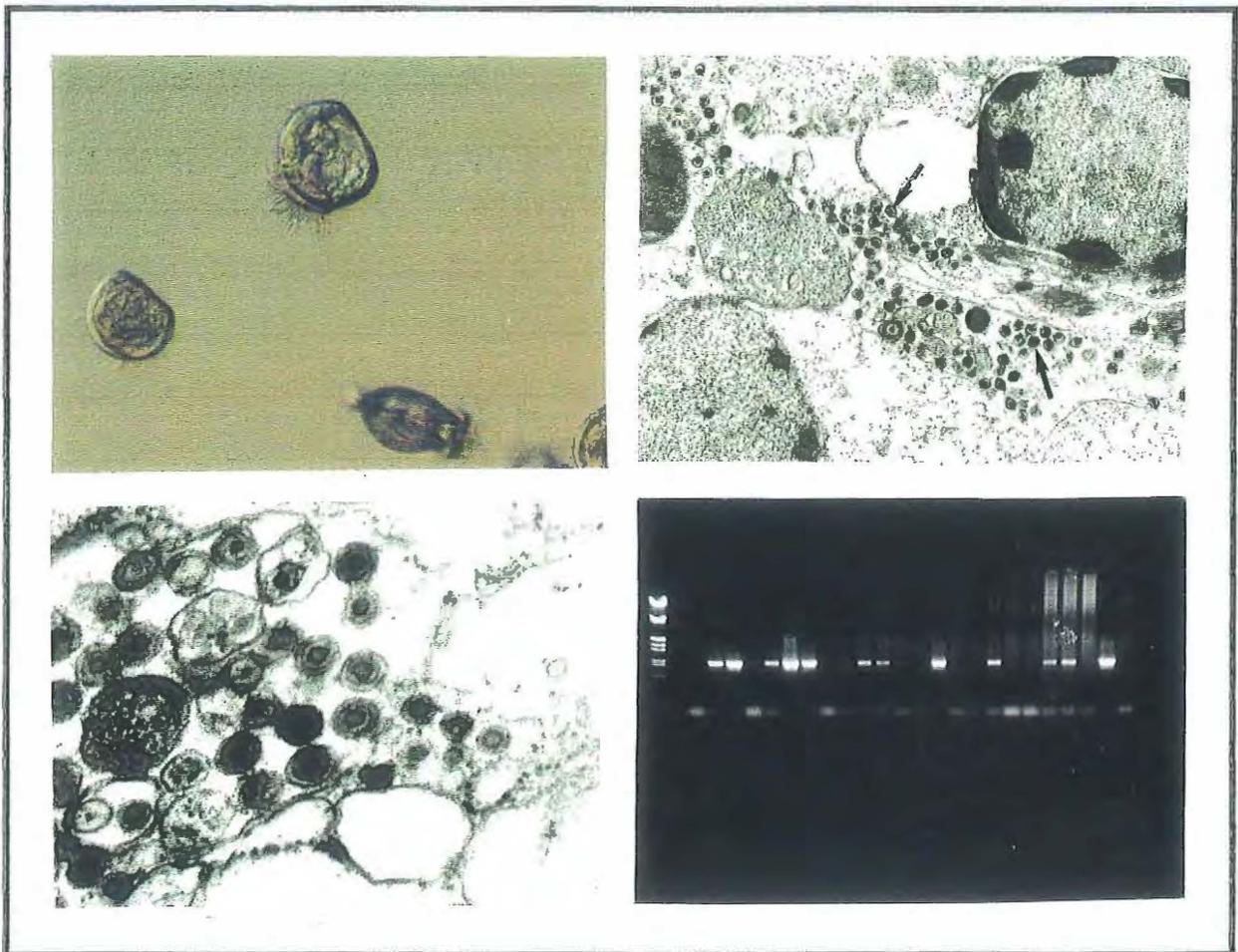


Rapport de Stage (mars - juillet 1997)

Isabelle ARZUL

ESSAIS DE TRANSMISSION DE L'INFECTION A VIRUS DE TYPE
HERPES CHEZ LES HUITRES CREUSES, *Crassostrea gigas*.



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

SOMMAIRE

<i>INTRODUCTION</i>	1
<i>GENERALITES</i>	
I/ CARACTERISTIQUES COMMUNES AUX VIRUS APPARTENANT A LA FAMILLE DES <i>HERPESVIRIDAE</i>	
A/ Propriétés structurales	2
B/ Réplication	3
C/ Propriétés biologiques	4
II/ INFECTIONS A VIRUS DE TYPE HERPES OBSERVEES CHEZ LES HUITRES	
A/ Etiologie	6
B/ Aspects épidémiologiques	6
C/ Symptômes et lésions	8
D/ Diagnostic	8
<i>MATERIEL ET METHODES</i>	
I/ MATERIEL BIOLOGIQUE	
A/ Larves infectées	9
B/ Larves axéniques	9
C/ Larves conventionnelles	10
D/ Naissain	10
II/ PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	
A/ Etude de la stabilité de l'ADN viral	11
1 - Réalisation d'un ultrafiltrat de broyat de larves infectées	11
2 - Inoculation du surnageant ultrafiltré	11
3 - Prélèvements	12
B/ Reproduction de l'infection sur larves axéniques	12
1 - Réalisation d'un ultrafiltrat de broyat de larves infectées	12
2 - Inoculation du surnageant de broyat de larves infectées ultrafiltré	13
3 - Suivi de l'infection	13
4 - Récupération des larves	13
C/ Reproduction expérimentale de l'infection à virus de type herpès au stade naissain	13
1 - Obtention de larves axéniques expérimentalement infectées	14
2 - Infection expérimentale des larves conventionnelles	15
3 - Infection du naissain	15
4 - Suivi et prélèvements	15

III/ TECHNIQUES D'ANALYSE

A/ Microscopie électronique	16
1 - Fixation	16
2 - Décalcification	16
3 - Déshydratation, imprégnation et inclusion des échantillons	16
4 - Confection des coupes et contraste	17
B/ Polymerase Chain Reaction (PCR)	17
1 - Description du protocole général de PCR	18
2 - Mise en oeuvre de la réaction de PCR	19
3 - PCR appliquée à la détection de l'ADN du virus de type herpès de l'huître	20

RESULTATS

I/ CONTROLE EN PCR DES LOTS DE LARVES SERVANT AUX EXPERIENCES	22
II/ ETUDE DE LA STABILITE DE L'ADN VIRAL	23
III/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR LARVES AXENIQUES	28
IV/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR NAISSAIN	30

DISCUSSION

I/ CONTROLE EN PCR DES LOTS SERVANT AUX EXPERIENCES	38
II/ ETUDE DE LA STABILITE DE L'ADN VIRAL	38
III/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR LARVES AXENIQUES	40
IV/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR NAISSAIN	41

<i>CONCLUSION</i>	42
-------------------	-----------

<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	43
----------------------	-----------

<i>ANNEXES</i>	45
----------------	-----------

INTRODUCTION

Au cours de l'été 1991, d'importantes mortalités de larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été observées dans des écloséries simultanément en France (Comps *et al.*, 1992) et en Nouvelle-Zélande (Hine, 1992).

Les examens histologiques ainsi que ceux réalisés en microscopie électronique à transmission d'échantillons de larves présentant des mortalités ont permis de détecter la présence de particules virales associées à des lésions cellulaires importantes.

D'après la morphologie, la taille, la localisation intranucléaire et cytoplasmique du virus, il est possible d'envisager l'appartenance du virus à la famille des *Herpesviridae*.

De nouvelles mortalités sporadiques ont été observées au cours des étés suivants sur des lots de larves élevées en éclosérie, mais également sur des lots particuliers de naissain de captage naturel ou provenant d'écloséries-nurseries.

De plus, des mortalités concomitantes ont été rapportées pour des larves et des lots de naissain chez les deux espèces *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*, élevées dans les mêmes installations avec détection chez ces deux espèces d'un virus de type herpès.

Il est possible d'associer les mortalités de larves et de naissain à la présence du virus, mais pour l'instant, la reproduction expérimentale des mortalités sur individus sains à partir de matériel biologique infecté n'a pu être réalisée que sur des larves. Le postulat de Koch reste donc à vérifier en ce qui concerne le naissain. Cependant, des premiers essais réalisés en 1996 laissent supposer la possible transmission du virus à des animaux indemnes à ce stade de développement en conditions expérimentales.

Après des rappels concernant les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*, nous ferons le point sur les connaissances relatives aux virus de type herpès infectant les huîtres.

