouvoir pathogène du virus de type herpès infectant les larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ainsi que les observations de lésions cellulaires chez les animaux infectés au moyen de la microscopie électronique à transmission sont autant de données qui tendent à prouver l'existence d'une véritable maladie infectieuse et non l'existence d'un portage passif de virus par les mollusques.

SOMMAIRE

I - INTRODUCTION	1
II - GENERALITES	2
1. - Les caractéristiques de l'étude des maladies chez les mollusques bivalves marins	2
2. - Les maladies infectieuses d'origine virale chez les mollusques bivalves marins	3
3. - Les infections à virus de type herpès chez les mollusques bivalves	4
3. 1. - <i>Dans le monde</i>	4
3. 2. - <i>En France</i>	5
III - OBJECTIFS ET PROGRAMME	7
1. - Objectifs	7
2. - Programme	7
IV - RESULTATS ET DISCUSSION	11
1. - Purification du virus	11
2. - Diagnostic de l'infection virale au moyen de réactifs immunologiques	11
2. 1. - <i>Tests de réactifs immunologiques hétérologues (spécifiques d'autres herpèsvirus)</i>	11
2. 2. - <i>Obtention et test d'anticorps polyclonaux spécifiques</i>	11
3. - Diagnostic de l'infection virale par PCR et au moyen de sondes nucléiques spécifiques	16
3. 1. - <i>Extraction de l'ADN viral, clonage en plasmide et contrôle des clones</i>	16
3. 2. - <i>Développement de techniques de PCR</i>	16
3. 2. 1. - <i>Mise au point d'un protocole de détection de l'ADN viral par PCR</i>	16
<u>a.- Dessin des amorces</u>	16
<u>b. - Traitement des échantillons et réaction de PCR</u>	19
<u>c. - Essais d'amélioration du protocole de PCR</u>	21
<u>d. - Contrôle de la spécificité des amorces A3/A4 et A5/A6</u>	29
<u>e. - Analyse d'échantillons d'huître effectuées en PCR</u>	30
3. 2. 2. - <i>Définition et test de nouvelles amorces pour la détection en PCR du virus de type herpès infectant les huîtres</i>	32
<u>a.- Dessin des amorces</u>	32
<u>b. - Sélection des amorces</u>	33
<u>c. - Contrôle de la spécificité des amorces OHV3/OHV4</u>	33

d. - Définition du seuil de détection	34
e.- Répétabilité	34
f. – Essais de nested	34
g. - Analyses d'échantillons d'huître effectuées en PCR	36
3. 3. - Développement de sondes nucléiques spécifiques (technique d'hybridation <i>in situ</i>)	36
3. 3. 1. - Obtention d'une sonde nucléique marquée à la digoxigénine par PCR	36
3. 3. 2. - Test de spécificité de la sonde en Southern blotting	37
3. 3. 3. - Mise au point d'un protocole d'hybridation <i>in situ</i>	39
4. - Essais de reproduction expérimentale et d'induction de l'infection virale	41
4. 1. - Propagation du virus chez les larves de bivalves	41
4. 1. 1. - Reproduction de l'infection virale chez des larves axéniques d'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i> , par inoculation de broyat de larves infectées ultrafiltré	41
4. 1. 2. - Reproduction de l'infection virale sur larves conventionnelles d'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i> , par contact avec des larves axéniques vivantes infectées expérimentalement	41
4. 1. 3. - Essais de reproduction de l'infection virale sur larves de palourde japonaise, <i>Ruditapes philippinarum</i>	41
4. 2. - Etude de la transmission de la maladie à des animaux adultes et au naissain	45
4. 2. 1. - Essais de reproduction de mortalités chez des huîtres adultes par inoculation intracardiaque de broyat de matériel infecté	45
4. 2. 2. - Essai de reproduction de l'infection virale au stade naissain par balnéation en présence de broyat de matériel infecté	45
4. 2. 3. - Essai de reproduction de l'infection virale au stade naissain par balnéation en présence de larves vivantes expérimentalement infectées	46
a.- Essais réalisés en 1996	46
b. - Essais réalisés en 1997	52
4. 3. - Induction de l'infection virale	57
5. - Etude des relations pouvant exister entre les virus de type herpès observés chez les huîtres et des virus appartenant à la famille des <i>Herpesviridae</i>	58
5. 1. - Tests de réactifs immunologiques hétérologues (anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques de virus appartenant à la famille des <i>Herpesviridae</i>)	58
5. 2. - Analyses en PCR	58
5. 3. - Séquençage et recherche d'homologies dans les banques de données	58
V - PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS, POSTERS ET RAPPORTS (1995-1998)	60
1. - Publications	60
2. - Publications en préparation	60
3. - Communications Colloques	60
4. - Posters	61

5. - Thèse	61
6. - Rapports de stage	61
7. - Rapports IFREMER	61
8. - Rapports de contrat ou de convention	62
9. - Documents techniques	62
10. - Rapport d'expertise	62

I - INTRODUCTION

Le Laboratoire de Génétique et Pathologie (Station IFREMER de La Tremblade, Charente Maritime) se proposait dans le présent projet d'étudier le virus de type herpès 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 techniques de diagnostic proposées sont basées 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 de 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 du Laboratoire de Génétique et Pathologie.

L'avancée des travaux et tout particulièrement la mise au point d'un protocole de purification du virus au cours de l'été 1995, a permis d'envisager le développement d'outils de diagnostic spécifiques. Ces outils devaient permettre d'étudier l'implication du virus de type herpès dans les phénomènes de mortalité observés chez les huîtres, de réaliser une étude épidémiologique précise (utilisation d'anticorps spécifiques et de sondes nucléiques en hybridation *in situ* et sur membrane) et de tenter de contrôler la maladie en détectant les animaux porteurs du virus en absence de mortalité par la technique de PCR. Cette dernière méthode est particulièrement intéressante, car elle pourrait permettre de sélectionner des animaux non porteurs du virus (contrôle des larves et du naissains avant commercialisation et contrôle des géniteurs ou des gamètes avant fécondation). De plus, l'obtention de virus purifié permettait d'envisager de comparer cet agent à des virus de la famille des *Herpesviridae*.

II - GENERALITES

1. - Les caractéristiques de l'étude des maladies chez les mollusques bivalves marins

En premier lieu, il semble important de préciser quelques particularités de la pathologie chez les invertébrés marins et plus particulièrement chez les mollusques bivalves. En effet, les pathologistes ne disposent que de peu de moyens pour protéger ces animaux vis à vis des maladies infectieuses du fait de certaines caractéristiques biologiques inhérentes aux espèces considérées ainsi qu'aux techniques d'élevage utilisées.

❖ D'une part, les traitements médicamenteux, pour des espèces le plus généralement élevées en milieu ouvert, posent les problèmes des quantités de substances actives à utiliser, des fortes probabilités de recontamination et de l'accumulation de résidus dans le milieu. De ce fait, ce type d'approche pour contrôler les maladies infectieuses ne semble pas une voie à privilégier, excepté pour des élevages réalisés en milieu confiné (écloseries et nurseries).

❖ D'autre part, la vaccination au sens conventionnel du terme, reste sans objet chez les invertébrés et donc chez les mollusques bivalves, du fait de l'absence de réponse immunitaire spécifique induite chez ces espèces. En effet, il est important de rappeler que ces animaux ne possèdent pas de cellules de type lymphocytaire (lymphocytes B ou T), cellules impliquées chez les vertébrés dans les réponses spécifiques inductibles vis à vis des agents pathogènes. Ce sont ces cellules qui peuvent être stimulées au moyen de la vaccination.

Par ailleurs, cette dernière particularité présente également des répercussions sur le diagnostic des maladies infectieuses chez les bivalves. Du fait de l'absence d'anticorps spécifiques (produits par les lymphocytes B chez les vertébrés en réponse à une infection donnée), le diagnostic ne peut être qu'un diagnostic direct chez les mollusques. C'est à dire qu'il est nécessaire de rechercher directement l'agent infectieux en cause et qu'il est impossible de rechercher sa trace (anticorps spécifiques dirigés contre lui). Dans ce cadre, un ensemble de techniques existant pour rechercher indirectement des agents pathogènes chez les vertébrés est inaccessible aux pathologistes travaillant sur les invertébrés et rend le diagnostic des maladies infectieuses plus difficile à mettre en oeuvre chez ces espèces.

Au vu de ces éléments, les seules façons de protéger efficacement les mollusques bivalves marins d'intérêt économique vis à vis des maladies infectieuses sont de mettre au point des techniques de diagnostic direct sensibles et fiables ainsi que d'obtenir des populations d'animaux présentant une "résistance" exacerbée à certaines maladies.

❖ Concernant le premier point, il est important de rappeler que les épizooties chez les bivalves ont été et sont encore étudiées essentiellement au moyen de l'histologie (technique permettant d'analyser des échantillons à l'aide de la microscopie optique) et de la microscopie électronique à transmission qui bien que restant des techniques fondamentales présentent des limites certaines. En effet, elles sont consommatrices de temps aussi bien pour la préparation des échantillons que pour leur observation. Elles sont par ailleurs relativement inadaptées pour la quantification des infections du fait de la difficulté à traiter un grand nombre d'échantillons ainsi que pour détecter de faibles niveaux d'infection. De plus, les

analyses effectuées grâce à ces techniques sont tributaires de la subjectivité de l'observateur. Dans ce cadre, il est nécessaire de développer aujourd'hui de nouveaux outils de diagnostic. En effet, en pratique, les maladies peuvent être mieux contrôlées si des analyses peuvent être réalisées rapidement sur un grand nombre d'animaux à différentes étapes de production, mais également avant tout transfert d'envergure. De nouvelles techniques peuvent être attendues grâce aux progrès réalisés dans les domaines des biotechnologies et de la biologie moléculaire.

❖ Concernant le second point, du fait de l'impossibilité de stimuler des mécanismes immunitaires spécifiques inexistant, l'approche la plus prometteuse semble être l'obtention d'animaux "résistants" à certaines pathologies. Dans ce cadre, les travaux menés en pathologie générale peuvent amener des réponses de différents types. La reproduction expérimentale d'une maladie au laboratoire ouvre la voie à la sélection par le biais de la génétique quantitative. Mais également des travaux concernant l'étude des mécanismes de défense non spécifiques mis en jeu par les bivalves vis à vis des infections peuvent aboutir à la définition de traceurs de résistance utilisables dans une stratégie de sélection ou une stratégie de transgénèse.

2. - Les maladies infectieuses d'origine virale chez les mollusques bivalves marins

Parmi les maladies infectieuses observés chez les mollusques bivalves, les viroses sont souvent mal connues, en raison d'une certaine inadéquation des techniques de diagnostic généralement mises en oeuvre lors de phénomènes de mortalité. En effet, la microscopie photonique a été et reste encore, dans de nombreux laboratoires travaillant sur les pathologies des mollusques, la méthode de base pour l'analyse des échantillons. Cette technique reste insuffisante en cas de pathologie d'étiologie virale si elle n'est pas complétée par d'autres approches telles que la microscopie électronique, la recherche d'effets cytopathogènes sur lignées cellulaires ou la détection de l'agent infectieux à l'aide de réactifs spécifiques (anticorps spécifiques et sondes nucléiques). Il faut noter qu'aucune lignée cellulaire de mollusques bivalves n'est actuellement disponible, et la recherche *in vitro* d'éventuels effets cytopathogènes dus à des virus de bivalves sur des monocouches de cellules en système homologue est donc impossible. Par ailleurs, les réactifs spécifiques d'agents pathogènes des bivalves sont encore aujourd'hui peu développés. De ce fait, il est fortement présumé que, parmi les nombreux cas de mortalité à caractère épidémique dont l'étiologie a été déclarée inconnue, certains aient pu être liés à des virus non détectés.

Le premier cas d'infection virale a été observé, en 1972, chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, aux Etats Unis. La description en microscopie électronique à transmission de particules virales hexagonales dans le noyau des cellules infectées, a conduit à associer ce virus à la famille des *Herpesviridae*. Chez cette même espèce, trois autres virus ont été également mis en évidence. Deux d'entre eux, décrits chez des huîtres adultes, ont été apparentés respectivement aux familles des *Papovaviridae* et des *Retroviridae*. Un autre virus, décrit chez les juvéniles de *C. virginica* a été apparenté aux *Reoviridae*. Bien que ces virus aient parfois été associés à des mortalités importantes, leur incidence concerne seulement

quelques lots particuliers de *C. virginica* et ils n'ont pas été décrits comme responsables de réelles épizooties.

D'autres viroses ont été décrites chez les bivalves, parfois de façon conjoncturelle, lors d'études anatomiques, parfois en liaison avec des mortalités. La signification de ces infections en terme de pathogénicité pour les espèces concernées, reste largement incomprise, en raison du manque de données épidémiologiques. En effet, celles-ci sont difficiles à acquérir compte tenu des méthodes de diagnostic actuellement disponibles. Toutefois, des virus apparentés à la famille des *Iridoviridae* et à la famille des *Herpesviridae* ont été décrits chez différentes espèces d'huîtres, en association avec des mortalités importantes à caractère épidémique ou endémique. Bien que leur pathogénicité réelle n'ait été que très rarement démontrée par reproduction expérimentale de la maladie, ces virus peuvent être considérés comme des agents potentiellement dangereux pour les cheptels d'huître.

3. - Les infections à virus de type herpès chez les mollusques bivalves

3. 1. - Dans le monde

Au cours d'une étude, menée en 1972, concernant les effets de la température sur la croissance de l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, des chercheurs américains ont noté l'incidence de mortalités plus importantes (52%) sur les lots maintenus en élevage à 28-30°C comparativement aux lots placés à 12-18°C (18%). L'examen histologique des huîtres placées à fortes températures a relevé la présence d'inclusions Feulgen positives indiquant la présence d'acide déoxyribonucléique (ADN), dans le noyau de certaines cellules, les hémocytes. Une étude plus approfondie en microscopie électronique à transmission a permis de mettre en évidence, dans les inclusions nucléaires, des particules virales de forme hexagonale, de 70 à 90 nanomètres de diamètre, ainsi que des particules virales enveloppées dans le cytoplasme des cellules infectées. Les caractéristiques structurales et la localisation des particules virales ont permis d'apparenter ce virus à la famille des *Herpesviridae*. En étudiant des échantillons prélevés à différentes périodes de l'année, il a été possible de montrer que l'infection virale se développe préférentiellement à des températures élevées. Les auteurs de ce travail en concluent que le virus se trouverait à l'état latent ou endémique à température peu élevée, et qu'une augmentation de celle-ci favoriserait la propagation de la maladie, éventuellement en faisant passer le virus d'une phase de latence à une expression clinique.

Des mortalités massives, associées à la détection d'un virus apparenté à la famille des *Herpesviridae* ont été plus récemment décrites en France sur des larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas* et d'huître plate, *Ostrea edulis*, élevées en éclosion. Un virus similaire a également été décrit sur des larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, produites en éclosion, en Nouvelle Zélande. Des mortalités anormales de larves d'huître de l'espèce *Tiostrea chilensis* ont également été très récemment rapportées en association avec la détection d'un virus de type herpès, en Nouvelle Zélande.

A l'heure actuelle, ces infections virales n'ont pas été observées chez des individus adultes pour les deux espèces : *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*. Ainsi, chez les juvéniles de moins d'un an, des virus apparentés aux *Herpesviridae* ont été observés en association avec des mortalités importantes sur des lots particuliers d'huître plate, *O. edulis* et d'huître creuse,

C. gigas, en France. Néanmoins, des particules virales de type herpès ont été observées dans des hémocytes d'huîtres adultes de l'espèce *Ostrea angasi*, en Australie. Dans ce cas, l'infection est limitée à quelques cellules à l'échelle de l'animal et n'est pas associée à des phénomènes de mortalités.

Ces descriptions multiples reflètent le caractère ubiquiste de cette famille de virus chez les mollusques. Une étude comparative de l'ensemble des virus apparentés aux *Herpesviridae* décrits chez les bivalves a été récemment réalisée.

Du point de vue de leurs dimensions, en microscopie électronique à transmission, les nucléocapsides des virus de type herpès décrits chez les différentes espèces d'huître, se situent dans une gamme relativement large (70 à 120 nanomètres). Cette variabilité est encore plus importante lorsque les dimensions des particules enveloppées sont comparées. Leur diamètre est en effet compris entre 90 et 180 nanomètres. Toutefois, ces comparaisons de taille restent difficiles à interpréter, car les valeurs obtenues peuvent varier en fonction de la technique retenue pour la préparation des échantillons en vue des examens en microscopie électronique et de la méthode de mesure. Une caractéristique commune à l'ensemble de ces virus peut toutefois être notée. En effet, lors de la première description (1972) de ce type de virus, chez l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, les animaux originaires du milieu naturel dont la température était de 12-18°C avaient été placés dans une eau chauffée à 28-30°C. Les observations ultérieures de mortalités de larves et de naissains de différentes espèces d'huître, en association à la détection de virus de type herpès, ont été réalisées pendant les périodes chaudes de l'année. Ces observations suggèrent que des températures plus élevées sont un facteur favorable au développement des infections à virus de type herpès. En effet, la température pourrait influencer sur la rapidité du développement de l'infection, mais elle pourrait également intervenir dans l'activation de virus présent chez les coquillages sous forme latente (phénomène observé pour les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* chez les vertébrés).