Le travail expérimental ayant fait l'objet de ce stage comprend trois parties. Tout d'abord, des expériences ont été réalisées pour analyser, à l'aide de la technique de PCR, la stabilité de l'ADN du virus de type herpès dans l'eau de mer. La deuxième partie du travail a été consacrée à l'obtention de larves d'huître creuse expérimentalement infectées afin de préparer le troisième et dernier volet de l'étude. En effet, cette dernière et troisième partie avait pour objectif de reproduire l'infection à virus de type herpès au stade naissain, en utilisant du matériel biologique frais, expérimentalement contaminé, c'est à dire des larves conventionnelles d'huître creuse.

GENERALITES

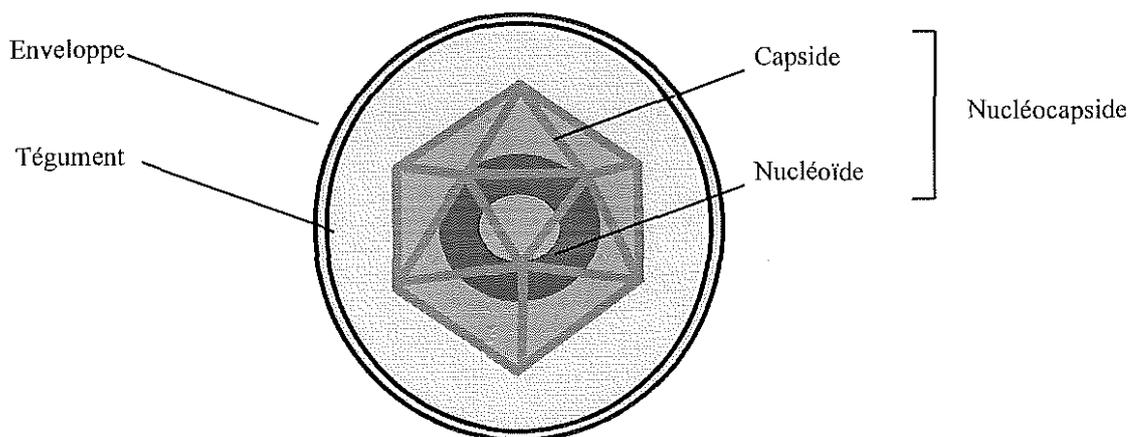
I/ CARACTERISTIQUES COMMUNES AUX VIRUS APPARTENANT A LA FAMILLE DES *HERPESVIRIDAE*

A/ Propriétés structurales

Les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* présentent une structure complexe qui peut être divisée en quatre éléments (cf. figure 1) :

- * Le nucléoïde correspond à l'assemblage de l'ADN viral et de protéines. L'ADN est double brin et linéaire, d'une taille comprise entre 120 et 220 kpb.
- * La capsidie contient le nucléoïde. Elle est constituée de 162 capsomères et présente une symétrie isocœdrique.
- * Le tégument correspond à la structure fibreuse située entre la capsidie et l'enveloppe.
- * L'enveloppe est indispensable à l'infectiosité des particules virales. Elle confère une morphologie sphérique et dérive de membranes cellulaires modifiées par l'insertion de protéines virales ainsi que de lipides.

Figure 1
Structure d'une particule virale de type herpès (d'après R.M. Le Deuff)



B/ Réplication

Le cycle de réplication peut être décrit comme suit :

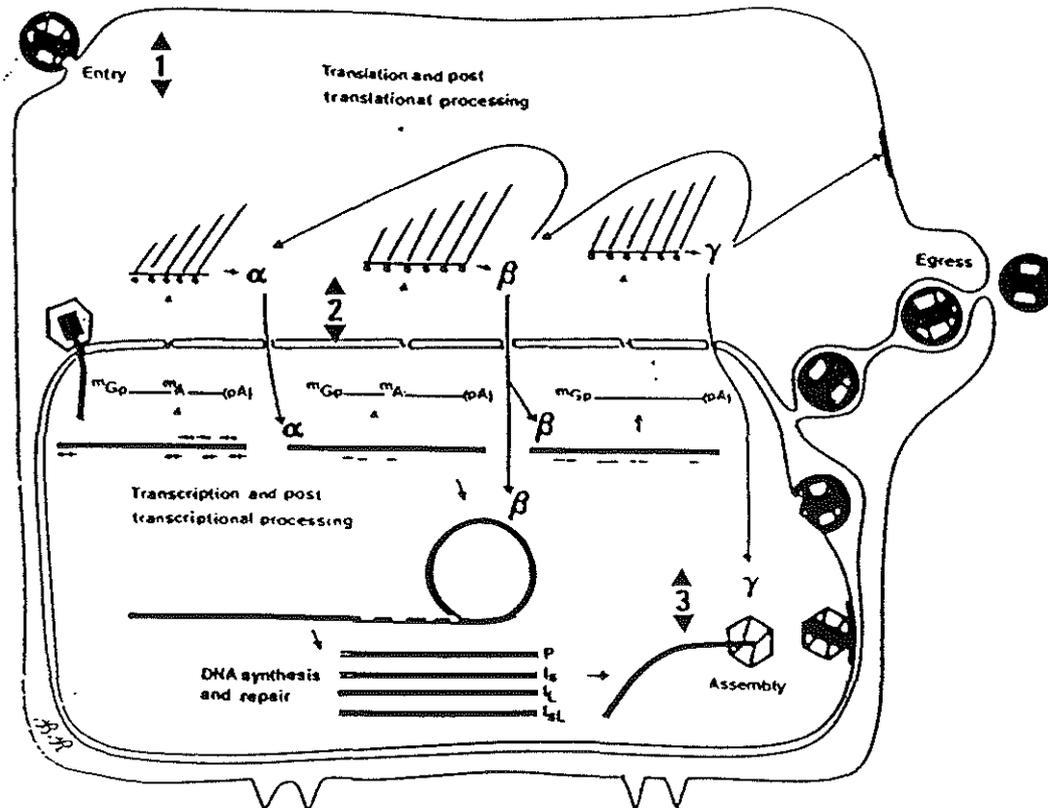
Figure 2
Cycle de réplication des *herpesviridae* (d'après B.Roizman)

1 Entrée du virus dans la cellule

Attachement virus-récepteurs cellulaires
Fusion membranes cellulaire et virale
Entrée des nucléocapsides dans le cytoplasme
et transport jusqu'aux pores nucléaires
Pénétration par phénomènes actifs de l'ADN viral dans le noyau

2 Synthèses virales

Transcription de l'ADN viral dans le noyau (ARN polymérase II)
Synthèse de protéines virales à partir d'ADN viraux dans le cytoplasme de la cellule hôte
Expression des gènes viraux en cascade
Réplication précoce de l'ADN viral dans le noyau des cellules infectées



3 Assemblage et libération des particules filles

Encapsidation de l'ADN dans le noyau
Attachement des nucléocapsides à des zones particulières de la surface interne de la membrane interne du noyau
Passage dans le cytoplasme
Libération des particules à partir de la cellule infectée

Signalons également que les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* ont la capacité de persister sous forme latente pendant toute la vie de l'hôte. Il y a alors absence de production de particules virales et l'ADN viral est soit intégré au génome de la cellule hôte, soit présent sous formes circulaires libres dans le noyau.

L'infection latente par les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* est en général localisée dans un type cellulaire particulier (cf. tableau I).

Enfin, le virus peut être réactivé sous l'effet d'un stress ou suite à l'action de composés chimiques, d'hormones ou autres molécules biologiques.

C/ Propriétés biologiques

Il existe plus de 80 virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*. De nombreuses espèces animales sont infectées par ce type de virus, que ce soit l'homme, les primates, les mammifères domestiques, les oiseaux, les poissons, les batraciens ou enfin, les mollusques bivalves marins (virus apparentés à la famille des *Herpesviridae* dans ce dernier cas).

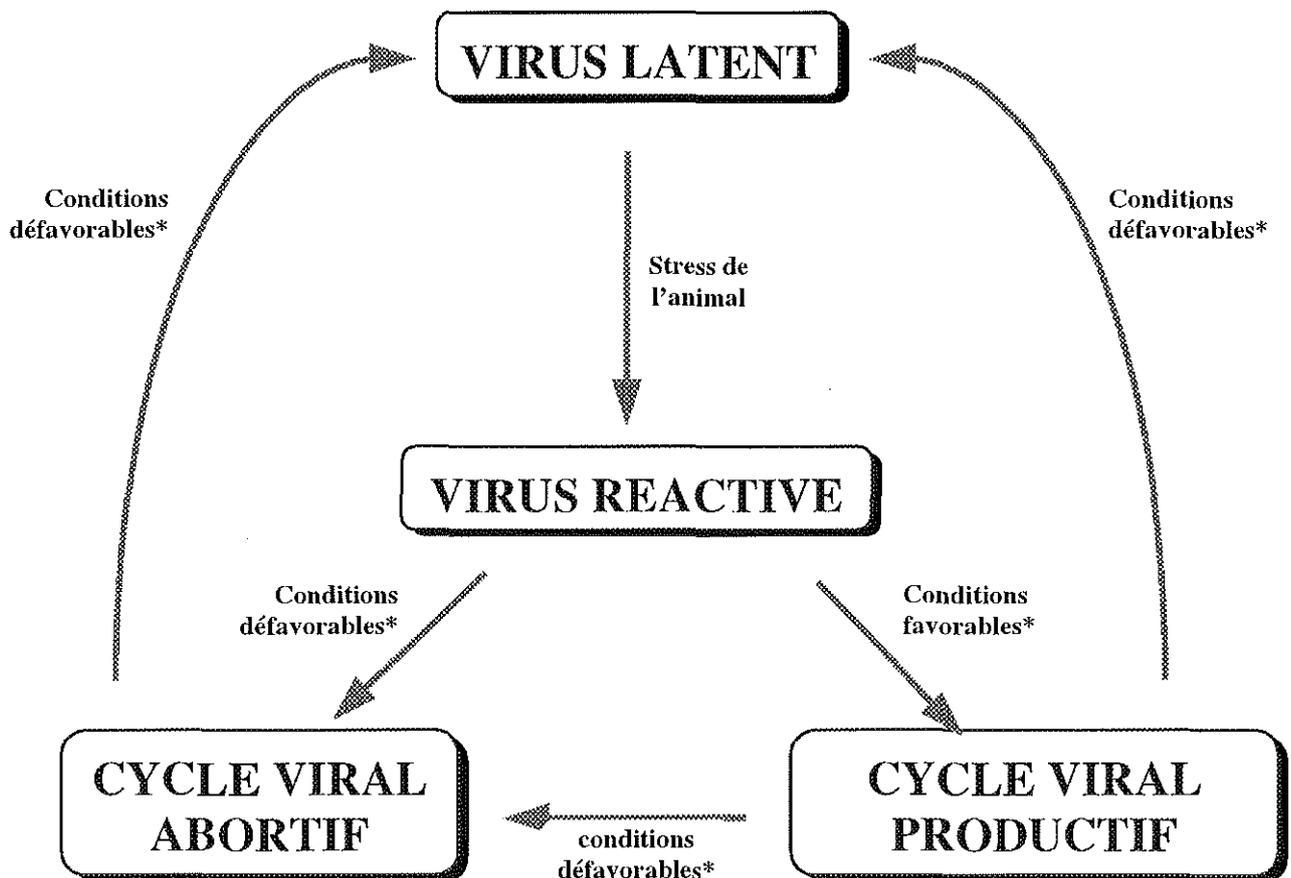
On classe les virus de cette famille en trois sous-familles selon leurs propriétés biologiques : *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae*.

Le tableau suivant résume les critères de classification et donne quelques exemples.

Tableau I - Caractères généraux des virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*

	<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Gammaherpesvirinae</i>
Variabilité d'hôte	+++	+	-
Cycle de multiplication	Court	Long	Variable
Développement <i>in vitro</i>	Rapide	Lent- Cytomégalie	Réplication dans les cellules lymphoblastoïdes et cycle lytique dans certaines cellules épithélioïdes et fibroblastiques
Infection latente	Au niveau des ganglions en premier lieu	Glandes sécrétrices, reins, lymphocytes	Tissus lymphoïdes
Quelques exemples de virus	<u>Homme</u> Herpes Simplex Virus (HSV1, HSV2) Varicella Zoster Virus (VZV) <u>Bovins</u> Bovine Mamillitis Virus <u>Porc</u> Pseudorabies Virus (maladie d'Aujeszky) <u>Equidés</u> Equine Herpesvirus-1 <u>Poissons</u> Chanel Catfish Virus (CCV)	<u>Homme</u> Cytomégalovirus (CMV) <u>Souris Murine</u> Cytomégalovirus	<u>Homme</u> Epstein Barr Virus (EBV) <u>Poulet</u> Marek's Disease Virus <u>Primates</u> Herpesvirus Ateles Herpesvirus Saimiri

Par ailleurs, on peut représenter le cycle viral des *Herpesviridae* ainsi :



*conditions favorables/défavorables pour le virus

Figure 3
Cycle viral des *Herpesviridae* (d'après T. Renault)

Le cycle viral productif conduit à la mort cellulaire. Au préalable, le nucléole augmente de taille et se retrouve contre la membrane nucléaire, la chromatine se marginalise, puis le noyau change de forme, présentant alors des excroissances. Enfin, les altérations touchent le réticulum endoplasmique et la membrane cytoplasmique, aboutissant à la mort cellulaire.

II/ INFECTIONS A VIRUS DE TYPE HERPES OBSERVEES CHEZ LES HUITRES

A/ Etiologie

Les particules virales observées chez plusieurs espèces de bivalves marins présentent les mêmes caractéristiques que les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*. De plus, le tropisme apparent des virus détectés pour les cellules de type fibroblastique pourrait laisser penser qu'ils appartiennent à la sous-famille des *Betaherpesvirinae*.

En microscopie électronique à transmission, les particules virales présentent des morphologies différentes selon leur localisation :

- ❖ Les particules virales intranucléaires ont un diamètre de 72-75 nm. Elles peuvent être vides, on parle de capsides, ou elles contiennent un nucléoïde, il s'agit alors de nucléocapsides.
- ❖ Les particules intracytoplasmiques mesurent en moyenne 105 nm et possèdent une enveloppe dérivée de la membrane des cellules infectées.
- ❖ Les virions en position extracellulaire sont également enveloppés et peuvent présenter des prolongements à leur surface, voire une queue.

B/ Aspects épidémiologiques

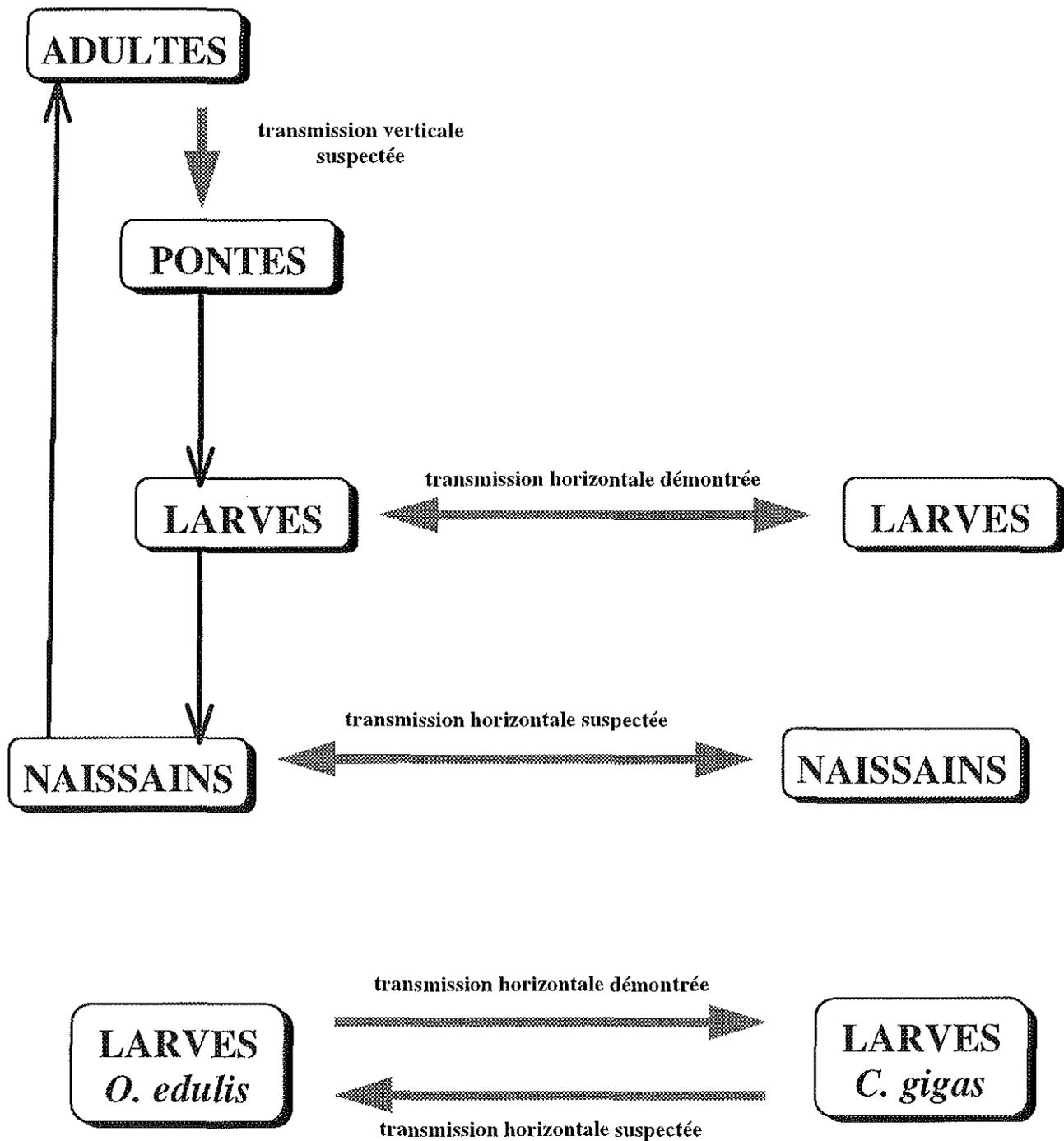
Concernant cet aspect, peu de données sont à l'heure actuelle disponibles pour les virus de type herpès infectant les huîtres.