3. 2. - En France

De fortes mortalités sporadiques sont observées en France depuis 1991 sur des larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et d'huître plate, *Ostrea edulis*, produites en écloséries. Certains de ces phénomènes de mortalité ont été associés à la détection en microscopie électronique à transmission d'un virus de type herpès chez les animaux malades. De la même façon, des épisodes de mortalités anormales ont également été observés sur des naissains des deux espèces en association avec la présence de virus de type herpès.

Depuis 1991, de fortes mortalités sporadiques de larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, (80 à 100% sur certains lots) ont été observées chaque année, au cours de l'été, dans différentes écloséries françaises, en association à la détection en microscopie électronique à transmission d'un virus. Ce dernier, par ses caractéristiques morphologiques et son cycle de développement, peut être apparenté à la famille des *Herpesviridae*. La pathogénicité de cet agent pour le stade larvaire a été démontrée par reproduction expérimentale de mortalités sur larves axéniques (larves élevées en conditions stériles) d'huître creuse, *C. gigas*. Dans ces conditions, le virus est capable de provoquer la mortalité totale de lots de larves saines. Une démonstration scientifique de l'intervention du facteur température et de l'origine des géniteurs a été également réalisée. En effet, les températures élevées favorisent le

développement de l'infection virale au stade larvaire et la maladie semble pouvoir être transmise aux larves par les géniteurs.

De fortes mortalités sporadiques (60 à 100%) ont également été observées au cours de chaque été, entre 1993 et 1996, sur des lots particuliers de naissains d'huître creuse, produits en éclosérie ou provenant de captage naturel. Pour ces animaux âgés de moins d'un an, il a été possible de détecter en microscopie électronique à transmission un virus de type herpès comparable à celui mis en évidence chez les larves. Cependant, dans ce cas, la démonstration du pouvoir pathogène du virus reste encore en cours d'étude au laboratoire. En effet, des essais pour reproduire expérimentalement des mortalités sur des juvéniles sains à partir de matériel biologique infecté sont en cours de réalisation à la station IFREMER de Ronces les Bains (Charente Maritime).

De plus, des mortalités concomitantes ont été rapportées chez les larves des deux espèces, *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*, élevées dans les mêmes installations (écloséries et nurseries), avec détection en microscopie électronique à transmission d'un virus de type herpès, dans les deux cas.

Enfin au cours de l'été 1997, des mortalités massives sporadiques, associées à la détection d'un virus de type herpès, ont été observées chez des larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, dans une éclosérie privée française. Dans ce cas, des mortalités concomitantes ont été également observées chez des larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, avec détection en microscopie électronique à transmission de particules virales de type herpès et détection d'ADN viral par la technique de PCR.

III - OBJECTIFS ET PROGRAMME

1. - *Objectifs* : Etude de l'herpèsvirus de l'huître

2. - *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.

Ce programme comprend divers travaux :

1 - Purification du virus

2 - Diagnostic de l'infection virale au moyen de réactifs immunologiques

2. 1. - *Tests de réactifs immunologiques hétérologues*
2. 2. - *Obtention et test d'anticorps polyclonaux spécifiques*

3 - Diagnostic de l'infection virale par PCR et au moyen de sondes nucléiques

3. 1. - *Extraction, clonage de l'ADN viral et analyse des clones*
3. 2. - *Développement de techniques de PCR*
3. 3. - *Développement de sondes nucléiques spécifiques*

4 - Essais de reproduction expérimentale de l'infection virale

4. 1. - *Propagation du virus sur larves*
4. 2. - *Etude de la transmission de la maladie au naissain et aux adultes*
4. 3. - *Induction de l'infection virale*

5 - Etude des relations pouvant exister entre les virus de type herpès observés chez les huîtres et des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*

5. 1. - *Tests d'anticorps hétérologues*
5. 2. - *Analyses en PCR*
5. 3. - *Séquençage et recherche d'homologies dans les banques de données*

Les objectifs des différents travaux de ce programme de recherche sont les suivants :

1 - Purification du virus

- ❖ Obtenir du virus purifié en quantité suffisante afin de préparer des réactifs de diagnostic spécifiques, sensibles et fiables

2 - Diagnostic de l'infection virale au moyen de réactifs immunologiques

2. 1. - Tests de réactifs immunologiques hétérologues (spécifiques d'autres herpèsvirus)

- ❖ En l'absence de réactifs spécifiques (à l'initiation de ce programme de recherche), utiliser des réactifs existants, spécifiques d'autres virus pour le diagnostic sur la base d'éventuelles réactions croisées

2. 2. - Obtention et test d'anticorps polyclonaux spécifiques

- ❖ Développer des réactifs spécifiques par immunisation d'animaux de laboratoire avec des particules virales purifiées

3 - Diagnostic de l'infection virale par PCR et au moyen de sondes nucléiques spécifiques

3. 1. - Extraction de l'ADN viral, clonage en plasmide et contrôle des clones

- ❖ Extraire l'ADN à partir des particules virales purifiées de façon à pouvoir le cliver ensuite par des enzymes de restriction et intégrer les fragments obtenus en plasmide (multiplication des fragments après intégration)
- ❖ Contrôle de la spécificité des clones obtenus par hybridation sur membrane

3. 2. - Développement de techniques de PCR

- ❖ Séquençage de fragments clonés
- ❖ Dessin et test d'amorces de PCR
- ❖ Mise au point et test de protocoles de préparation des échantillons

3. 3. - Développement de sondes nucléiques spécifiques (technique d'hybridation in situ)

- ❖ Préparation et test de sondes spécifiques marquées
- ❖ Mise au point d'un protocole d'hybridation *in situ*

4 - Essais de reproduction expérimentale et d'induction de l'infection virale

4. 1. - Propagation du virus chez les larves de bivalves

4. 1. 1. - Reproduction de l'infection virale chez des larves axéniques d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, par inoculation de broyat de larves infectées ultrafiltré

- ❖ Confirmation de la pathogénicité du virus sur larves axéniques
- ❖ Confirmation de la conservation du pouvoir pathogène du virus après congélation à - 20°C
- ❖ Possibilité de reproduire la maladie au laboratoire au moment désiré

4. 1. 2. - Reproduction de l'infection virale sur larves conventionnelles d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, par contact avec des larves axéniques vivantes infectées expérimentalement

- ❖ Reproduction de la maladie sur larves conventionnelles et confirmation du pouvoir pathogène du virus
- ❖ Démonstration que la transmission horizontale de l'infection est possible
- ❖ Obtention de plus grandes quantités de larves infectées

4. 1. 3. - Essais de reproduction de l'infection virale chez des larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*

- ❖ Démonstration de la transmission interspécifique de l'infection virale à virus de type herpès

4. 2. - Etude de la transmission de la maladie à des animaux adultes et au naissain

4. 2. 1. - Essais de l'infection virale chez des huîtres adultes par inoculation intra-cardiaque de broyat de matériel infecté

- ❖ Reproduction de l'infection virale chez des huîtres adultes et démonstration du pouvoir pathogène du virus pour ce stade de développement
- ❖ Etudier au laboratoire le développement de la maladie

4. 2. 2. - Essai de reproduction de l'infection virale au stade naissain par balnéation en présence de broyat de matériel infecté

- ❖ Reproduction de la maladie au stade naissain et démonstration du pouvoir pathogène du virus pour ce stade de développement (démonstration que le virus de type herpès est bien l'agent responsable des mortalités observées sur le naissain)
- ❖ Etudier au laboratoire le développement de la maladie

4. 2. 3. - Essai de reproduction de l'infection virale au stade naissain par balnéation en présence de larves vivantes expérimentalement infectées

- ❖ Reproduction de la maladie sur le stade naissain et démonstration du pouvoir pathogène du virus pour ce stade de développement (démonstration que le virus de type herpès est bien l'agent responsable des mortalités observées sur le naissain)
- ❖ Etudier au laboratoire le développement de la maladie

4. 3. - Induction de l'infection virale

- ❖ Induire la maladie chez des animaux porteurs sains au stade naissain en soumettant les huîtres à des conditions « stressantes » (élévation de température, tamisage)
- ❖ Etudier au laboratoire les conditions d'expression et de développement de la maladie

5 - Etude des relations pouvant exister entre les virus de type herpès observés chez les huîtres et des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*

5. 1. - Tests de réactifs immunologiques hétérologues (anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques de virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*)

- ❖ Rechercher au moyen de techniques immunohistochimiques (technique d'immunoperoxidase indirecte et d'immunofluorescence indirecte sur coupes histologiques) des réactions croisées possibles entre les virus de type herpès observés chez les huîtres et des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*

5. 2. - Analyses en PCR

- ❖ Rechercher à amplifier par PCR les ADN de différents herpèsvirus en utilisant les amorces dessinées spécifiquement pour le virus de type herpès infectant l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

5. 3. - Séquençage et recherche d'homologies dans les banques de données

- ❖ Rechercher dans les banques de données si les séquences identifiées dans l'ADN du virus de type herpès infectant les huîtres présentent des homologies avec des séquences de virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*

IV - RESULTATS ET DISCUSSION

1 - Purification

Les travaux concernant le virus de type herpès observé chez les huîtres ont permis d'aboutir à la mise au point d'un protocole de purification du virus, malgré l'ensemble des difficultés rencontrées (impossibilité de reproduire le virus sur lignées cellulaires, dépendance vis à vis des professionnels pour l'approvisionnement en matériel infecté et difficulté de planifier les expériences de ce fait).

Il a été ainsi possible de purifier à plusieurs reprises des particules virales à partir de larves infectées fraîches (Figure 1). Cependant, le même protocole (Figure 2) testé sur des lots de naissain présentant des mortalités anormales n'a pas permis d'aboutir à un résultat probant. Il a, en effet, été possible d'observer quelques particules virales pour certains lots. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que certains des essais ont été réalisés à partir d'animaux pour lesquels il n'y avait pas d'infection, mais seulement des mortalités non liées à la présence du virus (confirmation *a posteriori* de l'absence de suspicion d'infection virale par les analyses histologiques). Une autre hypothèse à retenir est un effet de dilution des virions par le biais de la quantité de tissus utilisée pour la purification dans ce cas. Par ailleurs, les essais effectués à partir de larves ou de naissains infectés conservés congelés à -20°C , ont été infructueux.

2 - Diagnostic de l'infection virale au moyen de réactifs immunologiques

2.1. - Tests d'anticorps hétérologues

Il a été possible de mettre en évidence une communauté antigénique possible (Figures 3a, 3b, 3c et 3d) avec l'herpèsvirus du poisson chat (intérêt phylogénique), mais une absence de réaction croisée avec les autres réactifs testés : anticorps dirigés contre le Cytomégalovirus humain (anticorps monoclonaux NCL-CMV-EA et NCL-CMV-LA, Novocastra Laboratories, Tebu), les herpes simplex 1 et 2 humains (anticorps polyclonaux spécifiques de protéines de structure, Viostat, Interchim) et un herpès de salmonicidé (sérum polyclonal spécifique du virus d'*Oncorhynchus masou* fourni par le Dr. M. Yoshimizu, Université d'Okkaido, Japon).

Les réactifs spécifiques de l'herpès virus de poisson chat (un anticorps monoclonal spécifiques de glycoprotéines d'enveloppe et un sérum polyclonal fournis par le Pr. R. P. Hedrick, Université de Californie, Davis, USA) ne sont cependant pas utilisables à des fins diagnostiques, car ils doivent être utilisés concentrés pour donner une réaction positive (impossibilité d'utiliser ces réactifs pour un diagnostic de routine de l'infection à virus de type herpès observée chez les huîtres). Cependant, ces réactifs permettent d'étudier l'herpèsvirus des huîtres d'un point de vue phylogénique.

2.2. - Obtention et test d'anticorps spécifiques du virus

Trois souris BalbC ont été immunisées avec du virus purifié. Les sérums et les ascites (contenant des anticorps spécifiques) ont été récupérés après sacrifice des animaux. L'une des ascites montre une réactivité forte sur coupes histologiques de tissus d'huîtres infectées (Figures 4a, 4b, 4c et 4d). En effet, en utilisant la technique d'immunoperoxidase indirecte sur coupes histologiques, des cellules du tissu conjonctif présentent un marquage intense chez des

Figure 1

Particules virales purifiées à partir de larves infectées d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Cliché de microscopie électronique à transmission : capsides (flèches) et nucléocapsides (tête de flèche),
barre : 80 nm

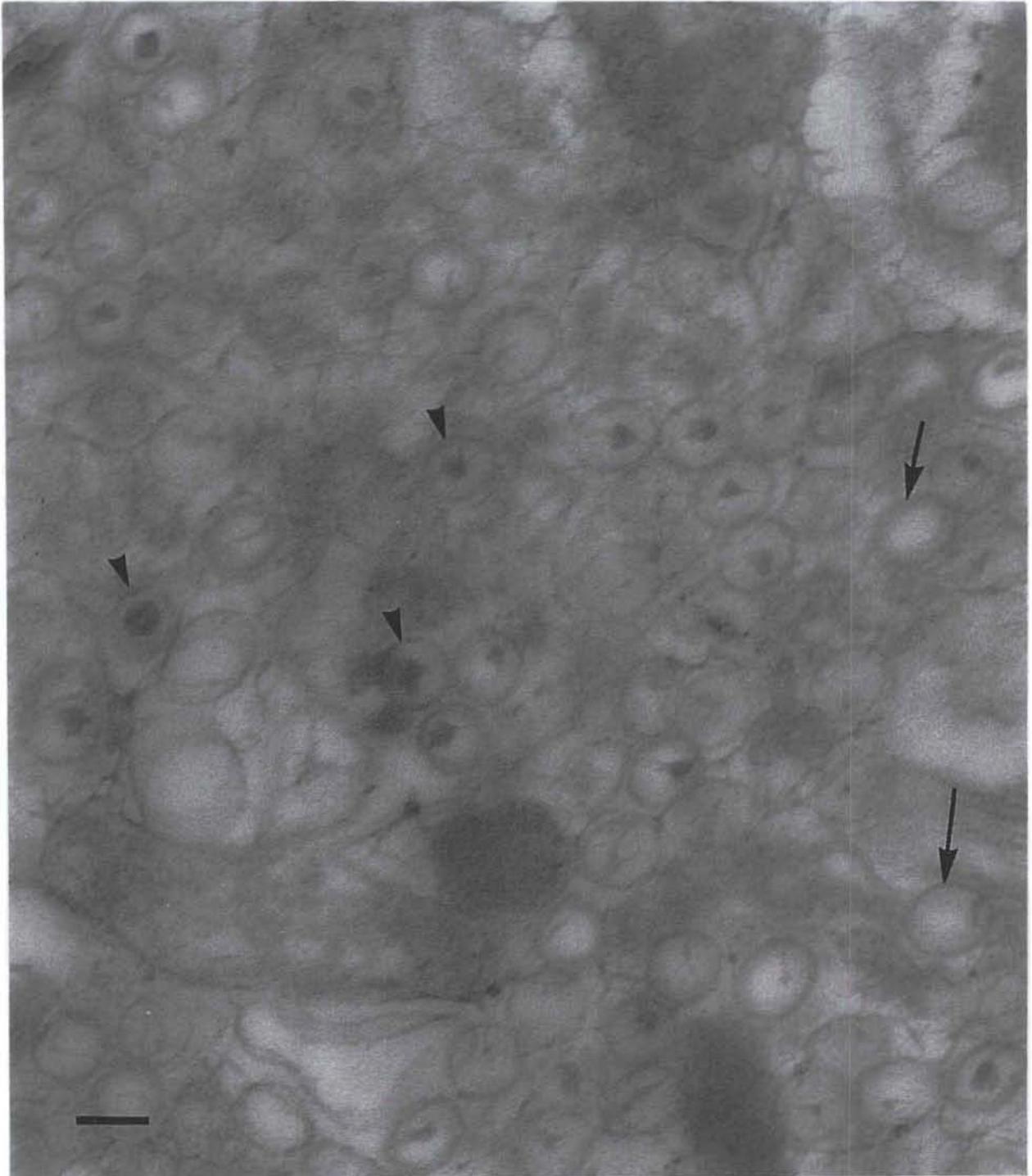
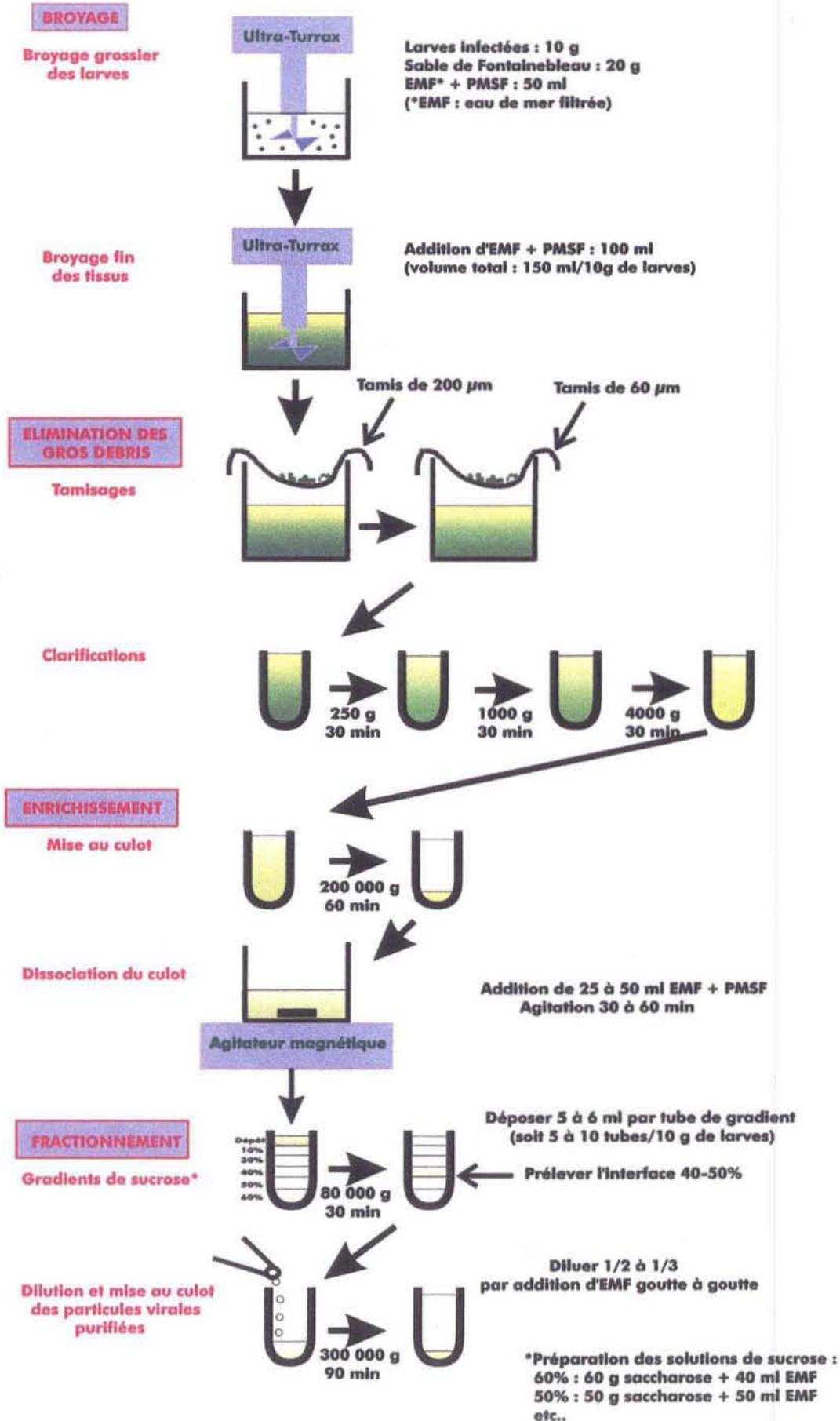


Figure 2

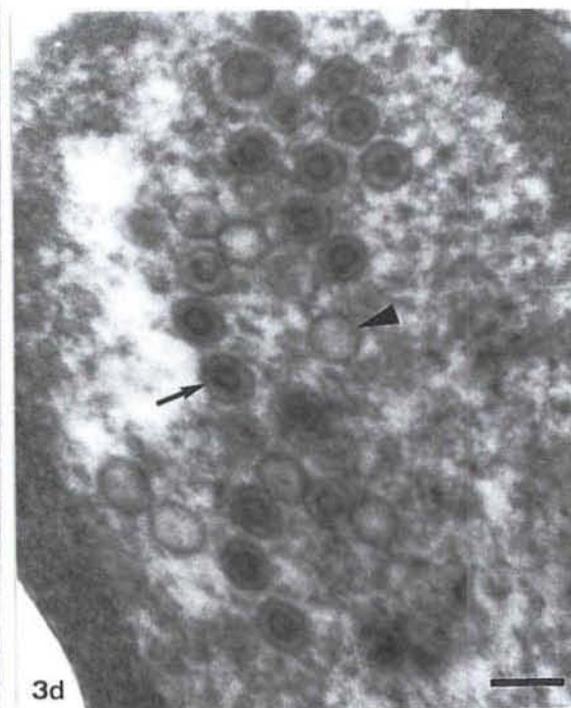
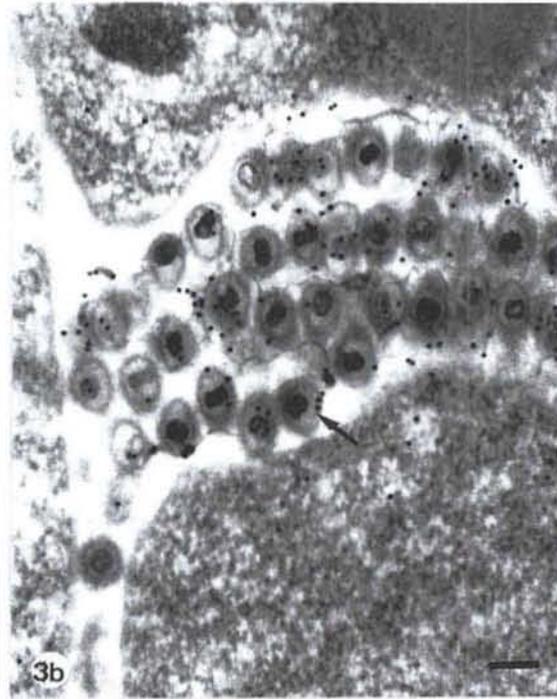
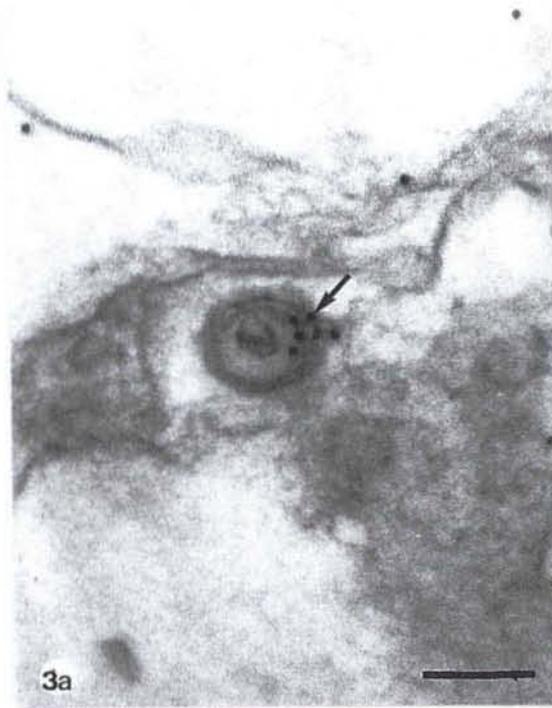
Protocole de purification du virus de type herpès observé chez les huîtres



Figures 3a, 3b, 3c et 3d

Marquages obtenus sur tissu de larves d'huître creuse (*Crassostrea gigas*) infectées au moyen d'un anticorps monoclonal spécifique de l'herpèsvirus du poisson chat.

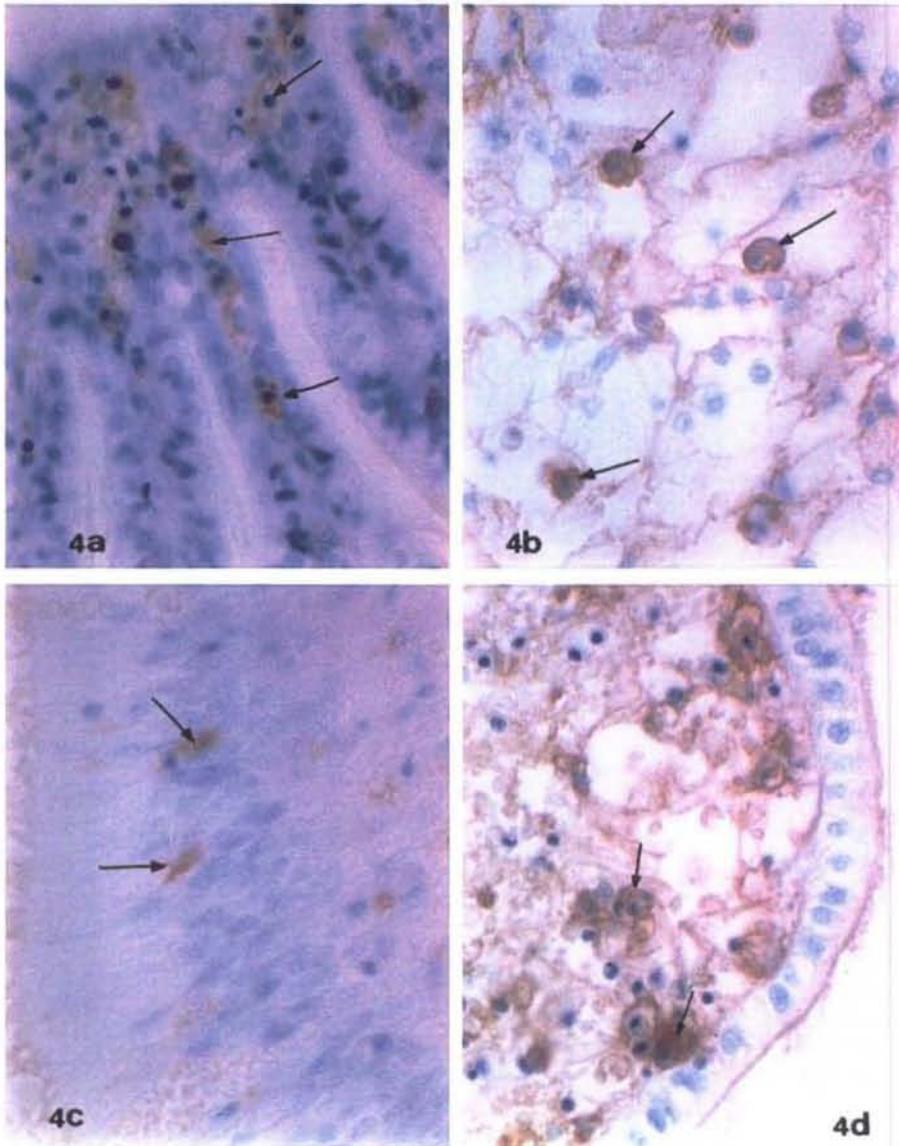
Cliché de microscopie électronique à transmission et technique de marquage à l'or colloïdal
3a - Particules d'or fixées (flèche) sur l'enveloppe d'un virus de type herpès infectant un larve d'huître creuse. 3b - Particules virales extracellulaire marquées (flèche). 3c - Particules virales enveloppées intracytoplasmiques marquées (flèche). 3d - Capsides (tête de flèche) et nucléocapsides (flèche) non marquées. Barre : 100 nm



Figures 4a, 4b, 4c et 4d

Immunomarquages (immunoperoxidase indirecte) sur coupes histologique de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, infecté par le virus de type herpès

- 4a - Coupe histologique de branchies (marquage de cellules du tissu conjonctif, flèches).
- 4b - Coupe histologique de manteau (marquage de cellules du tissu conjonctif, flèches)
- 4c - Coupe histologique d'intestin (marquage de cellules dans l'épithélium digestif, flèches)
- 4d - Coupe histologique de manteau (marquage de cellules du tissu conjonctif, flèches)



animaux infectés (contrôlés positifs en histologie et en microscopie électronique à transmission) et une absence de marquage pour des individus sains (non infectés par le virus de type herpès).

3 - Diagnostic de l'infection virale par PCR et au moyen de sondes nucléiques spécifiques

3. 1. - Extraction, clonage de l'ADN viral et analyse des clones

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

- De réaliser l'extraction de l'ADN viral et d'effectuer une première caractérisation de ce matériel par digestion avec des enzymes de restriction (EcoRI et BglII) et électrophorèse en gel d'agarose. Il a été ainsi possible de démontrer que les particules virales purifiées contiennent un acide nucléique de type ADN, double brin. Cet ADN a une taille d'environ 180 kpb (Figure 5). Ce résultat étaye l'hypothèse de l'appartenance de ce virus à la famille des *Herpesviridae*, virus à ADN double brin dont la taille du génome varie de 120 à 220 kpb.

- De cloner des fragments de l'ADN extrait des particules virales purifiées, après digestion par l'enzyme EcoRI. Le clonage a été réalisé en plasmide Bluescript II KS (-). Le choix d'un clonage en plasmide et non en phage a été dicté par des raisons pratiques. En effet, ce type de clonage permet d'obtenir relativement rapidement des sondes nucléiques adéquates pour réaliser des outils spécifique de diagnostic.

- Les plasmides recombinants ont été produits en bactéries *E. coli* XL1 Blue, ils sont au nombre de 300 environ. Quatre de ces fragments clonés ont été choisis en fonction de leur longueur différente, afin de vérifier leur spécificité. Les essais d'hybridation sur membrane ont donné des résultats positifs. En effet, les quatre fragments testés donnent un marquage net sur les ADN extraits de larves et de naissains infectés et pas de marquage sur de l'ADN extrait d'huîtres creuses adultes saines (Figure 6).

3. 2. - Développement de techniques de PCR

3. 2. 1. - Mise au point d'un protocole de détection de l'ADN viral par PCR

a. - Dessin d'amorces

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 a été cloné sous forme de fragments (fragments de restriction EcoRI) de 1 à 4 kpb. Parmi les fragments clonés, certains ont été séquencés partiellement (C. Delsert, IFREMER Sète). 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.

Figure 5

ADN extrait de particules virales purifiées - Analyse en gel d'agarose

- a. - Produits de digestion par BglII**
- b. - Produits de digestion par EcoRI**
- c. - ADN viral non digéré**
- d. - Marqueurs de taille (Eurogentec Marker 2)**

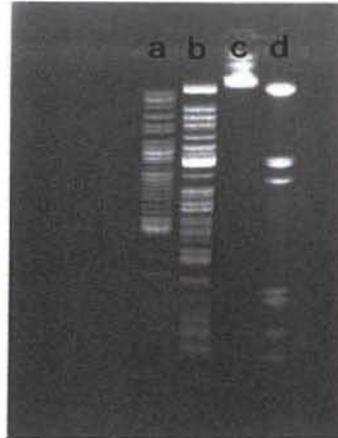
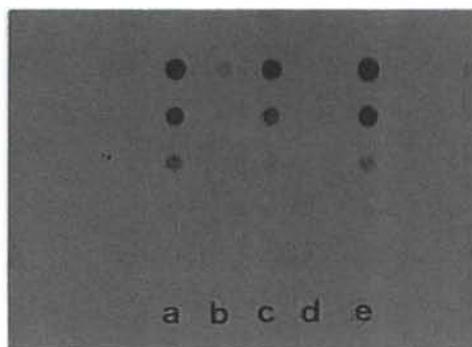
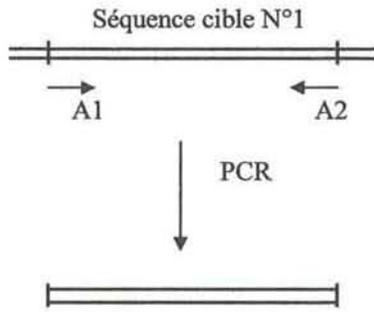


Figure 6

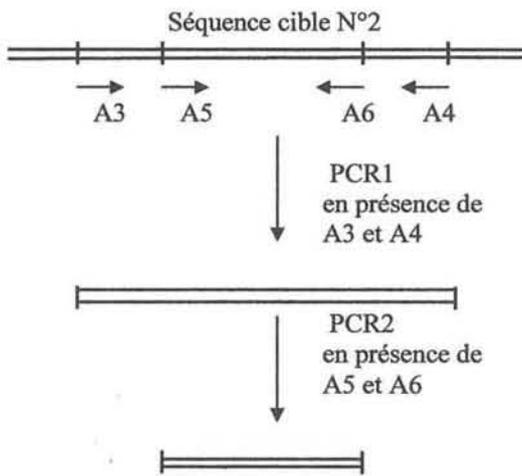
Test de la spécificité des clones obtenus en Southern blot

Hybridation d'un fragment cloné marqué à la peroxydase sur blot d'ADN extrait de naissain d'huître creuse infecté (a et b), de larves d'huître creuse infectées (c), d'huîtres creuses adultes saines (d) et de particules virales purifiées. 100 ng à 100 pg ont été déposés sur la membrane pour chaque échantillon



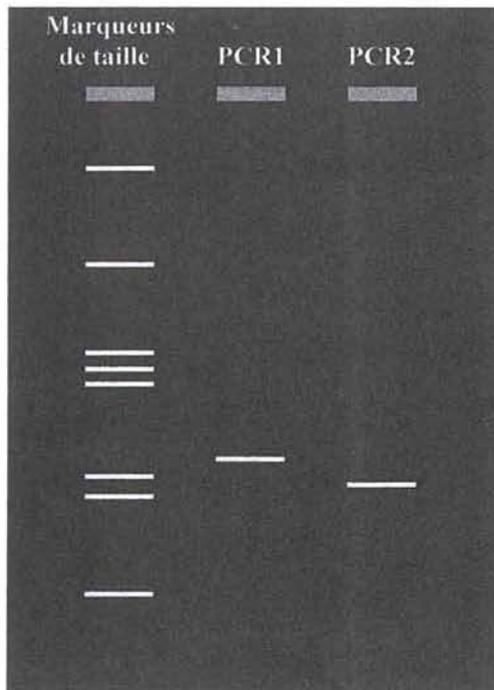


Le premier couple (A1+A2) testé n'a pas été retenu, car la sensibilité de l'amplification ne s'est pas avérée suffisante. De plus, du fait de leurs séquences, la spécificité de ces amorces n'était pas satisfaisante. En effet, si un fragment spécifique était amplifié à partir d'ADN viral, de façon intense, 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, 1 µl 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.

b. - Traitement des échantillons et réaction de PCR

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 (3. 2. 1. - c -) afin d'abaisser le seuil de détection 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 8).