Chez les mollusques bivalves marins, plusieurs cas d'infection par des virus de type herpès ont été observés chez des adultes d'huître américaine *Crassostrea virginica* (Farley *et al.*, 1972), chez des larves et du naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Hine *et al.*, 1992 ; Nicolas *et al.*, 1992 ; Renault *et al.*, 1994) et chez le naissain d'huître plate, *Ostrea edulis* (Comps et Cochenec, 1993).

Les mortalités massives et brutales de larves et de naissain apparaissent le plus généralement pendant les périodes chaudes de l'année ou en eau chauffée à 25-30°C (Farley *et al.*, 1972 ; Le Deuff *et al.*, 1996).

Il a été démontré qu'il existait bien une transmission horizontale d'une part entre larves infectées et saines de *C. gigas* (Le Deuff *et al.*, 1994) et d'autre part entre larves d'*O. edulis* infectées et larves saines de *C. gigas* (Le Deuff *et al.*, 1994). De plus, l'existence d'une transmission verticale est fortement suspectée (Le Deuff *et al.*, 1996), (cf. figure 2).

Figure 4 - Modes de transmission de l'infection à virus de type herpès chez les huîtres (d'après T. Renault)



C/ Symptômes et lésions

Les larves infectées cessent de se nourrir et de nager et des mortalités significatives sont observées à partir du 6ème jour après la ponte, 100% de mortalité sont généralement atteints entre le 8ème et le 10ème jour. Cependant, les mortalités peuvent être plus précoces et survenir dès le 4ème jour.

Les larves présentent d'importantes lésions du velum. Celui-ci apparaît nécrosé chez un grand nombre d'individus et des cellules hypertrophiées se détachent et peuvent apparaître libres dans l'eau d'élevage.

Des lésions peuvent être observées sur coupes histologiques : elles sont principalement localisées au niveau du tissu conjonctif (cellules de type fibroblastique) et plus rarement au niveau de l'épithélium du velum et du manteau. Ces lésions correspondent à la présence de cellules possédant une basophilie marquée et dont le noyau présente le plus souvent une marginalisation de la chromatine. Elles sont associées à des images de nécrose dans le cas d'infections avancées.

D/ Diagnostic

L'histologie classique permet d'observer des anomalies nucléaires chez les animaux infectés, les réactions inflammatoires étant en général limitées. Cependant, ces observations ne permettent pas de conclure à la présence du virus, elles ne sont pas spécifiques de cette infection.

Une des difficultés de l'étude de ce virus réside dans l'impossibilité de le cultiver *in vitro*. En effet, aucune lignée de mollusques bivalves n'est aujourd'hui disponible, mais également dans ses caractéristiques biologiques. Nous l'avons déjà mentionné, les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* peuvent exister sous diverses formes dans la cellule hôte : forme latente, infection peu productive ou infection aiguë.

Le diagnostic de l'infection à virus de type herpès chez l'huître repose à l'heure actuelle sur l'histologie (élément d'orientation) et sur la microscopie électronique à transmission, qui ne peut cependant être considérée comme une technique de diagnostic de routine, ainsi que sur la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) qui utilise des amorces nucléiques spécifiques.

MATERIEL ET METHODES

I/ MATERIEL BIOLOGIQUE

A/ Larves infectées

On entend par larve, le stade embryonnaire caractérisé par une vie libre hors de l'œuf. Ce stade précède la métamorphose, qui correspond chez les mollusques bivalves marins à l'étape de fixation, étape au cours de laquelle la larve perd son velum et donc son activité de nage. On parle alors de naissain.

Des échantillons de larves contrôlées comme infectées par le virus de type herpès (microscopie électronique et PCR), sont conservés congelés à -20°C.

A chaque essai, la quantité nécessaire est prélevée et décongelée. Le lot principalement utilisé provient d'une écloserie professionnelle située dans la baie de Bourgneuf. Il est conservé au congélateur depuis juillet 1995 et est identifié par le code 95-201-2. Ce lot a été choisi parmi d'autres lots contrôlés comme positifs en microscopie électronique à transmission, sur l'observation macroscopique de larves expérimentalement infectées (Séverin, 1996), à savoir la sédimentation après 48 heures d'élevage et l'observation de lésions du velum. De plus, la présence du virus a déjà été confirmée par analyse en PCR.

B/ Larves axéniques

La ponte, c'est à dire l'obtention d'œufs fécondés, est réalisée en conditions stériles. Les géniteurs, qui proviennent de l'écloserie IFREMER de Ronce les Bains, sont tout d'abord brossés sous l'eau courante, rincés à l'alcool à 75° et séchés sous hotte à flux laminaire.

Puis, on procède à l'ouverture des huîtres avec un couteau stérilisé à l'alcool. Les animaux sont rincés successivement avec de l'eau de mer filtrée à 0,22 µm, autoclavée et additionnée de 0,1 % Tween 80 (Polyoxyéthylène Sorbitan Mono-Oléate), puis avec de l'eau de mer filtrée à 0,22 µm et autoclavée.

Afin d'identifier les individus mâles et femelles, des gamètes prélevés avec la pointe d'un scalpel sont observés au microscope photonique en présence d'une goutte d'eau de mer. Seuls les individus possédant des gamètes en bon état (mobilité des spermatozoïdes, ovocytes en forme de poire, et peu de bactéries à l'observation au microscope photonique) sont retenus et décontaminés avec de la Bétadine (un rinçage rapide, un contact de dix minutes suivi d'un autre rinçage rapide).

Après scarification de la gonade pour chaque géniteur, les gamètes sont récupérés par aspiration à l'aide d'une pipette stérile de 1 ml. Ils sont ensuite déposés dans un Erlen Meyer contenant 300 ml d'eau de mer filtrée à 0,22 µm et autoclavée.

Dix millilitres de spermatozoïdes sont mis en contact avec 300 ml d'une suspension d'ovules pendant 20 minutes. On obtient alors des œufs fécondés qui seront distribués, toujours sous hotte à flux laminaire, dans des ballons ou des fioles contenant de l'eau de mer stérile (filtrée à 0,22 µm

et autoclavée), complétée en antibiotiques (Pénicilline G à 100 U/ml, Streptomycine à 0,1 mg/ml et Fluméquine à 0,03 mg/ml, cf annexe 1). Les larves axéniques sont maintenues sans bullage et sans apport de nourriture. Elles se développent normalement jusqu'au stade de larves D et peuvent survivre plus de sept jours après la fécondation.

C/ Larves conventionnelles

L'obtention des larves conventionnelles se fait suivant le même protocole que pour la production de larves axéniques, mais sans prendre les mêmes précautions. Les larves obtenues sont mises en élevage dans des bacs cylindro-coniques contenant 120 litres d'eau de mer filtrée à 10 µm sans apport de nourriture. On y entretient un bullage et la température est maintenue à 25-26°C.