◆ 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 10ng d'ADN viral, est réalisé (dernier tube).

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

Les résultats de la réaction de PCR1 sont analysés 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 µl des produits de la réaction de PCR1, dilués ou non, est utilisé pour réaliser la réaction de PCR2.

Les résultats de la réaction de PCR2 sont analysés 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. 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.

c. - 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.

◆ *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 1pg d'ADN viral en PCR2 et la détection de 10pg, 100pg et 1ng d'ADN viral 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 1pg d'ADN viral 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)

Quantité d'ADN viral/ Concentration des broyats de naissain (mg par µl)	1pg	10pg	100pg	1ng
6	-	-	-	+/-
2	-	-	-	+
1	-	+/-	+/-	+
0,5	+/-	+	+	+
0,1	+	+	+	+
0,05	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+
0 - Témoin	+	+	+	+

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

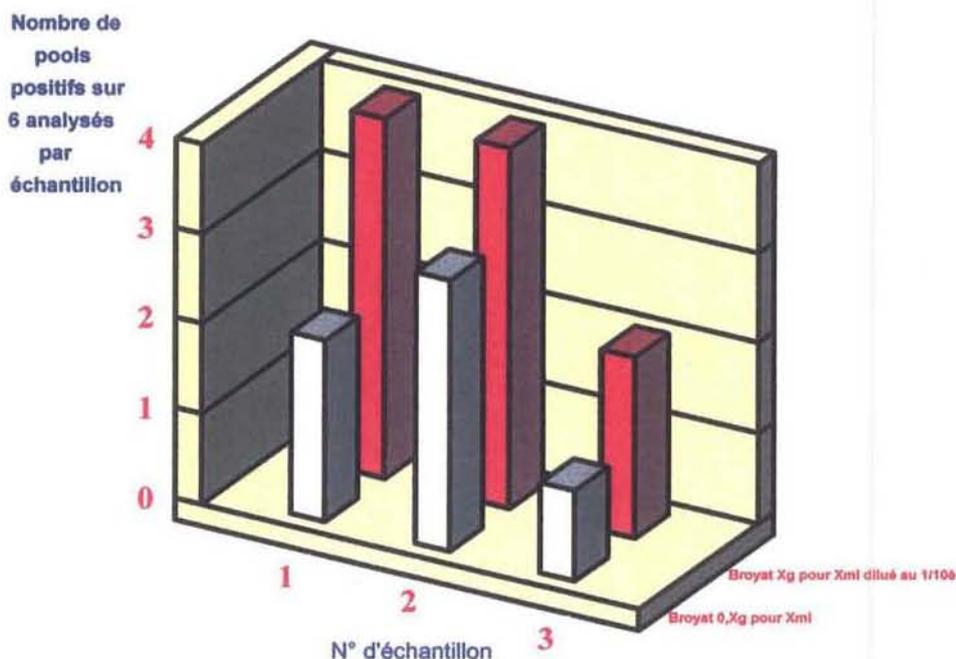
Pour limiter l'effet inhibiteur des surnageants de broyat au cours de la réaction de PCR et obtenir une amélioration de la détection de l'ADN viral d'un facteur de 10 000 à 100 000, il semblait donc nécessaire de limiter la quantité de tissus dans les tubes.

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

Figure 7

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

◆ 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 1pg d'ADN viral)

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

◆ 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)**

Quantité d'ADN viral/ Quantité d'ADN polymérase par tube PCR	1fg	10fg	100fg	200fg	500fg	1pg	10pg
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)**

Quantité d'ADN viral/ Quantité d'ADN polymérase par tube PCR	10fg	100fg	200fg
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)**

Quantité d'ADN viral/ Quantité d'ADN polymérase par tube PCR	200fg	500fg
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 1pg d'ADN viral - 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.

Figure 8

Améliorations apportées au protocole de PCR (nested 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 500fg d'ADN viral

* 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)

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 500fg d'ADN viral) 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).

◆ *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.

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 8. 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.

d. - Contrôle de la spécificité des amorces A3/A4 et A5/A6

Une collection d'ADNs viraux, correspondant à différents virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*, a été réalisée. Les ADNs 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'ADNs génomiques, extraits de différents virus produits sur culture cellulaire. Elle est composée de virus d'origines diverses, pathogènes pour l'homme ou les poissons (Tableau 8).

La spécificité des réactifs de PCR (amorces A3/A4 et A5/A6) dans les conditions protocolaires (protocole amélioré) a été testée à partir de ces différents ADNs, au fur et à mesure de leur disponibilité. Ainsi, aucune réaction croisée n'a pu être visualisée à partir des ADNs provenant de HSV1, HSV2, HCMV, EBV, HHV6, CCV et OMV.

Tableau 8

Origine des ADNs viraux disponibles à La Tremblade

Designation	Nom vernaculaire	Hôte	Sous famille	Type de génome
Human herpes virus 1 (HHV1)	Herpes simplex virus type 1 (HSV1)	Homme	α	E
Human herpes virus 2 (HHV2)	Herpes simplex virus type 2 (HSV2)	Homme	α	E
Human herpes virus 4 (HHV4)	Epstein Barr virus	Homme	γ	C
Human herpes virus 5 (HHV5)	Cytomegalovirus (CMV)	Homme	β	E
Human herpes virus 6 (HHV6)		Homme	β	A
Ictalurid herpes virus 1	Channel catfish virus (CCV)	Poissons : <i>Ictaluridae</i> (<i>Ictalurus punctatus</i>)	Supposé α	aucun*
Salmonid herpes virus 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

e. - Analyses d'échantillons d'huître effectuées en PCR

Les analyses concernent des lots d'huître (57 lots) ayant présenté des mortalités au cours de l'année 1996 et provenant des secteurs de Marennes-Oléron (Charente Maritime) et de la Baie de Bourgneuf (Vendée).

Les résultats obtenus tendent à confirmer la corrélation entre mortalité et détection possible d'ADN viral par PCR, pour les lots de naissain (Figures 9a et 9b). Cependant, pour certains lots présentant de fortes mortalités, la technique de PCR donne des résultats négatifs. Pour certains de ces lots, une explication des mortalités peut être facilement trouvée (problème zootechnique, etc.). Par ailleurs, les analyses en PCR donnent pour certains échantillons, hors mortalité, un résultat positif. Pour ces échantillons, il est possible que le prélèvement ait été réalisé en début d'infection, en l'absence de mortalité déclarée.

Figure 9a

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

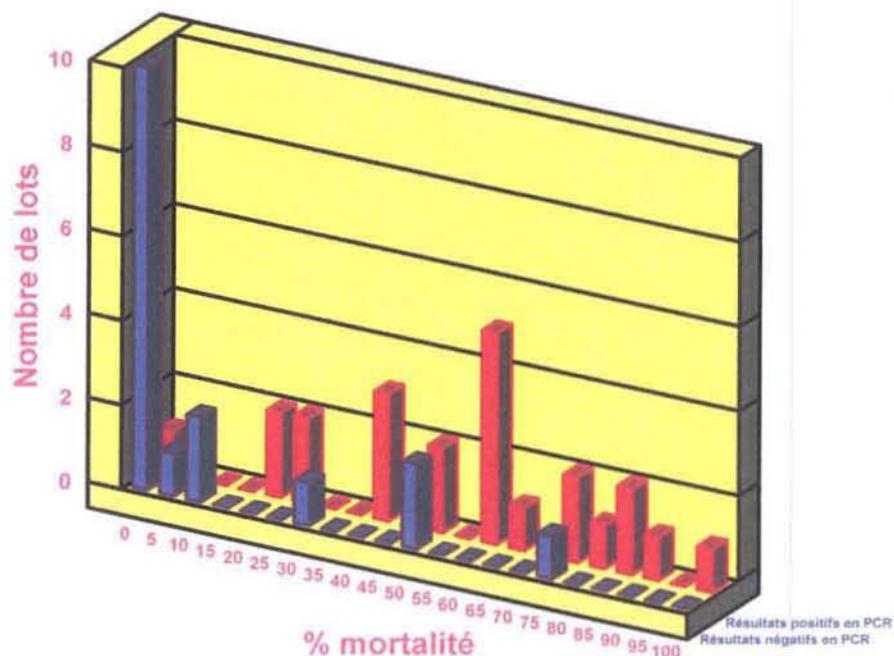
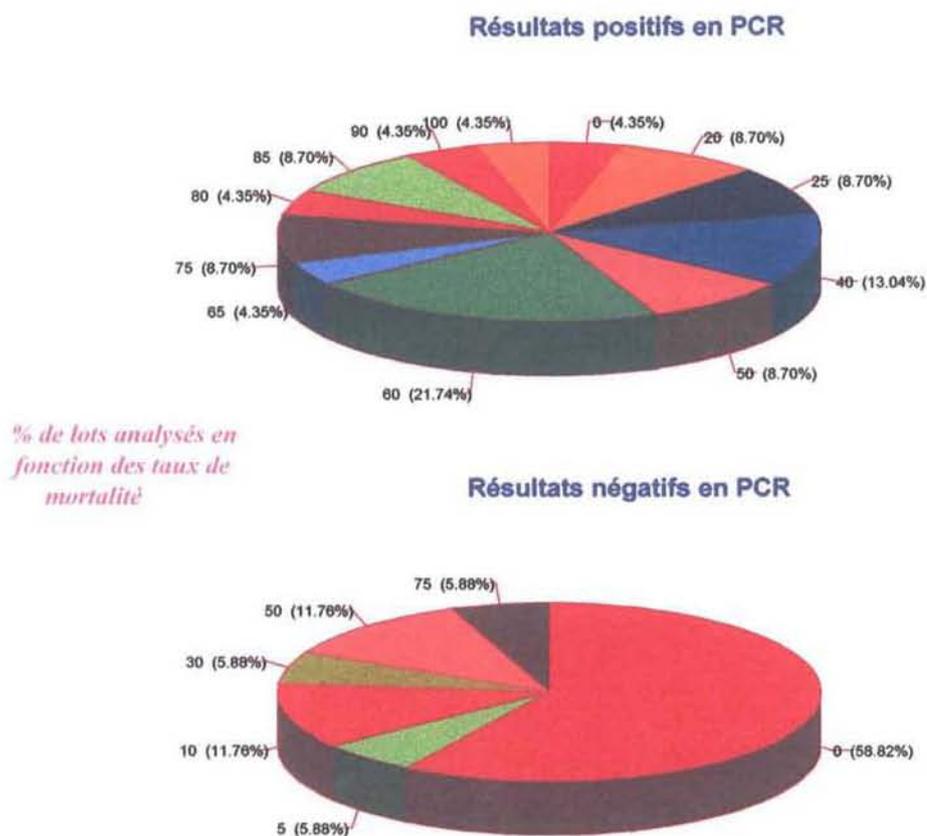


Figure 9b

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



Une première analyse statistique a été réalisée pour les résultats concernant 40 lots analysés. Ainsi, aussi bien le test du χ^2 qu'un test de comparaison de moyennes montrent de manière significative une forte corrélation entre mortalité et détection d'ADN viral par la technique de PCR. En effet, la valeur du χ^2 est de 16,9 (Tableau 9). Cette valeur est supérieure à 10,8 (ddl =1 et $\alpha = 0,001$). Les différences observées entre lots à mortalité et sans mortalité, concernant les résultats des analyses réalisées en PCR sont significatives.

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

Tableau 9

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

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

Ces résultats ne permettent en aucun cas de conclure à une relation de cause à effet entre mortalité observée et détection possible d'ADN de virus de type herpès par la technique de PCR. Seuls les essais de reproduction de l'infection virale qui sont en cours au laboratoire de La Tremblade permettront de trancher et de savoir si le virus de type herpès peut être ou non un agent causal de mortalité. De plus, il est important de rappeler que nous avons utilisé des valeurs de pourcentages de mortalité pour réaliser des comparaisons, mais que ces valeurs correspondent à une donnée ponctuelle dans le temps et que par ailleurs, leur source n'est pas toujours identique (professionnels, laboratoires "préleveurs", comptage à réception des échantillons au laboratoire de La Tremblade).

3. 2. 2. - Définition et test de nouvelles amorces pour la détection en PCR du virus de type herpès infectant les huîtres

La collaboration, entamée en 1996 avec A. Davison du Medical Research Council de Glasgow, a permis d'aboutir à l'obtention de nouvelles informations sur la séquence de fragments clonés d'ADN de virus de type herpès infectant les huîtres.

a. - Dessin des amorces

Parmi les fragments séquencés, le fragment le plus long (1089 paires de bases) a été retenu pour construire de nouvelles amorces pour la PCR. En effet, une des voies possibles pour améliorer la technique de PCR existante, utilisée pour le diagnostic du virus de type herpès, était d'obtenir des amorces présentant une plus grande spécificité pour l'ADN viral que celle de amorces déjà utilisées. Le fragment cloné retenu a été sélectionné sur la base de son absence d'homologie flagrante avec les séquences existantes dans les banques de données. Il était ainsi possible d'estimer que la séquence de ce fragment était propre au virus et pouvait servir à dessiner de nouvelles

amorces. Ainsi trois couples d'amorces ont été définis en utilisant un site sur le Web (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>), à partir de la séquence fournie par A. Davison :

- ❖ OHV1/OVH2 (taille du fragment attendu 765 pb).
- ❖ OHV3/OVH4 (taille du fragment attendu 896 pb).
- ❖ OHV5/OVH6 (taille du fragment attendu 780 pb).

b. - Sélection des amorces

Les trois couples d'amorces (OVH1/OVH2, OHV3/OHV4 et OHV5/OHV6) ont été testés, en utilisant 10 ng et 0.5 pg d'ADN viral extrait de particules purifiées par tube de réaction, soit respectivement 5×10^7 et 2500 génomes viraux, dans les conditions de PCR définies préalablement au laboratoire de La Tremblade. Cependant, dans ce cas, une seule réaction de PCR est réalisée. Il s'agit de simple PCR et non de nested PCR.

Les trois couples d'amorces testés permettent d'obtenir, après 35 cycles d'amplification, des produits de PCR détectables en gel d'agarose aussi bien pour 5×10^7 génomes viraux que pour 2500 (Figure 10). Les fragments amplifiés obtenus possèdent la taille attendue. Par ailleurs, aucune autre bande n'est observée pour les trois couples d'amorces utilisées indiquant l'absence d'hybridation non spécifique (Figure 10).

Le couple OHV3/OHV4 a été retenu pour les expériences ultérieures dans la mesure où la bande détectée sur gel d'agarose pour 2500 génomes viraux était plus nettement lisible que pour les amorces OHV1/OHV2 et OHV5/OHV6 ainsi que pour les amorces A5/A6 en PCR2 (Figure 10).

c. - Contrôle de la spécificité des amorces OHV3/OHV4

La spécificité des amorces OHV3/OHV4 a été vérifiée en utilisant des échantillons d'ADN d'huîtres creuses saines. Dans ce cas, aucune bande n'est observable en gel d'agarose indiquant que les amorces utilisées ne s'hybrident pas sur l'ADN d'huître.

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, de la station INRA de Tours-Nouzilly, du Medical Research Council (Glasgow) et de l'Université de Californie (Davis). Cette collection est composée d'ADN génomiques, extraits de différents virus. Elle est composée de virus d'origines diverses, pathogènes pour l'homme, les oiseaux, les poissons ou les batraciens.

Aucune réaction croisée n'a pu être visualisée à partir des ADN provenant de HSV1, HSV2, HCMV, EBV, HHV6, MDV (Marek Disease Virus), CCV, OMV et FV4 (Frog virus 4). En effet, les amorces OHV3 et OHV4 ne permettent pas visualiser de bandes lorsque ces ADN sont utilisés.

d. - Définition du seuil de détection

Au vu des résultats obtenus avec les amorces OHV3/OHV4 pour 0.5 pg d'ADN viral, des expériences ont été réalisées afin de définir le seuil de détection correspondant à ces amorces (quantité minimale d'ADN viral détecté de façon systématique). Il est ainsi possible d'observer des bandes nettes en gel d'agarose lorsque 100fg, 20fg et 10fg d'ADN viral sont distribués dans les tubes de PCR (Figure 11) et cela de façon systématique (5 tubes positifs sur 5). Par ailleurs, des bandes de faible intensité mais détectables sont également obtenues lorsque 5fg et 1fg d'ADN viral sont utilisés par tube de réaction (Figure 11). De la même manière que pour les quantités plus importantes d'ADN viral, l'obtention de produits de PCR spécifiques est systématique (5 tubes positifs sur 5).