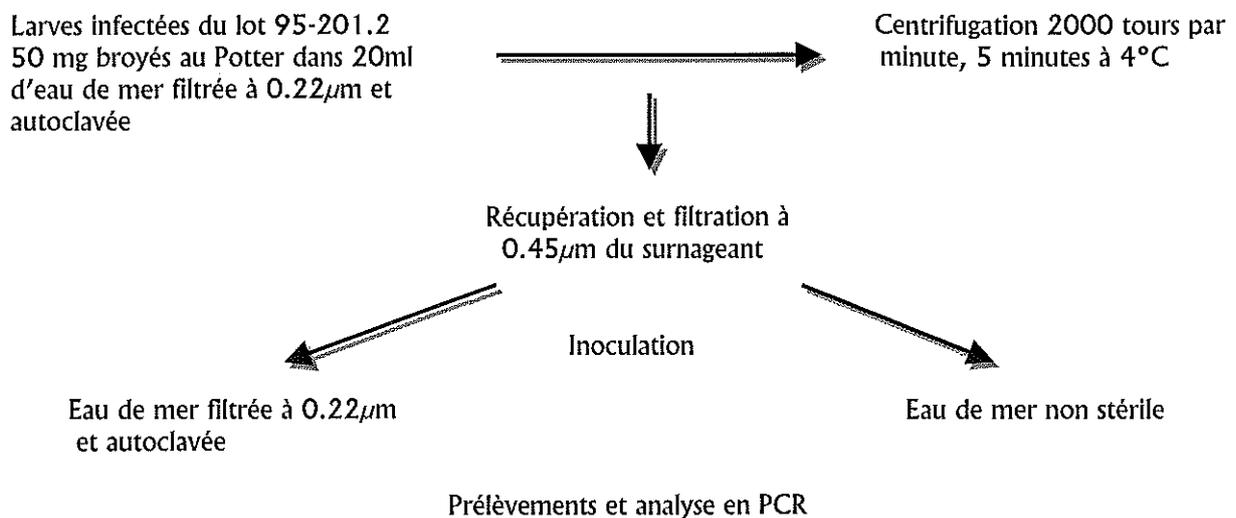
D/ Naissain

Le naissain utilisé correspond à du captage naturel de 1996 et provient de Fouras (Charente Maritime), situé au nord de l'embouchure de la Charente. Les animaux sont répartis, à raison de 100 individus par bac, dans 9 bacs carrés d'une contenance de 50 litres. Ces bacs se situent dans une salle réservée aux essais de pathologie expérimentale. Ils sont progressivement acclimatés à une température de 25-26°C pour trois des bacs et à une température de 20-21°C pour les autres. Un bullage y est assuré. De plus, les huîtres reçoivent quotidiennement un mélange d'algues phytoplanctoniques (*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*). L'eau d'élevage, filtrée à 10 µm n'est pas renouvelée au cours de l'élevage. Cependant, de l'eau douce est ajoutée régulièrement dans les bacs afin de maintenir une salinité de 35-37⁰/₀₀.

II/ PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

A/ Étude de la stabilité de l'ADN viral

Afin de vérifier si l'ADN viral se conserve au cours du temps dans l'eau et si la qualité de l'eau d'élevage intervient sur cette conservation, différents essais ont été réalisés. Pour cela, du surnageant de broyat de larves infectées est inoculé dans des ballons ou des fioles contenant de l'eau de mer stérile et non stérile.



1 - Réalisation d'un ultrafiltrat de broyat de larves infectées

50 mg de larves infectées par le virus de type herpès (lot 95-201.2) sont décongelés et broyés au Potter dans 5 ml d'eau de mer stérile. On ajoute de l'eau de mer filtrée et autoclavée afin d'obtenir un volume final de 20 ml. Après avoir été broyée, la suspension est centrifugée à 2000 tours par minute pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est alors récupéré et filtré à 0,45 µm.

2 - Inoculation du surnageant ultrafiltré

Des fioles de culture cellulaire sont remplies avec 200 ml d'eau de mer. Pour certaines d'entre elles, l'eau de mer est filtrée à 0,22 µm et autoclavée. Les autres fioles reçoivent une eau de mer servant à maintenir les animaux en élevage à la station IFREMER de La Tremblade. Chaque fiole reçoit un volume défini de l'ultrafiltrat de broyat de larves infectées, pour une expérience donnée (cf. paragraphe Résultats).

3 - Prélèvements

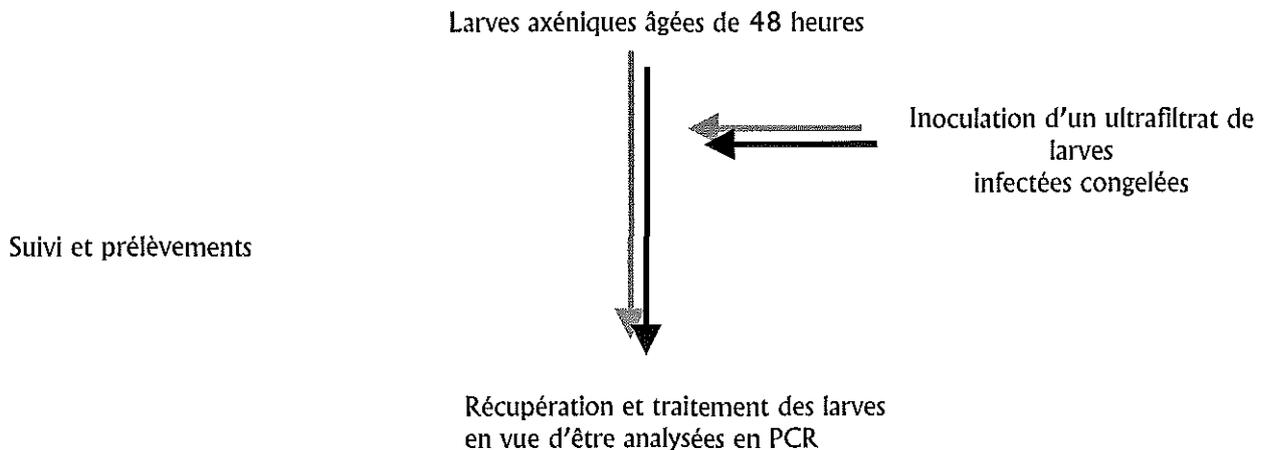
Afin de suivre la conservation de l'ADN viral en fonction du milieu dans lequel il se trouve, 1 ml d'eau de mer est prélevé dans chaque fiole quotidiennement pendant les cinq premiers jours après inoculation, puis tous les deux jours du septième au 19^{ème} jour.

De plus, 0,5 ml de surnageant non ultrafiltré et ultrafiltré sont prélevés avant inoculation afin de vérifier la présence d'ADN viral dans le lot 95-201.2 utilisé.

B/ Reproduction de l'infection sur larves axéniques

Le principe de l'expérience consiste à induire des mortalités sur des larves axéniques en les inoculant avec un ultrafiltrat de broyat de larves infectées, conservées congelées, de suivre les mortalités et d'analyser l'eau d'élevage et les larves en PCR.

Les manipulations sont effectuées sous hotte à flux laminaire.



1 - Réalisation d'un ultrafiltrat de broyat de larves infectées

L'ultrafiltrat est obtenu de la même façon que dans le protocole expérimental précédemment décrit (cf. paragraphe II/ Protocoles expérimentaux - A/ Etude de la stabilité de l'ADN viral).

2 - Inoculation du surnageant ultrafiltré de broyat de larves infectées

Les larves axéniques sont distribuées, à raison de 40-50 larves par ml, dans des fioles de 200 ml ou dans des ballons de six litres contenant cinq litres d'eau de mer filtrée à 0,22 µm et autoclavée, complétée en antibiotiques (Fluméquine à 0,03 mg/ml, Pénicilline G à 100 U/ml et Streptomycine à 0,1 mg/ml).

Les fioles reçoivent 0,5 ml de l'ultrafiltrat. Les ballons 1 et 2 sont inoculés avec environ 8 ml du surnageant ultrafiltré de broyat de larves infectées, tandis que le troisième ballon sert de témoin négatif. Ce dernier reçoit un volume équivalent d'eau de mer filtrée stérile.

3 - Suivi de l'infection

L'objectif de ces expériences est de vérifier la conservation du pouvoir infectieux du virus pour le lot de larves infectées 95-201.2 et de suivre l'évolution de l'infection virale chez les larves.

Dans ce dessein, des prélèvements sont effectués :

- ❖ 0,5 ml du surnageant non ultrafiltré de broyat de larves infectées,
- ❖ 0,5 ml du surnageant ultrafiltré de broyat de larves infectées,
- ❖ 1 ml d'eau de mer dans chaque ballon juste après inoculation du broyat,
- ❖ 1 ml d'eau de mer dans chaque ballon quotidiennement, après inoculation du

broyat.

Les larves sont observées au microscope photonique afin de suivre leur développement et l'apparition d'éventuelles lésions.

4 - Récupération des larves

A la fin de l'expérience, le contenu des fioles est récupéré et centrifugé dans des tubes de 45 ml à 3500 tours par minute pendant 15 minutes à 8°C. Après cette première centrifugation, 1 ml de surnageant est prélevé. Le surnageant est ensuite éliminé et les larves au culot sont récupérées dans 45 ml d'eau de mer filtrée stérile.