Le seuil de détection en PCR2 pour les couples d'amorces A3/A4 et A5/A6 utilisés dans un protocole de nested PCR est de 0.5pg d'ADN viral. La détection de l'ADN viral en dessous de ce seuil est possible, mais aléatoire avec ces amorces. Les amorces OHV3/OHV4 permettent d'abaisser le seuil de détection de manière significative, c'est à dire d'un facteur de plus de 50 (de 50 à 500) et cela en ne réalisant qu'une seule réaction de PCR.

e. - Répétabilité

Afin de vérifier si les résultats obtenus pouvaient être répétés, une première expérience a été réalisée dans laquelle 27 tubes contenant 10fg d'ADN viral et 27 tubes Témoin négatif (ne contenant pas d'ADN viral, mais de l'eau bidistillée) ont été traités en PCR, en utilisant les amorces OHV3/OHV4. Les témoins négatifs et les tubes contenant l'ADN viral sont systématiquement alternés au cours de la préparation de la réaction de PCR, afin de vérifier s'il est possible de travailler sans contamination majeure. Les résultats obtenus montrent la présence du fragment de taille désiré pour 25 des 27 tubes contenant l'ADN viral (10fg) et pour aucun des tubes Témoin négatif. Cette expérience indique que le protocole de PCR mis au point au laboratoire de La Tremblade associé à l'utilisation des amorces OHV3/OHV4 permet de réduire de façon répétable le niveau de détection de l'ADN viral par rapport aux amorces A3/A4 et A5/A6.

f. - Essais de nested PCR

Des amorces internes (OHV13/OHV14) ont été dessinées au sein du fragment amplifié par OHV3/OHV4. Les tests réalisés, en utilisant le protocole de nested PCR mis au point avec les amorces A3/A4 et A5/A6, ont permis de mettre en évidence des problèmes de contaminations. En effet, il a été possible de détecter dans les témoins négatifs (ne contenant que de l'eau bidistillée) le fragment attendu. L'extrême sensibilité de la réaction de PCR1 avec les amorces OHV3/OHV4 fait que les contaminations sont très facilement observées en PCR2 (présence de contaminations à très faible niveau et non détectables dans les tubes de PCR1 et révélation de ces contaminations en PCR2). Devant, ces difficultés et la grande sensibilité de la PCR avec les amorces OHV3/OHV4, il a été estimé que la nested PCR n'était pas une voie à privilégier dans ce cas.

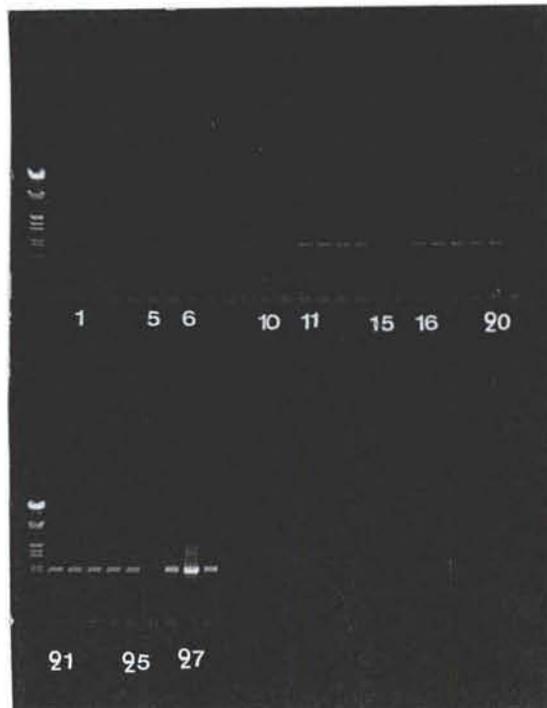
Figure 10

Test des amorces OHV1/OHV2, OHV3/OHV4 et OHV5/OHV6 sur ADN viral extrait de particules virales purifiées (1 μ l d'échantillon et 2.5 unités d'ADN polymérase). a, b et c : 10 ng d'ADN viral (a : OHV1/OHV2, b : OHV3/OHV4 et c : OHV5/OHV6) ; d, e et f : 0,5 pg d'ADN viral (d : OHV1/OHV2, e : OHV3/OHV4 et f : OHV5/OHV6) ; g : 0,5 pg d'ADN viral avec A3/A4 et A5/A6 ; h : 10 ng d'ADN viral avec A3/A4 et A5/A6.



Figure 11

Définition du seuil de détection de l'ADN viral extrait de particules purifiées (1 μ l d'échantillon et 2.5 unités d'ADN polymérase). 1 à 5 : 1 fg d'ADN viral, 6 à 10 : 5 fg, 11 à 15 : 10 fg, 16 à 20 : 20 fg, 21 à 25 : 100 fg, 26 et 28 : 0,5 pg et 27 : 10 ng d'ADN viral.



g. - Analyse comparative d'échantillons de larves d'huître

Des échantillons de larves d'huître creuse et d'huître plate, prélevés entre 1992 et 1997 et conservés congelés à -20°C, ont été analysés en utilisant les amorces A3/A4 et A5/A6 avec le protocole de nested PCR défini au laboratoire et les amorces OHV3/OHV4 dans une simple PCR (une seule réaction). Les examens réalisés montrent que 9 échantillons sur 16 sont positifs en PCR2 lorsque les amorces A3/A4 et A5/A6 sont utilisées alors que 14 échantillons sur 16 le sont pour le couple d'amorces OVH3/OHV4 (Figure 12).

3. 3. - Développement de sondes nucléiques spécifiques (hybridation *in situ*)

La collaboration, entamée en 1996 avec le Dr. A. Davison du Medical Research Council de Glasgow (Ecosse), a permis d'aboutir à l'obtention de nouvelles informations sur la séquence de fragments clonés d'ADN de virus de type herpès infectant les huîtres. Parmi les fragments séquencés, le fragment le plus long (1089 paires de bases) a été retenu pour construire de nouvelles amorces pour la PCR. Le fragment cloné retenu a été sélectionné sur la base de son absence d'homologie flagrante avec les séquences existantes dans les banques de données. Trois couples d'amorces ont été définis en utilisant un site sur le Web (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>), à partir de la séquence fournie par A. Davison : OHV1/OVH2 (taille du fragment attendu 765 pb), OHV3/OVH4 (taille du fragment attendu 896 pb) et OHV5/OVH6 (taille du fragment attendu 780 pb).

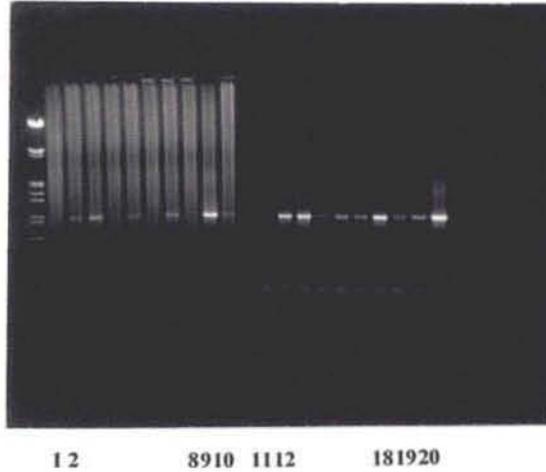
Le couple OHV3/OHV4 a été retenu pour préparer une sonde nucléique marquée à la digoxigénine dans la mesure où la bande détectée sur gel d'agarose 0.5pg d'ADN viral était plus nettement lisible que pour les amorces OHV1/OHV2 et OHV5/OHV6 ainsi que pour les amorces A3/A4 et A5/A6 en nested PCR.

3. 3. 1. - Obtention d'une sonde nucléique marquée à la digoxigénine par PCR

Une sonde marquée à la digoxigénine a été produite en utilisant des nucléotides particuliers (dUTP digoxigénine) dans une réaction de PCR utilisant les amorces OHV3/OHV4 (Figure 13). Dix picogrammes d'ADN viral sont utilisés par tube de réaction.

Figure 12

Analyse comparative d'échantillons de larves d'huître. 1 : témoin négatif ; 2 à 8 : échantillons de larves, produits de PCR2 après nested PCR (amorces A3/A4 et A5/A6) ; 9 et 10 : témoins positifs 10 ng et 0,5 pg d'ADN viral (A3/A4 et A5/A6) ; 11 : témoin négatif ; 12 à 18 : échantillons de larves, produits de PCR avec OHV3/OHV4 ; 19 et 20 : témoins positifs 10 ng et 0,5 pg d'ADN viral (OHV3/OHV4).



3. 3. 2. - Test de spécificité en Southern blotting

La sonde ainsi obtenue a été testée en Southern blotting (transfert des ADN sur membrane de Nylon) sur le fragment amplifié non marqué et produit en PCR à partir d'ADN viral extrait de particules purifiées et sur les fragments amplifiés à partir d'échantillons de larves infectées. Il est ainsi possible d'observer un marquage spécifique (Figure 14).

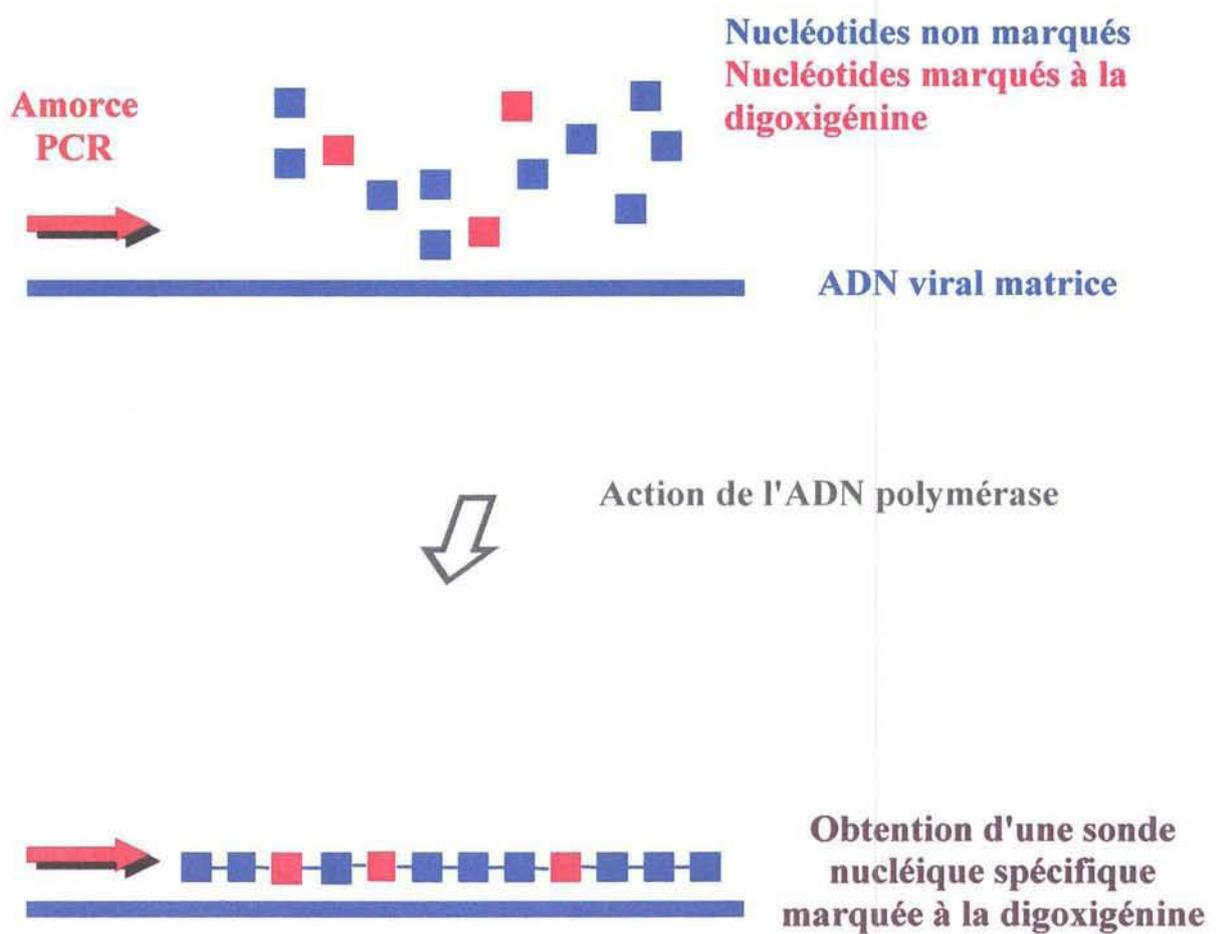
Figure 14

Test de spécificité d'une sonde marquée à la digoxigénine, fabriquée en PCR en utilisant les amorces OHV3/OHV4. Hybridation sur membrane a : fragment d'amplification obtenu à partir de larves d'huître creuse infectées ; b et c : fragments d'amplification obtenus à partir de larves d'huître plate infectées ; d et e : fragments d'amplification obtenus respectivement à partir de 10 ng et 0,5 pg d'ADN viral.



Figure 13

Principe de production d'une sonde marquée à la digoxigénine par PCR

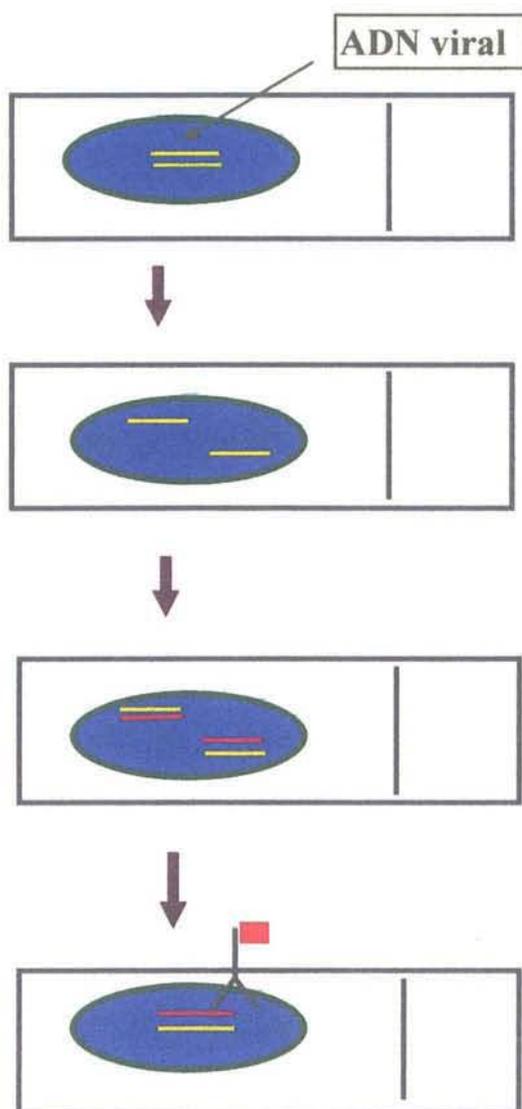


3. 3. 3 - Mise au point d'un protocole d'hybridation *in situ*

La sonde marquée à la digoxigénine, préparée par PCR avec les amorces OHV3/OHV4, a été testée en utilisant un protocole d'hybridation *in situ*, mis au point au laboratoire de La Tremblade (Figure 15). Il est ainsi possible d'observer un marquage nucléaire et cytoplasmique de certaines cellules sur coupes histologiques d'animaux (naissain) infectés (contrôlés en microscopie électronique à transmission) : cellules des tissus conjonctifs du manteau, des palpes labiaux et de la glande digestive (Figures 16a et 16b). Ce sont ces cellules dans lesquelles les particules virales sont détectées en microscopie électronique à transmission.

Figure 15

Principe de l'hybridation *in situ*



Réalisation de coupes histologiques (tissus fixés en Carson ou en Davidson)

Traitement par la chaleur à 94°C : dénaturation de l'ADN viral

Hybridation avec une sonde spécifique marquée à la digoxigénine

Révélation de la digoxigénine à l'aide d'anticorps spécifiques

Figure 16a

Glande digestive d'huître creuse infectée par le virus de type herpes. Réaction d'hybridation *in situ*. Marquage brun de cellules infectées dans le tissu conjonctif. Coloration de fond au bleu de UNNA. G x 800.

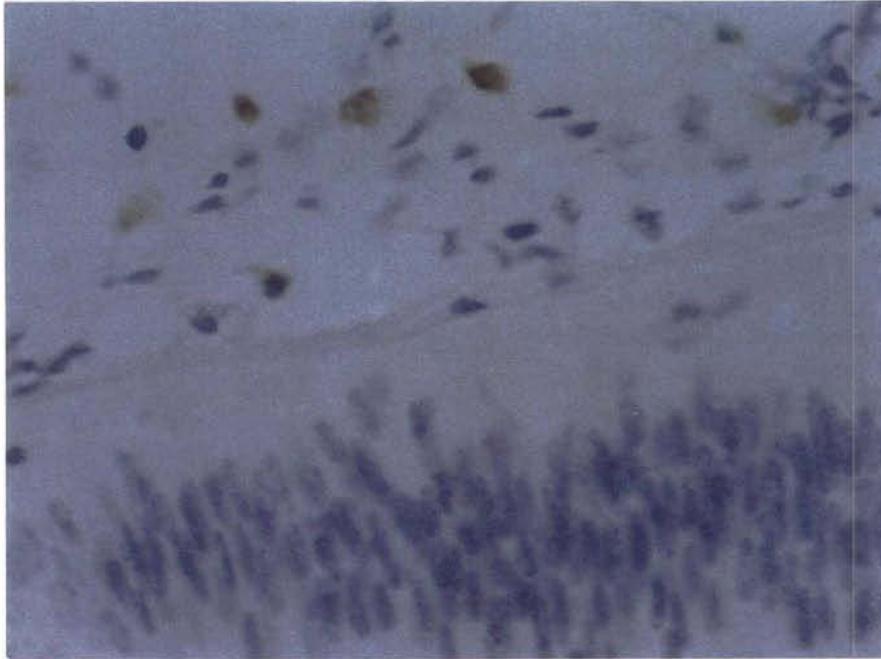
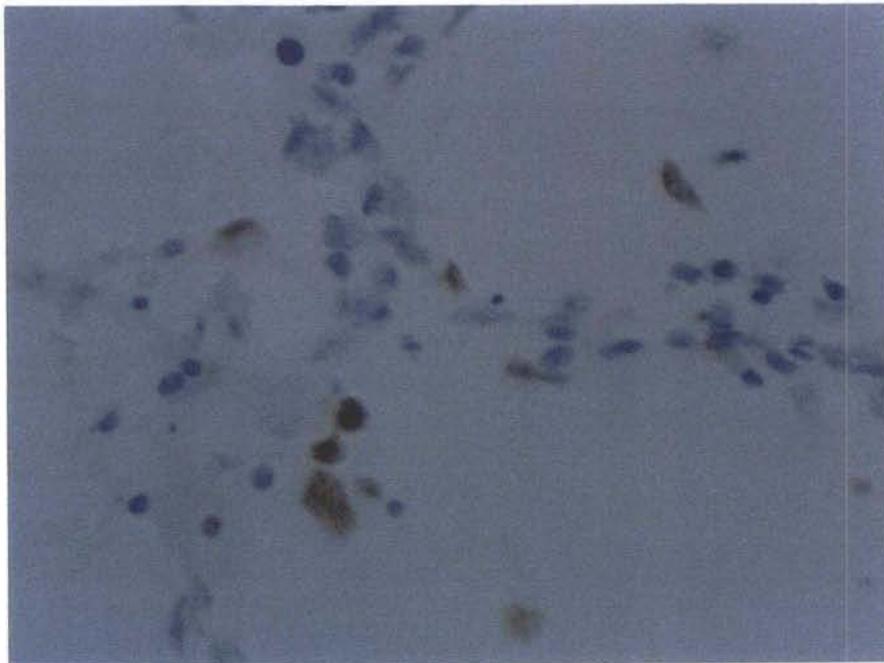


Figure 16b

Manteau d'huître creuse infectée par le virus de type herpes. Réaction d'hybridation *in situ*. Marquage brun de cellules infectées dans le tissu conjonctif. Coloration de fond au bleu de UNNA. G x 800.



4 - Essais de reproduction et d'induction de l'infection virale

4. 1. - Propagation du virus chez des larves de bivalves marins

4. 1. 1 - *Reproduction de l'infection virale chez des larves axéniques d'huître creuse, Crassostrea gigas, par inoculation de broyat de larves infectées ultrafiltré*

Divers essais ont été menés de 1996 à 1998, afin de reproduire au laboratoire l'infection virale chez les larves de différentes espèces de bivalves marins. Il est ainsi possible de reproduire de manière régulière l'infection virale chez des larves axéniques d'huître creuse (élevées en conditions stériles), par inoculation dans les ballons d'élevage de broyats de larves infectées (cf. 4. 2. 3. - Essais de reproduction de l'infection virale au stade naissain par inoculation de larves vivantes expérimentalement 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 et que le virus est un agent pathogène à part entière. En effet, dans ces essais, il est possible d'observer une mortalité totale des larves d'huître dans les jours qui suivent l'inoculation (deux à cinq jours post-inoculation).

4. 1. 2. - *Reproduction de l'infection virale chez des larves conventionnelles d'huître creuse, Crassostrea gigas, par inoculation de larves axéniques vivantes expérimentalement infectées*

Il est également possible d'infecter expérimentalement des larves conventionnelles (élevés en conditions non stériles), en inoculant dans les bacs d'élevage des larves axéniques infectées expérimentalement (cf. 4. 2. 3. - Essais de reproduction de l'infection virale au stade naissain par inoculation de larves vivantes expérimentalement infectées).

Ce type d'infection permet d'obtenir de plus grandes quantités d'animaux infectés. Par ailleurs, ces essais permettent de confirmer le pouvoir pathogène du virus de type herpès sur les larves d'huître creuse et sa transmission possible d'animaux infectés à animaux sains (transmission horizontale).

4. 1. 3. - *Essais de reproduction de l'infection à virus de type herpès chez des larves de palourde japonaise, Ruditapes philippinarum*

Des essais d'infection expérimentale de larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, par le virus de type herpès infectant les larves d'huître creuse ont été réalisés. En effet, des mortalités concomitantes de larves de palourde japonaise et d'huître creuse avaient été observées en 1991, en éclosierie. Le virus de type herpès avait alors été détecté dans les larves d'huître creuse, les larves de palourdes n'ayant elles, pas été analysées lors de cet épisode de mortalité. Par ailleurs, des mortalités concomitantes ont été observées chez des larves d'huître creuse et de palourde japonaise dans une éclosierie privée française au cours de l'été 1997. Dans ce cas, les analyses réalisées sur des échantillons (microscopie électronique à transmission et PCR) ont permis de détecter un virus de type herpès chez les deux espèces de bivalve.

Des larves de palourde âgées de huit jours (J8) ont été fournies par une écloserie privée. Elles ont été inoculées à J9 par des larves d'huître creuse axéniques vivantes, expérimentalement infectées (J3, 24 heures post infection). Les conditions expérimentales sont résumées dans la figure 17. Des prélèvements de larves et d'eau d'élevage ont été réalisés à J3, J4, J7 et J10 après l'infection pour une analyse en PCR. Les larves ont été tamisées sur des filtres en papier et rincées trois fois par 200ml d'eau de mer stérile avant d'être congelées à -20°C. L'eau d'élevage, passée sur un filtre en papier afin d'éliminer les larves, a été congelée à -20°C. Des prélèvements de larves ont été réalisés à J0, J3, J4, J7 et J10 après l'infection pour une analyse en microscopie électronique. Les larves recueillies sur un filtre en papier ont été fixées par le glutaraldéhyde 3% et conservées à 4°C avant d'être traitées selon une procédure classique.

L'ensemble des observations réalisées et des résultats d'analyse est donné dans le tableau 10.

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

L'analyse des échantillons en PCR a été réalisée uniquement pour les élevages inoculés par des larves infectées à J4, J7 et J10. La présence d'ADN viral est détectée dans les larves à J4, mais plus à J7 et J10. La présence d'ADN viral est détectée dans l'eau d'élevage à J4 et J7. A J10, la PCR ne permet plus de détecter l'ADN viral dans l'eau d'élevage. Ces résultats semblent indiquer une "disparition" de l'ADN viral présent dans les larves et, de façon plus tardive, dans l'eau d'élevage. Ce phénomène est interprété comme le reflet de l'évolution de l'infection dans les larves d'huître infectées (l'inoculum), plutôt que comme celui de l'infection des larves de palourde. L'ADN viral détecté à J4 post infection correspondrait alors à des larves d'huître infectées. Puis, les coquilles des larves d'huître se vident et, à J7 et J10, l'ADN n'est plus détecté dans les prélèvements de larves, celles ci étant rincées trois fois par de l'eau de mer stérile. La détection d'ADN viral dans l'eau d'élevage à J4 et J7, mais plus à J10, correspond à cette interprétation.

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

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

Figure 17

Essais de reproduction expérimentale de l'infection à virus de type herpès chez les larves de *Ruditapes philippinarum*.

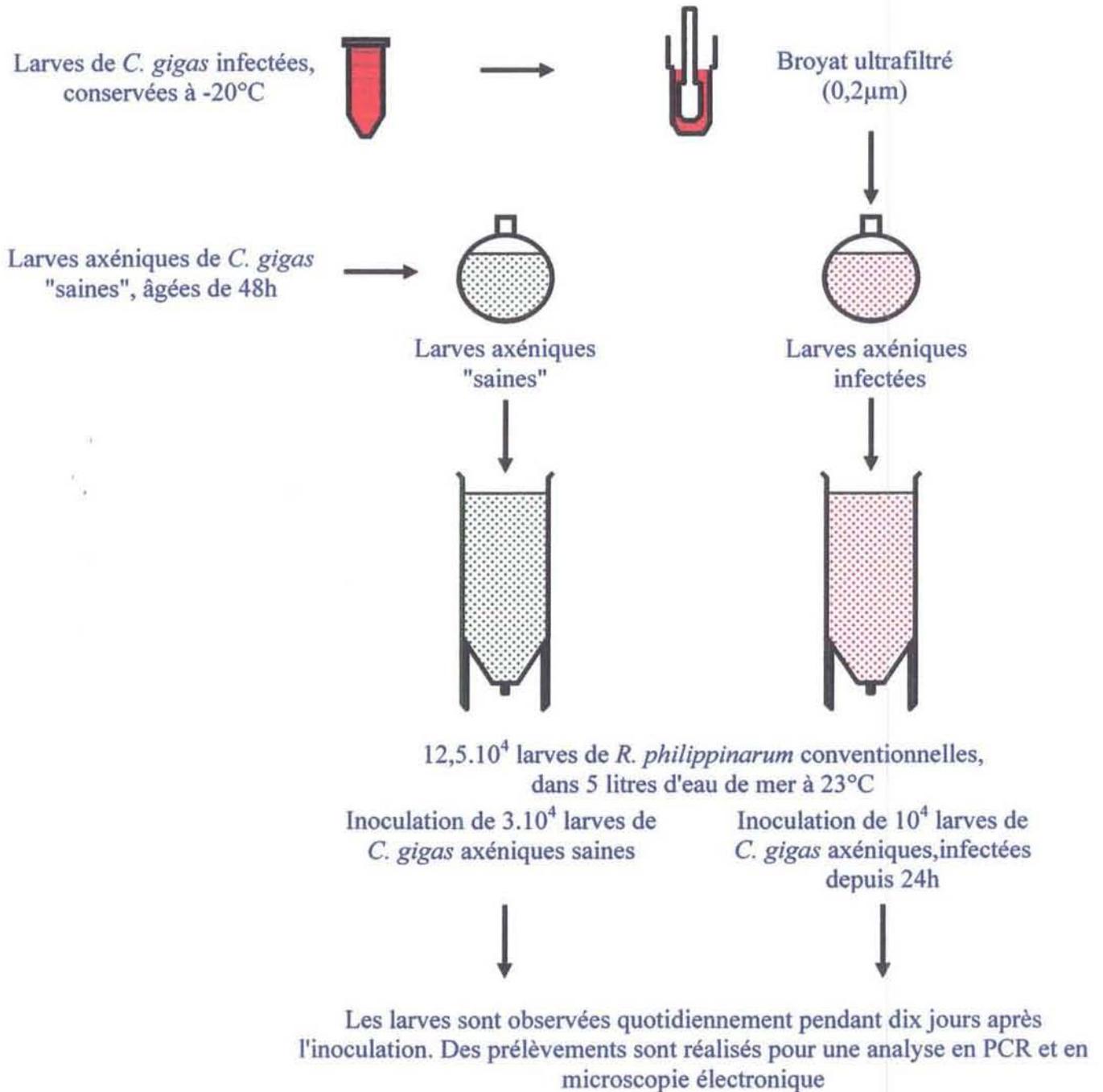


Tableau 10

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

Jour post-infection	Observations macroscopiques		Analyses en PCR				Observations en microscopie électronique	
	Inoculum larves saines	Inoculum larves infectées	Inoculum larves saines		Inoculum larves infectées		Inoculum larves saines	Inoculum larves infectées
			Larves	Eau	Larves	Eau		
J0	RAS	RAS	NF	NF	NF	NF	NF	NF
J3	RAS	RAS	NF	NF	NF	NF	NF	RAS (pas de noyaux typiques de l'infection à virus de type herpès, pas de particules virales)
J4	RAS	RAS	NF	NF	Positif en PCR2	Positif en PCR2	NF	
J7	RAS	RAS	NF	NF	Négatif en PCR2	Positif en PCR2	NF	
J10	RAS	90 à 100% mortalité	NF	NF	Négatif en PCR2	Négatif en PCR2	RAS	

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

4. 2. - Etude de la transmission de l'infection virale à des animaux adultes et au naissain

4. 2. 1. - Essais de reproduction de l'infection virale chez des huîtres creuses adultes, *Crassostrea gigas*, par inoculation intracardiaque de broyat de matériel infecté

Des essais d'infection expérimentale ont été effectués en 1995 sur des huîtres creuses adultes (*Crassostrea gigas*). Des broyats de matériel infecté (larves et naissain contrôlés comme positifs en microscopie électronique à transmission) ont été réalisés et ont servi à inoculer des huîtres adultes par injection dans la cavité péricardique. Pour une expériences, après une période de 10 à 15 jours d'acclimatation à température élevée (montée progressive jusqu'à 24-25°C) dans des bacs d'élevage de 50 litres, certains animaux ont reçu 50 µl de broyat ultrafiltré (0,22 µm) de larves ou de naissain infectés, d'autres individus ont été inoculé en utilisant des ultrafiltrats réalisés à partir de larves et de naissain indemnes. Enfin, 50 µl d'eau de mer filtrée à 0,22 µm ont été injectés à un troisième lot d'animaux.

Les mortalités ont été suivies quotidiennement pendant un mois. Pour une expérience donnée, les résultats obtenus ne montrent pas de différences significatives entre les lots infectés et les lots témoins négatifs pour les mortalités observées. Il semble que dans les conditions utilisées, l'injection de broyat ultrafiltré à des huîtres adultes ne permette pas d'induire une infection virale associées à la mort des animaux.

Par ailleurs, il est important de signaler qu'aucune quantification du virus présent dans les broyats utilisés dans ces expériences n'a pu être réalisée, étant donné l'absence de protocole technique adapté. En effet, aucune méthode n'est à l'heure actuelle disponible pour quantifier le nombre de particules virales infectieuses présentent dans un échantillon. Cela est en particulier du à l'absence de cultures cellulaires permettant de multiplier le virus *in vitro*. De ce fait, aucune information n'était disponible concernant le nombre de particules virales infectieuses injectées aux huîtres.

4. 2. 2. - Essais de reproduction expérimentale de l'infection virale au stade naissain chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* par balnéation en présence de broyat de matériel infecté

Des essais d'infection expérimentale ont été effectués en 1995 sur du naissain d'huître creuse (*Crassostrea gigas*). Des broyats de matériel infecté (larves et naissain contrôlés comme positifs en microscopie électronique à transmission) ont été réalisés et ont servi à infecter des juvéniles par balnéation. Pour une expériences, après une période de 10 à 15 jours d'acclimatation à température élevée (montée progressive jusqu'à 24-25°C) en bac de 50 litres et une exondation de quatre heures, certains animaux ont été mis au contact, sous un volume de trois litres, avec un broyat ultrafiltré (0,22 µm) de larves (soit 1,2 grammes par bac) ou de naissain infectés (soit 8 grammes par bac), d'autres individus ont été infectés en utilisant des ultrafiltrats réalisés à partir de larves et de naissain indemnes. Enfin, certains animaux n'ont subi aucun traitement.

Les mortalités ont été suivies quotidiennement pendant un mois. Pour une expérience donnée, les résultats obtenus ne montrent pas de différences significatives entre les lots infectés et les lots témoins négatifs pour les mortalités observées. Il semble que dans les conditions utilisées, la mise en contact avec des broyats ultrafiltré ne permette pas d'induire une infection virale associés à la mort des animaux.

Pour ces expériences, aucune quantification du virus présent dans les broyats utilisés n'a pu être également réalisée, étant donné l'absence de protocole technique adapté.

4. 2. 3. - Essais de reproduction expérimentale de l'infection virale au stade naissain chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* par mise en contact avec des larves vivantes expérimentalement infectées

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 18.

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).