Les larves sont à nouveau centrifugées 2000 tours par minute pendant 15 minutes à 8°C. Cette étape de lavage est répétée une fois. Puis, 1 ml de l'eau de rinçage est récupéré ainsi que les larves. L'ensemble des prélèvements est conservé au congélateur à -80°C.

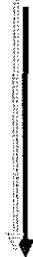
Lorsque les élevages se font en ballon, les larves sont récupérées par filtration à 20 µm, puis traitées en vue d'être analysées en PCR.

C/ Reproduction expérimentale de l'infection à virus de type herpès au stade naissain

Les essais d'infection avec le virus de type herpès au stade naissain nécessitent l'utilisation de larves conventionnelles d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, expérimentalement infectées par le virus de type herpès et leur mise en contact avec du naissain indemne. Le principe de l'expérience peut être résumé par le schéma suivant:

1ère étape

Larves axéniques
âgées de 2 jours



Inoculation d'un ultrafiltrat de larves
infectées congelées (lot 95-201.2)

Larves axéniques expérimentalement infectées âgées de 3-4 jours



2ème étape

Larves conventionnelles âgées de 2 jours



Inoculation des larves axéniques
expérimentalement infectées

Larves conventionnelles expérimentalement infectées âgées de 3-4 jours



3ème étape

Essais d'infection du naissain par baignation

1 - Obtention de larves axéniques expérimentalement infectées

De la même façon que pour l'expérience précédente (cf. paragraphe II/ Protocoles expérimentaux - A/ Etude de la stabilité de l'ADN viral), on inocule du surnageant de broyat de larves infectées ultrafiltré à $0,45 \mu\text{m}$ dans deux ballons de six litres d'élevage de larves axéniques âgées de 48 heures, contenant cinq litres d'eau de mer filtrée stérile complétée en antibiotiques. Le troisième ballon reçoit l'équivalent du volume d'ultrafiltrat inoculé en eau de mer stérile. La densité larvaire est de 40 à 50 larves par ml.

2 - Infection expérimentale des larves conventionnelles

Les larves conventionnelles sont élevées dans des bacs cylindro-coniques (120 litres) situés dans une salle réservée aux essais de pathologie expérimentale. On inocule deux bacs (A et B) après 48 heures d'élevage avec des larves axéniques infectées provenant d'un ballon de six litres, les larves axéniques étant alors âgées de trois à quatre jours. Le troisième bac cylindro-conique, après 48 heures d'élevage reçoit les larves axéniques contenues dans le ballon de six litres ayant été inoculé avec de l'eau de mer stérile.

3 - Infection du naissain

Les animaux âgés de moins de un an sont mis à sec pendant quatre heures dans des béciers afin d'augmenter leur activité de filtration lors de leur mise en contact avec les larves conventionnelles.

Les larves des bacs cylindro-coniques A et B sont récupérées sur le même tamis de 45 μm , puis transvasées dans un bécier contenant 600 ml d'eau de mer.

Trois bacs de naissain maintenus à 20-21°C (cf. I/ Matériel et méthodes - C/ Naissain) reçoivent 200 ml de cette suspension de larves conventionnelles infectées, tandis que les larves conventionnelles du bac cylindro-conique témoin négatif sont réparties sur les trois autres bacs de naissain maintenus à 20-21°C (cf. I/ Matériel et méthodes - C/ Naissain).

Enfin, les animaux des bacs d'élevage en eau chauffée à 25-26°C (cf. I/ Matériel et méthodes - C/ Naissain) ne sont pas mis au contact de larves. Ils servent à vérifier si une température élevée peut induire l'apparition de mortalité liée à la détection du virus de type herpès.

La mise en contact entre le naissain et les larves conventionnelles, sous un volume de 200 ml est de une heure minimum, en bécier. Le naissain est ensuite remis en eau dans les bacs en présence des larves (absence de renouvellement d'eau).

4 - Suivi et prélèvements

Des prélèvements sont effectués à chaque étape de l'expérience :

1 ml d'eau de mer dans chacun des ballons de larves axéniques infectées et dans le ballon servant de témoin négatif, juste avant leur mise en contact avec les larves conventionnelles.

1 ml d'eau de mer dans chacun des bacs cylindro-coniques avant la mise en contact des larves conventionnelles avec les larves axéniques.

1 ml d'eau de mer dans chacun des bacs cylindro-coniques 30 minutes après la mise en contact des larves conventionnelles avec les larves axéniques.

Echantillonnage des larves conventionnelles "infectées" et "non infectées" après filtration et avant contact avec le naissain.

Après la mise en contact avec les larves conventionnelles "infectées" et "non infectées", le naissain fait l'objet d'un suivi journalier. Les animaux morts sont prélevés et conservés individuellement au congélateur à -80°C.

Par ailleurs, au terme de la période d'acclimatation du naissain, cinq individus sont prélevés dans chaque bac, ils sont conservés individuellement en sac minigrip au congélateur à - 80°C. Ces prélèvements permettent d'établir un " Point Zéro", c'est-à-dire de contrôler la présence ou l'absence du virus sur les animaux en début d'expérience.

III/ TECHNIQUES D'ANALYSE

A/ Microscopie électronique

La préparation des échantillons comporte plusieurs étapes :

- fixation des tissus,
- décalcification éventuelle des échantillons,
- déshydratation, imprégnation et inclusion des échantillons,
- confection et contraste des coupes.

Les solutions et réactifs utilisés sont détaillés dans l'annexe 3.

1 - Fixation

Elle permet de préserver le mieux possible les structures des échantillons à analyser. Les échantillons ne doivent pas être trop épais (au maximum 3-4 mm) et sont fixés en glutaraldéhyde à 3%, 30 minutes à température ambiante ou au minimum 2 heures à 4°C. Puis, les échantillons sont rincés 3 fois 10 minutes en tampon cacodylate, post-fixés par l'acide osmique à 1%, 1 heure à 4°C et enfin rincés en tampon cacodylate 2 fois 10 minutes.

2 - Décalcification

Elle concerne les échantillons de larves et de naissains fixés avec leur coquille. Au préalable, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol (éthanol 70°, 1 fois 10 minutes ; éthanol 95°, 2 fois 15 minutes ; éthanol absolu, 3 fois 20 minutes), puis réhydratés partiellement en tampon cacodylate pendant 10 minutes. Les échantillons sont alors décalcifiés par un bain d'EDTA à 5% pendant 15 à 20 heures à 4°C. L'EDTA est ensuite éliminé par deux bains de 10 minutes en tampon cacodylate.

3 - Déshydratation, imprégnation et inclusion des échantillons

Les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol (même protocole que pour la décalcification), puis par deux bains de 15 minutes en oxyde de propylène.

Les pièces sont imprégnées progressivement. Un premier bain d'une heure est réalisé dans un mélange d'oxyde de propylène-Epon, enfin un deuxième bain de 1 heure est opéré en Epon seul.

Les échantillons sont inclus dans des moules remplis de résine Epon. Ces moules peuvent être en forme de cercueil si les échantillons ont une taille importante (2-3 mm), sinon, les blocs sont coulés dans des microtubes de type Eppendorf et les échantillons concentrés au fond du tube par centrifugation ou sédimentation.

Une étiquette d'identification de l'échantillon est incluse dans le bloc.
Enfin, les blocs sont placés 48 heures à 60°C afin que la résine Epon polymérise.

4- Confection des coupes et contraste

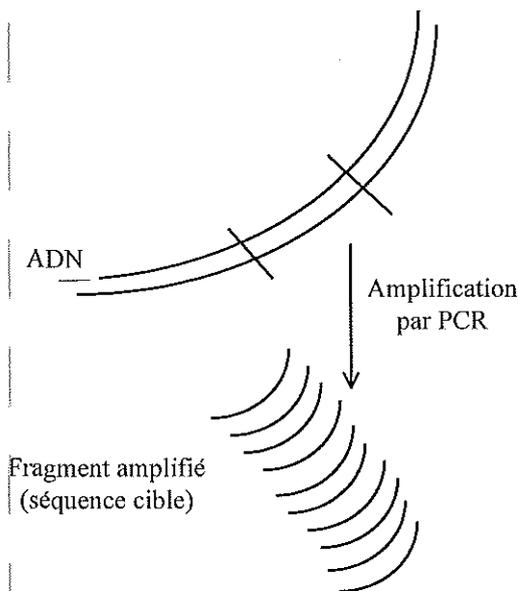
Les blocs sont taillés à l'aide d'une lame de rasoir de façon à obtenir une pyramide aux dimensions adéquates, puis des coupes sont réalisées avec un couteau de diamant à l'aide d'un ultramicrotome LKB NOVA.