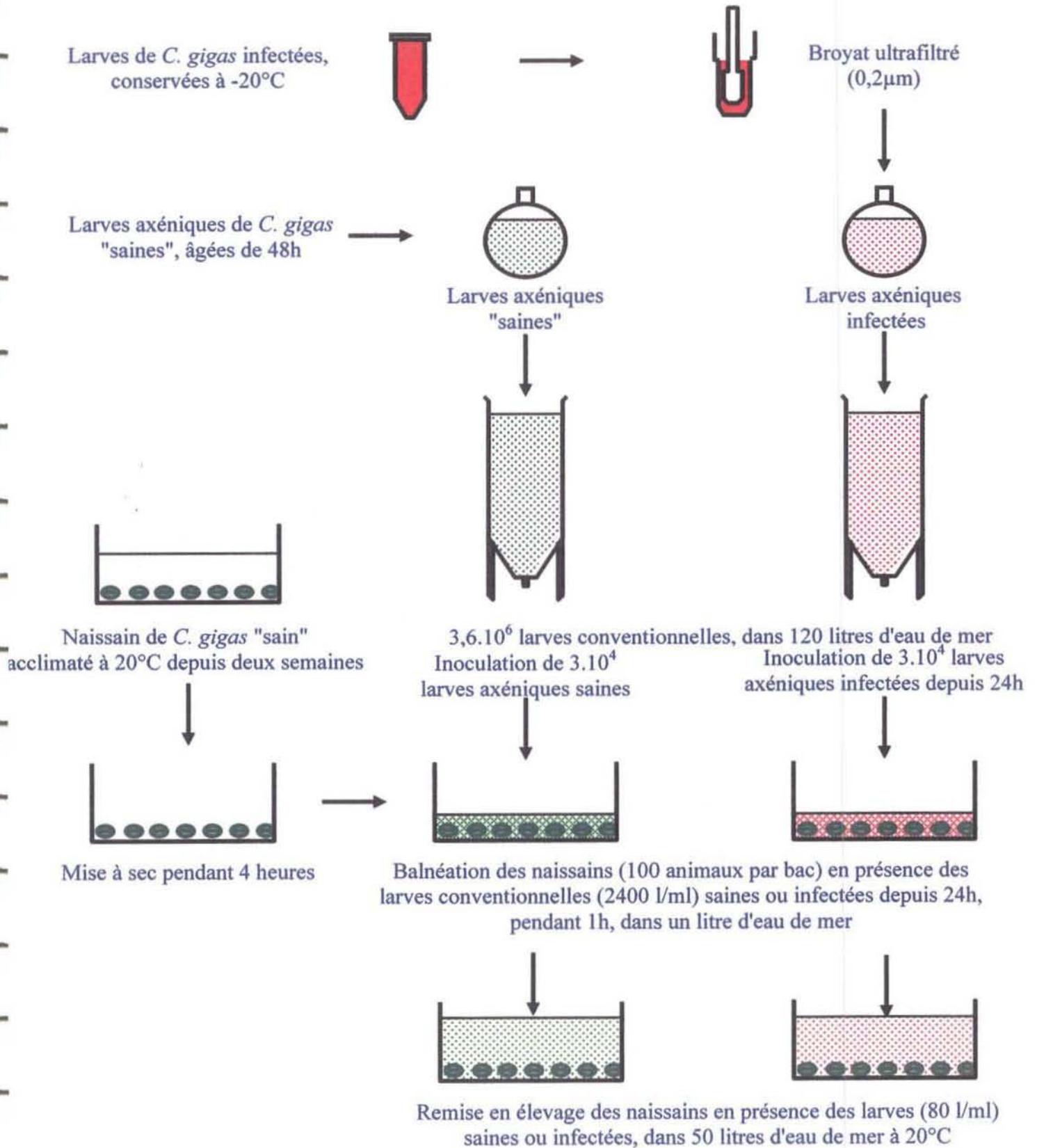
Au vu de ces résultats, les essais ultérieurs d'infection de naissain d'huître ont été réalisés par contact avec des larves infectées vivantes, produites expérimentalement (Figure 18). De cette façon, des particules virales infectieuses sont produites dans les tissus larvaires et sont libérées dans le 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.

a. - Essais réalisés en 1996

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 18

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



Les mortalités observées au cours de l'expérience sont représentées sur la Figure 19. 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 20, pour chaque bac expérimental. Un contrôle en histologie a été réalisé sur sept animaux positifs en PCR, afin de confirmer ou d'infirmier 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 11). Cette valeur est supérieure à 1,96. Les différences observées sont donc significatives.

Tableau 11

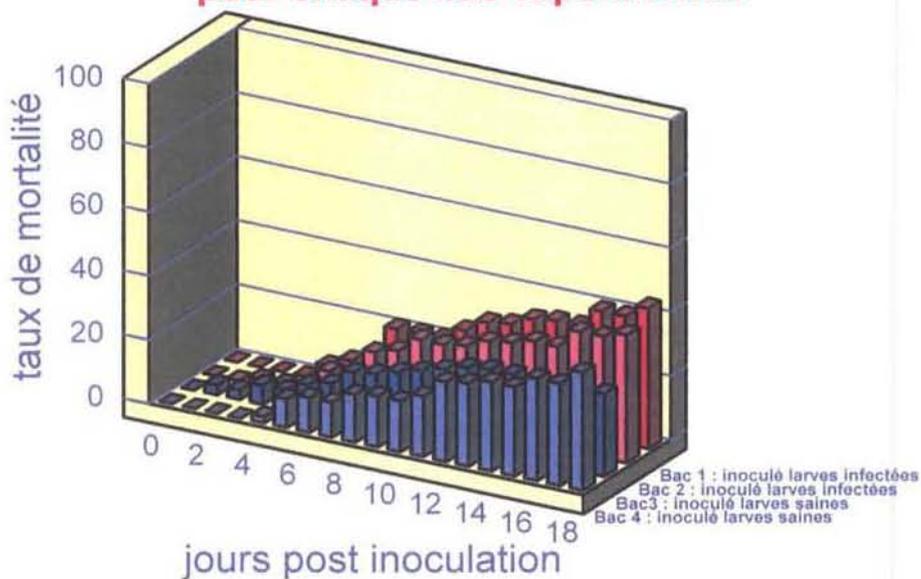
	Nombre d'animaux morts	Nombre d'animaux vivants	Total
Nombre d'animaux inoculés par des larves infectées	84	118	202
Nombre d'animaux inoculés par des larves saines	63	146	209
Total	147	264	411

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 12). 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.

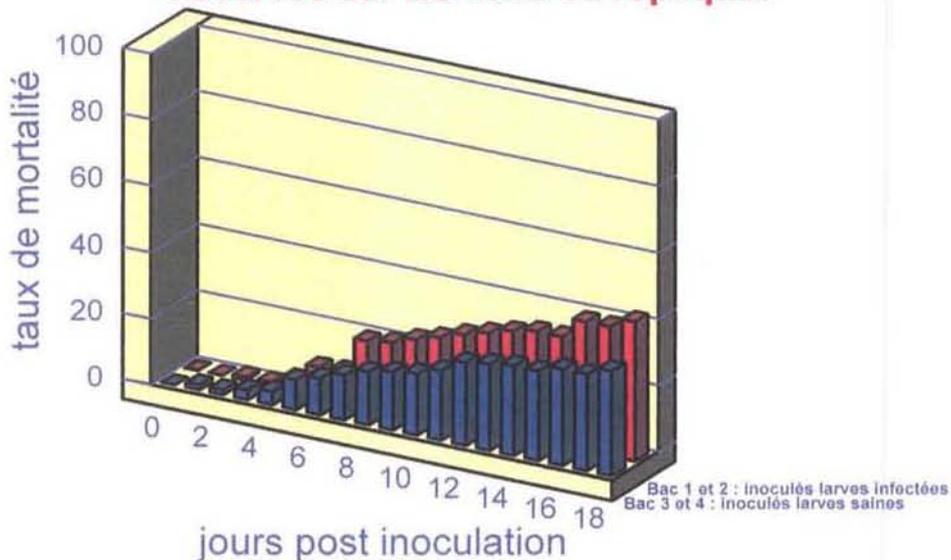
Figure 19

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

**Taux de mortalité cumulée
pour chaque bac expérimental**



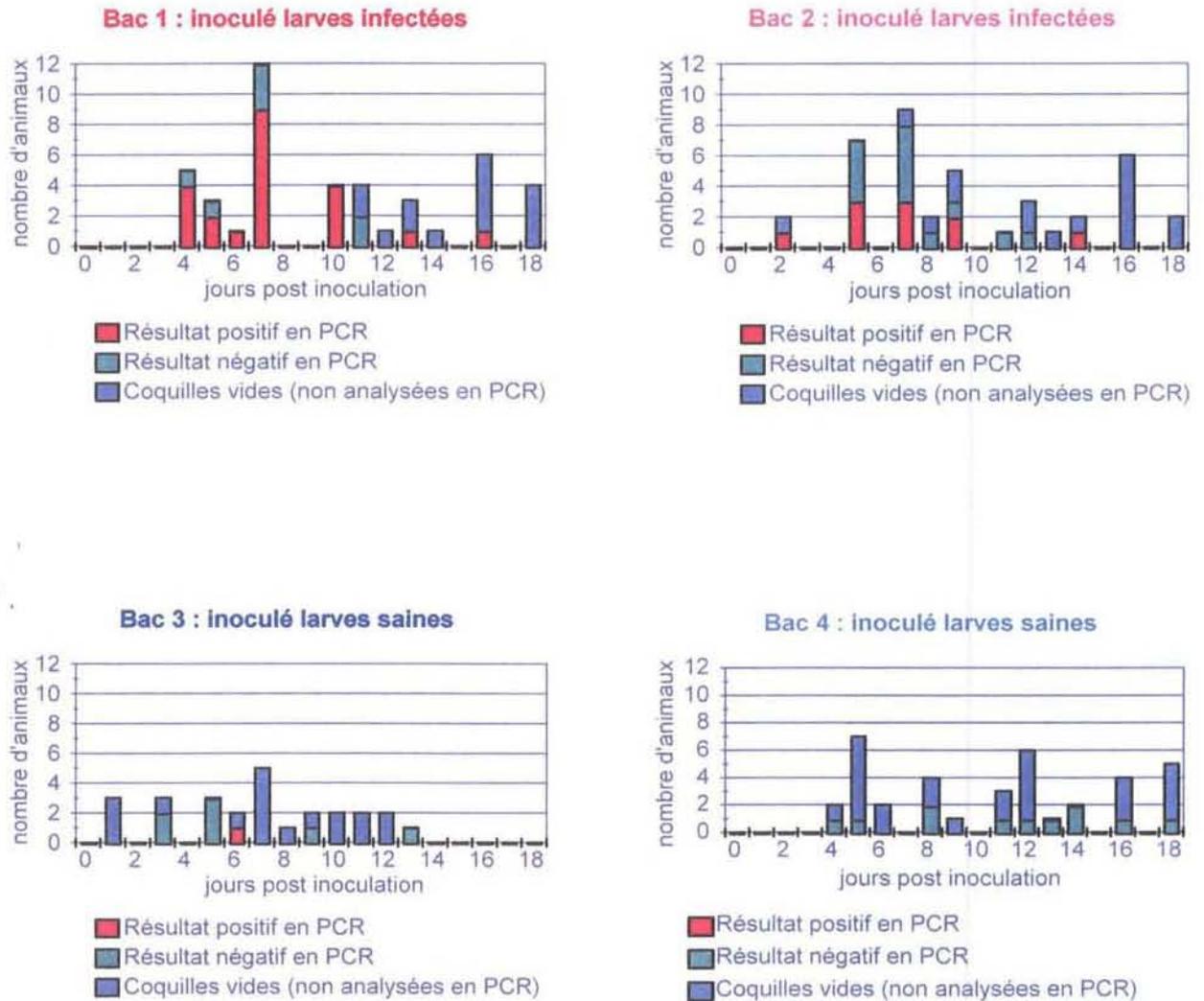
**Moyenne des taux de mortalité
observés sur les bacs en répliquat**



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 20

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.

Tableau 12

	Résultats positifs en PCR2	Résultats négatifs en PCR2	Total
Nombre de naissains inoculés par des larves infectées	32 <i>(24,75)</i>	22 <i>(29,25)</i>	54
Nombre de naissains inoculés par des larves saines	1 <i>(8,25)</i>	17 <i>(9,75)</i>	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.

b. - Essais réalisés en 1997

Cinq essais d'infection expérimentales de larves axéniques ont été réalisés en 1997. Les oeufs fécondés obtenus après fécondation en conditions stériles sont répartis dans des fioles ou des ballons contenant de l'eau de mer filtrée stérile. Après 24 heures, un ultrafiltrat de broyat de larves infectées est inoculé dans les fioles ou les ballons à infecter et on ajoute le même volume d'eau de mer filtrée stérile dans les fioles ou les ballons servant de témoins négatifs.

Les larves sont observées régulièrement, elles sont récupérées et analysées en PCR. Le tableau I reprend les différents essais réalisés. L'observation régulière des larves n'a pas montré de différence évidente entre les élevages infectés et les élevages servant de témoins négatifs. En particulier, aucune différence nette n'a été constatée en ce qui concerne la sédimentation des larves et les anomalies du velum. Seuls les essais 3 et 5 ont conduit à la réalisation d'analyses en PCR.

◆ Essai 3

Les surnageants obtenus après centrifugation des élevages à 3500 tours par minute pendant 15 minutes à 8°C et les surnageants obtenus après rinçage des larves avec de l'eau de mer filtrée stérile sont analysés en PCR. De même, les larves sont récupérées et traitées de façon à être examinées en PCR. Sur les trois fioles infectées, une seule présente des résultats positifs en PCR, et ceci pour les larves comme pour les surnageants. Les autres prélèvements, provenant des autres fioles infectées et des fioles non infectées, sont négatifs en PCR.

◆ Essai 5

Les larves des trois ballons sont récupérées et traitées afin d'être analysées en PCR. Les résultats sont tous négatifs.

Avant les essais d'infection de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, un "Point Zéro" a été établi. Au terme de la période d'acclimatation, on prélève cinq huîtres par bac. Les animaux provenant d'un bac sont regroupés et servent à la préparation d'un échantillon qui est analysé en PCR. Les analyses sont négatives pour l'ensemble des lots d'animaux (cinq).

Quatre essais d'infection de naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été tentés sur les mêmes animaux. Chaque essai comprend une fécondation en conditions stériles, l'infection des larves axéniques par inoculation d'ultrafiltrat de broyat de larves infectées, une ponte de larves conventionnelles et leur infection par inoculation des larves axéniques infectées. Enfin, la réussite de l'infection des larves conventionnelles conditionne la dernière étape, à savoir l'infection du naissain après sa mise en contact avec les larves conventionnelles infectées. A chaque étape des animaux infectés et des témoins négatifs sont utilisés : deux ballons de cinq litres d'eau de mer filtrée stérile pour les larves axéniques infectées et un ballon servant de témoin négatif ; deux bacs cylindro-coniques pour les larves conventionnelles infectées et un bac cylindro-conique servant de témoin négatif. Le déroulement de ces essais est repris dans le tableau suivant (Tableaux 13 et 14).

Tableau 13

	ESSAI 1	ESSAI 2	ESSAI 3	ESSAI 4	ESSAI 5
Fécondation					
Géniteurs	2 femelles 1 mâle	2 femelles 1 mâle	2 femelles 1 mâle	1 femelle 1 mâle	2 femelles 2 mâles
Volume de spermatozoïdes	10 ml	15 ml	20 ml	20 ml	10 ml
Matériel utilisé					
Larves infectées	10 fioles 200 ml	20 fioles 200 ml	3 fioles 200 ml	2 ballons 5 l	2 ballons 2,2 l
Témoins négatifs	5 fioles 200 ml	10 fioles 200 ml	3 fioles 200 ml	1 ballon 5 l	1 ballon 2,2 l
Densité de larves	50 larves/ml	50 larves/ml	50 larves/ml	50 larves/ml	100 larves/ml
Conditions d'élevage	Bain-marie 24°C	Bain-marie 24°C	Bain-marie 24°C		Antibiotiques
Ultrafiltrat					
Quantité de larves infectées broyées	50 mg lot 95-201.2	50 mg lot 95-201.2	60 mg lot 95-201.2	LARVES MORTES	Préparation de deux ultrafiltrats (U1 et U2) : 50 mg écloserie et 95-201.2 20 ml - 8 ml de U1 dans un ballon, 8 ml de U2 dans l'autre
Volume final	11 ml	11 ml	20 ml		
Volume inoculé	0,5 ml/fiole	0,5 ml/fiole	5 ml/fiole		
Réinfection éventuelle	100 mg du lot 95-201.2 dans 11 ml inoculation : 1 ml 48 h après 1 ^{ère} infection		50 mg de larves écloserie* dans 20 ml inoculation : 5 ml 7 jours après 1 ^{ère} infection		

* larves fraîches provenant de l'écloserie de IFREMER La Tremblade, contrôlées positives en PCR

Tableau 14

	ESSAI 1	ESSAI 2	ESSAI 3	ESSAI 4	ESSAI 5
Fécondation axénique Géniteurs Matériel Conditions d'élevage Densité larvaire	2 femelles et 1 mâle 3 ballons de 5 l Antibiotiques ¹ Rinçage des ovules ² 40 larves/ml	2 femelles et 1 mâle 3 ballons de 5 l Antibiotiques ¹ Rinçage des ovules ² 40 larves/ml	2 femelles et 1 mâle 3 ballons de 5 l Antibiotiques ¹ Rinçage des ovules ² 50 larves/ml	2 femelles et 1 mâle 3 ballons de 5 l Antibiotiques ¹ Rinçage des ovules ² 50 larves/ml	1 femelle et 1 mâle 3 ballons de 5 l Antibiotiques ¹ Rinçage des ovules ² 50 larves/ml
Infection des larves axéniques Quantité de larves infectées broyées Volume final Volume inoculé	J3 50 mg du lot 95-201.2 20 ml 9 ml	J3 100 mg lot 95-201.2 100 mg larves éclosion 20 ml pour chaque lot 7,5 ml des 2 ultrafiltrats	J2 50 mg lot 95-201.2 (autre échantillon ³) 20 ml 8 ml	J3 600 mg du lot 95-201.2 30 ml 11 ml	J2 150 mg de 4 lots ⁴ différents (600mg) 20 ml 6,5 ml
Ponte de larves conventionnelles Géniteurs Densité larvaire Infection	3 femelles et un mâle 180 larves/ml J3	Larves de l'éclosion IFREMER 40 larves/ml J4	2 femelles et 1 mâle 55 larves/ml J2	Larves de l'éclosion IFREMER 50 larves/ml J3 Traitement particulier ⁵	Larves de l'essai 4 réutilisées
Infection naissain Larves conventionnelles	J5	PAS DE MISE EN CONTACT	J6	PAS DE MISE EN CONTACT	
Date et durée des essais	23/05/97 au 12/06/97	16/06/97 au 01/07/97	01/07/97 au 08/07/97	19/07/97 au 24/07/97	24/07/97 au 09/08/97

Pour chaque essai, différents prélèvements ont été réalisés et analysés en PCR.

◆ Essai 1

Au cours de l'expérience, le naissain des bacs 6 et 7 a présenté des mortalités sur la période du premier essai (entre le 23/05/1997 et le 12/06/1997). L'analyse en PCR après traitement des individus ne permet pas de détecter de l'ADN viral. Les analyses en PCR n'ont été positives que pour le surnageant non ultrafiltré et ultrafiltré à 0,45µm de broyat de larves infectées.

◆ Essai 2

Le surnageant ultrafiltré de broyat de larves infectées est positif en PCR, tandis que non ultrafiltré,, de même que les prélèvements réalisés dans les ballons de larves axéniques et dans les bacs cylindro-coniques avant et après contact avec les larves axéniques. Cependant, les larves récupérées après filtration du contenu des bacs cylindro-coniques A et B apparaissent positives. Les larves conventionnelles n'ont pas été mises au contact du naissain pour cette expérience. Au cours de cette essai, aucune mortalité n'a été cependant observée dans les différents bacs de naissain.

◆ Essai 3

Les analyses en PCR montrent que ni le surnageant de broyat de larves infectées utilisées, ni les autres prélèvements réalisés ne sont positifs. Entre le 01/08/1997 et le 08/07/1997, aucune mortalité dans les bacs contenant le naissain n'a été observé. Aucune analyse n'a donc été réalisée en PCR.

◆ Essai 4

Les prélèvements réalisés dans les ballons de larves axéniques comme dans les bacs cylindro-coniques sont négatifs en PCR. Le surnageant de broyat de larves infectées non filtré et filtré à 0,45µm apparaît quant à lui, positif. Par ailleurs, des mortalité de naissain ont été observées au cours de cet essai dans le bac 9. Les analyses réalisées en PCR sont négatives.

Les cinq essais réalisés en 1997 n'ont pas permis d'observer des mortalités. Des lésions du velum sont visibles tant sur les larves axéniques des ballons infectés que sur les larves des ballons non infectés. De plus, aucun phénomène de sédimentation n'a pu être clairement observé. Parmi les analyses en PCR réalisées, seule une fiole infectée de l'essai 5 présente des résultats positifs. Cependant, il est difficile de savoir si l'ADN viral détecté provient des larves elles-mêmes ou de l'inoculum (broyat ultrafiltré) présent dans l'eau résiduelle qui entoure les larves. En effet, l'ADN viral est détecté en PCR dans l'échantillon de larves, mais également dans les différents surnageants récupérés après centrifugation et rinçages des élevages. On ne peut donc pas affirmer que ces larves axéniques étaient réellement infectées.

Les résultats obtenus peuvent s'expliquer par une perte de virulence du lot de larves utilisé pour réaliser les contaminations. Cet échantillon a été contrôlé positif en PCR avant d'entreprendre les essais. Cependant, la technique de PCR permet de détecter l'ADN viral, mais ne permet pas d'apprécier le pouvoir infectieux du virus : ADN contenu dans des particules virales intègres ou ADN libéré à partir de virions dégradés. De plus, le protocole de PCR utilisé ne permet d'obtenir qu'un résultat qualitatif et non pas quantitatif. Les décongélations et recongélations successives du lot de larves infectées ont pu altérer le virus et lui faire perdre son pouvoir infectieux.

Par ailleurs, la suspicion de l'existence de substances dans les fioles de culture cellulaire pouvant induire une inhibition de la PCR a conduit à l'utilisation de ballons en verre. Cependant, aucune différence significative n'a pu être observée entre les deux types d'élevage.

Enfin, la qualité des gamètes conditionnant l'obtention des larves en bon état et donc le succès de l'infection, le choix des géniteurs est primordial. Il a été possible d'observer la présence de grandes quantités de bactéries au niveau des gamètes pour l'ensemble des géniteurs utilisés. De ce fait, la nature axénique réelle des larves obtenues pourrait être remise en cause et expliquer ainsi l'absence de transmission de l'infection virale. En effet, tous les essais d'infection de larves conventionnelles réalisés jusqu'alors ont échoués lorsqu'un surnageant de broyat d'animaux contaminés était utilisé.

4.3 - Essais d'induction de l'infection virale

Des lots particuliers d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, issus d'écloseries/nurseries et ayant une histoire connue sont soumis à différents traitements pouvant induire un stress. Ainsi, certains lots ont subi une élévation de température et d'autre une manipulation de tri (tamassage). L'ensemble de essais réalisé est rapporté dans le Tableau 15. Les mortalités sont notées quotidiennement et des analyses sont réalisées en PCR sur les animaux mis en élevage (protocole de nested PCR avec les amorces A3/ A4 et A5/A6) pour la recherche d'ADN de virus de type herpès.

Il a été ainsi possible d'induire des mortalités (55 à 65%) sur des lots de naissain particuliers ayant subi des traitement par la chaleur ou de tamassage (Tableau 15). Les mortalités observées sont très fortement associées à la détection du virus de type herpès par la technique de PCR. L'ADN viral n'est pas détecté en l'absence de mortalités (Tableau 15).

Tableau 15

Essais d'induction de l'infection à virus de type herpès sur des lots de naissain

Essai	N°1	N°2	N°3	N°4	
Lot	Ponte d'octobre 95, RAS	Animaux survivant après un épisode de mortalités en nurserie, en juin 96		Naissain, RAS	
Traitement	26°C	26°C	Tri	26°C	10-12°C
Observations	Pas de mortalité après 3 mois	60% de mortalité après une semaine	55% de mortalité après 4 jours	65% de mortalité après 3 jours	Pas de mortalité après 4 jours
Analyse en PCR	Négatif (6-/6)	Positif (6+/6)	Positif pour les 8 lots analysés au cours du temps (3+/6 à 6+/6)	Positif (3+/14 ; mais animaux très fortement nécrosés)	Négatif (9-/9)

Ces expériences montrent que pour des lots d'animaux ayant présentés des épisodes de mortalités associés à la détection de virus de type herpès, des conditions « stressantes » peuvent déclencher une nouvelle infection virale. Ces résultats laissent fortement suspecter que le virus de type herpès peut persister chez certaines huîtres sans provoquer de maladie apparente. Ce type de phénomène est largement représenté chez les virus de la famille des *Herpesviridae* et est décrit comme le phénomène de latence. Dans ce cas, les virus persistent chez certains individus sans induire de maladie, mais peuvent à nouveau se multiplier et

provoquer une infection lorsque l'hôte est soumis à différents stimuli (conditions stressantes en particulier).

Dans le cas du virus de type herpès infectant les huîtres, ces observations renforcent l'hypothèse de son appartenance à la large famille des *Herpesviridae* et que les conditions d'élevage sont des facteurs prépondérants dans l'expression et le développement de l'infection virale.

5 - Etude des relations pouvant exister entre les virus de type herpès observés chez les huîtres et des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*

5. 1. - Tests de réactifs immunologiques spécifiques d'herpèsvirus

Les essais réalisés n'ont pas permis de mettre en évidence de communauté antigénique avec les herpèsvirus humains HSV1, HSV2 et CMV (cf. Paragraphe IV - RESULTATS / 2 - Diagnostic de l'infection au moyen de réactifs immunologiques / 2. 1. - Tests de réactifs hétérologues). Ces observations permettent d'éliminer le fait que les virus de type herpès observés chez les huîtres soient les virus HSV1, HSV2 ou CMV.

5. 2. - Analyses en PCR

Aucun des neuf ADN viraux testés (HSV1, HSV2, EBV, CMV, HHV6, MDV, OMV, CCV et FV4) en PCR avec les amorces spécifiques du virus de type herpès infectant les larves d'huître creuse n'a permis d'obtenir d'amplification. Ces résultats indiquent que le virus de type herpès observé chez les huîtres n'est pas un de ces neuf virus.

5. 3. - Séquençage et recherche d'homologies dans les banques de données

L'ensemble des séquences obtenues (Laboratoires IFREMER et Medical Research Council de Glasgow, A. Davison) montre une absence d'homologies flagrantes avec les séquences connues pour les virus de la famille des *Herpesviridae*.

Des homologies ont été observés dans les fragments séquencés de l'ADN du virus de type herpès infectant les huîtres avec les séquences codant pour la grande sous-unité d'une ribonucléotide réductase, d'une ADN polymérase, d'une déoxyuridine triphosphatase et d'une protéine impliquée dans l'apoptose. Les trois premières enzymes sont ubiquistes et bien que la première ait été décrite chez tous les herpèsvirus humains et les deux autres chez différents herpèsvirus humains et de poissons, le virus de type herpès observé chez les huîtres ne semble pas plus proche des herpèsvirus que d'autres organismes (tels que l'homme, la souris ou la drosophile). La protéine impliquée dans l'inhibition de l'apoptose est observée chez les humains et un certain nombre de baculovirus. Ainsi, le virus de type herpès observé chez les huîtres ne semble pas particulièrement proche des virus de la famille de *Herpesviridae*. Cependant, l'observation d'une séquence dans l'ADN du virus de type herpès infectant les huîtres pouvant être interprétée comme codant pour une possible terminase (enzyme très

conservée chez les herpesvirus et impliquée dans la mise en forme de l'ADN viral) indique l'appartenance de ce virus à la famille des *Herpesviridae*.

Les travaux réalisés pour mieux classer les virus de type herpès observés chez les coquillages montrent qu'il n'existe pas de relation étroite ou d'identité avec les herpesvirus déjà décrits, tout particulièrement avec les herpesvirus humains. Les travaux de séquençage, entre autres, ont permis de mettre en lumière l'originalité de ces virus par rapport aux membres de la famille des *Herpesviridae*. De plus, la démonstration de pouvoir pathogène du virus de type herpès infectant les larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ainsi que les observations de lésions cellulaires chez les animaux infectés au moyen de la microscopie électronique à transmission sont autant de données qui tendent à prouver l'existence d'une véritable maladie infectieuse et non l'existence d'un portage passif de virus par les mollusques.

En conclusion, l'absence d'homologies flagrantes avec les herpesvirus connus est très intéressante et semble indiquer que le virus de type décrit chez les huîtres est un « vrai herpès virus de l'huître » ayant évolué avec son hôte depuis des millions d'années. C'est probablement le premier herpesvirus décrit chez les invertébrés.

V - PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS, POSTERS ET RAPPORTS (1995-1998)

1. - Publications

Le Deuff R.M., Renault T. and Cochenec N., 1995. Antibodies specific for channel catfish virus cross-react with Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, herpes-like virus. *Vet. Res.*, 26 : 526-529.

Le Deuff R.M., Renault T. and Gérard A., 1996. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. aquat. Org.*, 24 : 149-157.

Renault T., 1998. Infections herpétiques chez les invertébrés : détection de virus de type herpes chez les mollusques bivalves marins, *Virologie*, vol. 2, n°5, sous presse.

Renault T., Flaujac G. and R.M. Le Deuff, 1995. Isolation and culture of heart cells from the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Meth. Cell Sci.*, 17 : 199-205.

Renault T., Le Deuff R.M., Cochenec N., Chollet B. and Maffart P., 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* : a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res.*, 26 : 53.

2. - Publications en préparation

Le Deuff R.M. and Renault T., en préparation. Purification and partial genome cloning of Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, herpes-like virus.

Renault T., Le Deuff R.M., Lipart C., and Delsert C., en préparation. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters.

3. - Communications Colloques

Le Deuff R. M., Renault T., Cochenec N., Chollet B. et Maffart P., 1995. Virus apparentés aux Herpes, associés à des mortalités de larves et de naissains d'huître japonaise, *Crassostrea gigas* : étude comparative et reproduction expérimentale de la maladie sur des larves de *C. gigas* axéniques. Séminaire franco-canadien sur les maladies et les problèmes environnementaux liés à l'aquaculture des mollusques, Arcachon, France, 12 et 13 septembre 1995.

Renault T., Le Deuff R.M., Delsert C. and Gérard A., 1997. Study of herpes-like viruses in oysters : virus purification and molecular probe preparation for diagnosis. VIIth International Conference of European Association of Fish Pathology on "Diseases of Fish and Shellfish", Edimbourg, 15-19septembre 1997.

Renault T., Le Deuff R.M., Delsert C. and Gérard A., 1997. Study of herpes-like viruses in oysters : virus purification and molecular probe preparation for diagnosis. First Workshop of the European National Reference Laboratories for Bivalve Mollusc Diseases, La Tremblade, 6-10 octobre 1997.

4. - Posters

Le Deuff R.M., Renault T. and Cochenec N., 1995. Antibodies specific for channel catfish virus cross-reactive with Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, herpes-like virus. INRA, Third International Symposium on viruses of Lower Vertebrates, Jouy en Josas, 14-17 mars 1995.

Renault T., Le Deuff R.M., Cochenec N., Chollet B. and Maffart P., 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* : comparative study, thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of disease in axenic larvae. INRA, Third International Symposium on viruses of Lower Vertebrates, Jouy en Josas, 14-17 mars 1995.

5. - Thèse

Le Deuff R.M., 1995. Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux *Iridoviridae* et aux *Herpesviridae*. Thèse pour le Doctorat de l'Université de Bordeaux II, U.F.R. de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Mention Sciences Biologiques et Médicales, Option Biologie-Santé, Thèse N° 389 : 1-235.

6. - Rapports de stage

Arzul I., 1997. Essais de transmission de l'infection à virus de type herpès chez les huîtres creuses, *Crassostrea gigas*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, pp 48.

Severin P., 1996. Technique de PCR appliquée à la détection du virus de type herpès de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : diagnostic et applications expérimentales. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, pp 41.

7. - Rapports IFREMER

Renault T., Le Deuff R. M., Lipart C., Chollet B. et Haffner P., 1996. Note de synthèse des résultats obtenus concernant la mise au point de méthodes de diagnostic du virus de type herpès, mars-avril 1996, pp 12.

Renault T., Lipart C., Le Deuff R. M., Chollet B. et Haffner P., 1996. Note de synthèse des résultats obtenus concernant l'étude du virus de type herpès et la mise au point de méthodes de diagnostic de l'infection, avril-mai 1996, pp 36.

Renault T., Le Deuff R. M., Lipart C., Chollet B. et Haffner P., 1996. Synthèse des résultats obtenus concernant l'étude du virus de type herpès et la mise au point de méthodes de diagnostic de l'infection, juin-septembre 1996, pp 41 (note de synthèse).

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie, 1996. Infection à herpèsvirus chez les huîtres - Résultats, application et perspectives, 22 mai 1996, pp 73.

Renault T., Le Deuff R. M., Lipart C., Chollet B. et Haffner P., 1997. Programme herpèsvirus - Synthèse des travaux réalisés au laboratoire IFREMER de La Tremblade, mars 1996 - février 1997, pp 60.

Renault T. et Lipart C., 1997. Note d'information concernant la définition et le test de nouvelles amorces de PCR spécifiques du virus de type herpès, 24 août 1997, pp 6.

8. - Rapports de contrat ou de convention

Renault T., 1996. Rapport intermédiaire - Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation / Décision d'Aide à la Recherche n° 95-07-01, février 1996.

Renault T., 1996. Rapport intermédiaire - Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation / Décision d'Aide à la Recherche n° 95-07-01, août 1996.

Renault T., 1997. Rapport intermédiaire - Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation / Décision d'Aide à la Recherche n° 95-07-01, février 1997.

Renault T., 1997. Rapport intermédiaire - Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation / Décision d'Aide à la Recherche n° 95-07-01, août 1997.

Renault T., 1998. Rapport intermédiaire - Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation / Décision d'Aide à la Recherche n° 95-07-01, février 1998.

Renault T., 1998. Rapport final - Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Innovation / Décision d'Aide à la Recherche n° 95-07-01, août 1998.

Renault T., Berthe F., Chollet B., Haffner P., Le Deuff R. M., Lipart C. et Thuillier B., 1997. Programme pathologie - Rapport scientifique 1995 - Contrat de plan Etat/Région 1994/1998 - Convention 95 RPC R 62.

Renault T., Berthe F., Chollet B., Haffner P., Le Deuff R. M., Lipart C. et Thebault A., 1997. Programme pathologie - Rapport scientifique 1996 - Contrat de plan Etat/Région 1994/1998 - Convention 96 RPC R 70.

9. - Documents techniques

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie, 1996. Session de formation à l'utilisation de la technique PCR pour le diagnostic de l'infection à herpèsvirus chez les huîtres - De la grande théorie aux petites recettes, 23/24 avril 1996, pp 40.

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie, 1997. Abnormal mortalities of oysters and herpesvirus diagnosis methods - First Workshop of the National Reference Laboratories for Bivalve Mollusc Diseases, 6-10 octobre 1997, La Tremblade, pp 41.

10. - Expertise

Renault T., 1997. Note d'information sur les infections à virus de type herpès observées chez les mollusques bivalves marins, Tribunal de Grande Instance de Saint-Nazaire, RG : 96 001 697.