Des coupes semi-fines de 1 à 2 μm d'épaisseur sont réalisées dans un premier temps. Elles sont déposées sur lames histologiques. Après avoir été colorées au bleu de toluidine 1%, elles sont observées en microscopie photonique afin de contrôler la qualité des échantillons. Enfin, les coupes ultrafines de 80 à 100 nm d'épaisseur sont réalisées et déposées sur des grilles de cuivre et contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

L'observation des coupes se fait à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL JEM 1200 EX sous une tension d'accélération de 80 kVolts.

B/ Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mise au point par Saiki en 1985 (Saiki et *al.*, 1988), la technique de PCR est utilisée pour amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un segment d'acide nucléique situé entre deux séquences connues.



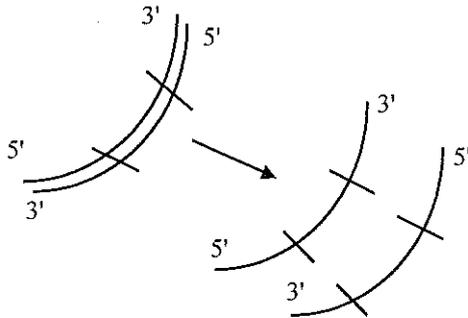
Cette réaction d'amplification enzymatique est obtenue par plusieurs cycles de polymérisation. La particularité de cette technique réside dans le fait que les copies d'ADN néosynthétisées servent de matrice au cours des cycles d'amplification suivants, aboutissant ainsi à une amplification exponentielle du nombre de copies.

On appelle séquence cible d'amplification, la région de l'ADN qui sera spécifiquement amplifiée au cours de la PCR. La taille de la séquence cible varie d'une centaine à quelques centaines de bases.

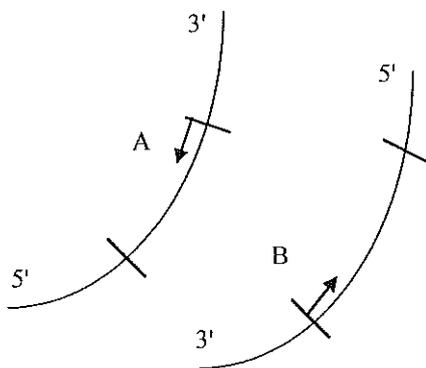
L'amplification de l'ADN cible est obtenue par une série de cycles d'amplification. Une PCR classique comporte en général 30 cycles, un cycle étant défini comme la période au cours de laquelle la quantité d'ADN cible est multipliée par deux.

1- Description du protocole général de PCR

Chaque cycle d'amplification comprend trois étapes. Chacune des étapes est réalisée à une température particulière.

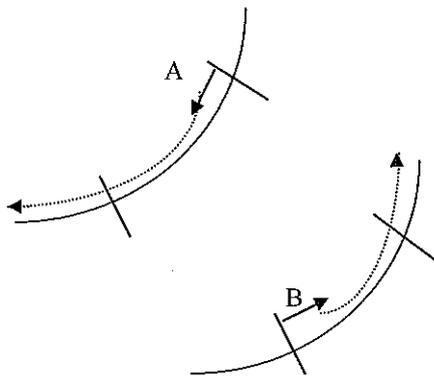


La première étape ou étape de dénaturation est réalisée à 94 °C pendant 1 minute. Sous l'effet de la température, les deux brins constituant l'ADN sont séparés. On obtient alors de l'ADN simple brin qui servira de matrice pour l'amplification ultérieure.



La deuxième étape ou étape d'hybridation est réalisée à la température choisie pendant 1 minute. Le choix de la température se fait selon une formule empirique : T_m (°C) - 5°C avec $T_m = \%GC$. A cette température, les amorces qui servent de point de départ à la polymérisation s'hybrident de façon spécifique sur l'ADN matrice de part et d'autre de la séquence cible d'amplification. Pour que les amorces s'hybrident préférentiellement, une grande quantité en est ajoutée au milieu réactionnel. De plus, les amorces étant de petite taille, leur cinétique d'hybridation sur les brins d'ADN matrice est beaucoup plus rapide que celle des brins matrices entre eux.

Les amorces sont des oligonucléotides de synthèse, de séquence définie (18 à 35 nucléotides ou mers). La température d'hybridation est déterminée par la séquence des amorces.



La troisième étape ou étape d'élongation est réalisée à 72 °C pendant une minute. C'est l'étape d'allongement des amorces par polymérisation. L'enzyme utilisée est une ADN polymérase thermorésistante purifiée à partir de bactéries thermophiles (*Thermus aquaticus*, par exemple). Cette polymérase, appelée Taq polymérase, reste stable à des températures pouvant aller jusqu'à 95 °C.

L'enzyme polymérise à partir des extrémités 3' des amorces. Elle prend pour matrice le brin d'ADN sur lequel est hybridée l'amorce et polymérise un brin d'ADN de séquence complémentaire.

Le cycle d'amplification permet de doubler le nombre de copies de la séquence cible. Ces cycles sont reproduits de la même façon trente fois (en général), le nombre de copies de la séquence cible est alors de l'ordre de 2^{30} .

2 - Mise en oeuvre de la réaction de PCR

Le mélange réactionnel de la PCR est composé :

- d'un tampon de réaction,
- de chlorure de magnésium,
- des quatre nucléotides triphosphates dATP, dTTP, dGTP et dCTP nécessaires à la polymérisation de l'ADN,
- des amorces A et B,
- de polymérase thermorésistante ou Taq polymérase.

Les **cycles thermiques** permettant l'amplification sont réalisés au moyen d'un thermocycleur sur lequel sont programmés la température, la durée des trois étapes de chaque cycle d'amplification et le nombre de cycles souhaités.

Enfin, les produits d'amplification sont analysés par **électrophorèse en gel d'agarose** à 1% (cf annexe 2).

Les produits de PCR sont mélangés avec un tampon de dépôt contenant du sucrose ou du glycérol afin d'alourdir les échantillons ainsi que deux colorants qui permettent de suivre le déroulement de la migration lors de l'électrophorèse.

Puis, les échantillons ainsi qu'un marqueur de masses moléculaires (contenant plusieurs fragments de taille connue) sont déposés dans les puits du gel d'agarose. Ce dernier est alors soumis à un champ électrique. Ainsi, les fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille. Le gel, coloré au bromure d'éthidium, est observé sur une table lumineuse en lumière

ultraviolette. Les produits d'amplification, s'ils sont en quantité suffisante, apparaissent sous la forme d'une bande fluorescente. Le calcul et le contrôle de leur taille se font par comparaison de leur migration avec celle du marqueur de masses moléculaires.

3 - PCR appliquée à la détection de l'ADN du virus de type herpès de l'huître

La **purification** des particules virales à partir de larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, infectées a permis en 1995 d'extraire de l'ADN viral. Cet ADN, dont la taille a été estimée à 180 kpb, a été cloné dans un plasmide, sous forme de fragments de 1 à 4 kpb.

Parmi ces fragments, certains ont été partiellement séquencés. Des séquences cibles pour l'amplification par PCR ont été choisies parmi ces séquences d'ADN viral, puis plusieurs **couplets d'amorces** ont été déterminés en fonction de ces séquences cibles.

La PCR utilisée afin de détecter le virus de type herpès est une **PCR gigogne ou nested PCR**. Les produits amplifiés en présence du couple d'amorces A3 et A4 lors d'une première réaction de PCR sont utilisés pour réaliser une deuxième amplification en présence du couple d'amorces A5 et A6. Cette méthode de PCR gigogne ou nested PCR permet ainsi d'augmenter la sensibilité de la détection du virus dans des échantillons ainsi que d'assurer une très bonne spécificité à la réaction.

Avant d'être passés en PCR, les échantillons subissent un **traitement** particulier qui varie selon la taille des animaux:

Les larves sont broyées en tube Eppendorf, à l'aide d'un piston Pellet à usage unique, en présence d'eau distillée (X µl d'eau distillée pour X mg de larves).

Le naissain de taille inférieure à 3 mm est réuni par lot de cinq individus dans des tubes Eppendorf, il est alors pesé (X g), puis broyé en présence d'eau distillée (X ml) à l'aide d'un piston Pellet à usage unique.

Le naissain dont la taille est supérieure à 3 mm est ouvert, séché, réuni par lots de cinq individus dans des sacs Minigrip, puis dilacéré à l'aide d'un marteau. Environ 0.5 g du broyat ainsi obtenu est transvasé dans un tube Eppendorf après section d'un angle du sac et 0,5 ml d'eau bidistillée est ajouté. L'ensemble est mélangé à l'aide d'un Vortex.

Les broyats obtenus sont ensuite placés au bain-marie bouillant 10 minutes, puis centrifugés (10000 tours, 5 minutes à 4°C). Les surnageants recueillis sont immédiatement dilués au dixième en eau bidistillée et placés au congélateur à - 80°C.

Différents **témoins** sont utilisés :

❖ Les témoins négatifs sont réalisés à partir d'eau bidistillée, ceci afin de détecter d'éventuelles contaminations des réactifs ou de la zone de travail au cours des manipulations.

❖ Les témoins positifs sont composés d'ADN extrait de virus purifié. L'un comporte 5×10^7 copies d'ADN, l'autre 2500 copies. Ces deux témoins positifs permettent de vérifier l'efficacité du milieu réactionnel et la qualité de la réaction de PCR.

Le **mélange réactionnel** par tube de PCR est le suivant:

	PCR1	PCR2
Echantillon	1 μ l	0.1 μ l
Tampon	5 μ l	5 μ l
MgCl ₂	5 μ l	5 μ l
Nucléotides	5 μ l	5 μ l
Amorce 3 ou 5	1 μ l	1 μ l
Amorce 4 ou 6	1 μ l	1 μ l
Taq polymérase	0.4 μ l	0.4 μ l
Eau bidistillée	31.6 μ l	32.5 μ l

RESULTATS

I/ CONTROLE EN PCR DES LARVES SERVANT AUX EXPERIENCES

Avant tout essai, le principal échantillon de larves infectées utilisé pour les infections, les larves du lot 95-201.2, est analysé en PCR. Pour cela, on prépare différents surnageants :

- surnageant pur après broyage au piston pellet de 30 mg de larves dans 50 μ l d'eau bidistillée, bain-marie bouillant 10 minutes et centrifugation 10 000 tours par minute pendant cinq minutes à 4°C (1);
- surnageant précédent dilué au dixième (2);
- surnageant après broyage au Potter de 30 mg de larves dans 11 ml d'eau de mer filtrée stérile et centrifugation 2000 tours par minute pendant cinq minutes à 4°C (3);
- surnageant précédent filtré à 0,45 μ m (4).

Les résultats de l'analyse en PCR sont tous positifs, les surnageants (3) et (4) étant cependant révélés positifs avec plus d'intensité (cf. figure 3, lignes A et B : témoins négatifs, lignes C et D : témoins positifs, respectivement 2500 et 5×10^7 génomes viraux).

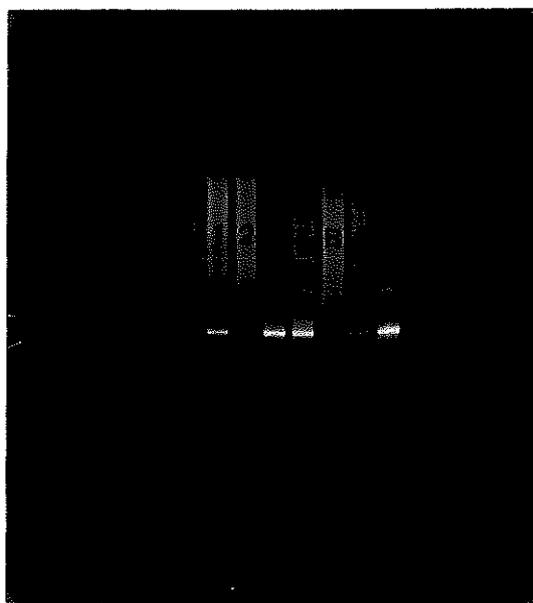


Figure 3
Analyse des produits de PCR2 en gel d'agarose.

II/ ETUDE DE LA STABILITE DE L'ADN VIRAL

La présence d'ADN viral dans les larves du lot 95-201.2 étant confirmée par analyse en PCR, l'étude de la stabilité de l'ADN viral a mené à la réalisation de quatre essais. Chaque essai nécessite l'utilisation de volumes d'eau de mer stérile et non stérile que l'on inocule avec un ultrafiltrat de broyat de larves infectées. L'ultrafiltrat est obtenu après broyage d'une certaine quantité de larves infectées dans un Potter et dans un certain volume final d'eau de mer filtrée stérile. Le broyat est ensuite centrifugé 2000 tours par minute pendant cinq minutes, puis filtré à 0,45 µm.

Des prélèvements d'eau de mer sont effectués après inoculation et sont analysés en PCR.

La conduite de ces quatre essais est résumée dans le tableau suivant.

Tableau II - Etude de la stabilité de l'ADN viral

	ESSAI 1	ESSAI 2	ESSAI 3	ESSAI 4
Matériel utilisé				
Fioles d'emfs** Fioles d'em*	10 fioles 200 ml 10 fioles 200 ml	5 fioles 200 ml 5 fioles 200 ml	5 fioles 20 ml 5 fioles 20 ml	5 fioles 50 ml 5 fioles 50 ml 5 fioles 50 ml d'emf***
Ultrafiltrat				
Quantité de larves infectées Volume final Volume inoculé	30 mg lot 95-201.2 11 ml 0,45 ml/fiole	40 mg lot 95-201.2 11 ml 0,7 ml/fiole	50 mg lot 95-201.2 20 ml 1,6 ml/ fiole	70 mg lot 95-201.2 20 ml 1 ml/fiole
Prélèvements réalisés	J1, J2, J3, J4, J6, J8, J14.	J1, J2, J3, J4, J5, J7, J9, J11, J13, J19.	J1, J2, J3, J4.	J1, J2, J3, J7, J9, J12, J14
Prélèvements analysés en PCR	J1, J2, J3.	J1, J2, J3, J4, J5, J19.	J1, J2, J3, J4.	J1, J2, J3, J7, J9, J12, J14.

* em : eau de mer

** emfs : eau de mer filtrée à 0,22 µm et autoclavée

*** emf : eau de mer filtrée à 0,8 µm

Les résultats des analyses en PCR des prélèvements réalisés sont donnés sous forme de tableaux (cf. ci dessous).

Essai 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
J1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
J2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Les fioles 1 à 10 contiennent de l'eau de mer autoclavée, puis filtrée à 0,22 µm et les fioles de 11 à 20 contiennent de l'eau de mer.

Essai 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
J1	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
J2	+	(+)	+	+	+	-	+	+	+	+
J3	-	-	-	+	-	+	+	+	+	(+)
J4	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
J5	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
J19	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Les fioles de 1 à 5 contiennent de l'eau de mer autoclavée, puis filtrée à 0,22 µm, tandis que les fioles 6 à 10 contiennent de l'eau de mer.

Essai 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
J1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
J2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
J3	+	+	+	-	+	-	-	+	NF	+
J4	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-

NF : Non Fait

Les fioles 1 à 5 contiennent de l'eau de mer autoclavée, puis filtrée à 0,22 µm. Les fioles 6 à 10 contiennent de l'eau de mer.

Essai 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
J1	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NF	NF	NF	NF	NF
J3	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
J7	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NF : Non Fait

Les fioles 1 à 5 contiennent de l'eau de mer filtrée à 0,22 µm et autoclavée, les fioles 6 à 10 contiennent de l'eau de mer filtrée à 0,8 µm, enfin, les fioles 11 à 15 contiennent de l'eau de mer.

Afin de compléter cette étude et de vérifier l'effet (inhibition) de la qualité de l'eau de mer sur la réaction de PCR elle-même, différentes quantités d'ADN viral sont analysées en PCR en présence d'un µl d'eau de mer ou d'eau de mer filtrée stérile.

L'échantillon de départ contient 5×10^7 copies d'ADN viral. Il est dilué au $100^{\text{ème}}$ et au $1000^{\text{ème}}$ en eau bidistillée. On obtient donc des échantillons contenant 5×10^5 et 5×10^4 copies d'ADN viral.

Chaque tube de PCR1 ne reçoit que 48 µl de mélange réactionnel modifié (30,6 µl d'eau bidistillée au lieu de 31,6 µl par tube). Les témoins négatifs sont complétés avec 2 µl d'eau bidistillée et les témoins positifs (5×10^7 et 2500 copies) avec 1 µl d'eau bidistillée, tandis que les échantillons analysés sont complétés avec 1 µl d'eau de mer (em) ou 1 µl d'eau de mer filtrée stérile (emfs).

Deux expériences ont été réalisées.

1^{ère} expérience

Les résultats obtenus sont observés sur la figure suivante (figure 4). L'ensemble des analyses montre la présence d'une réponse positive en PCR. Cependant, des variations d'intensité sont observables en fonction de la nature de l'échantillon.

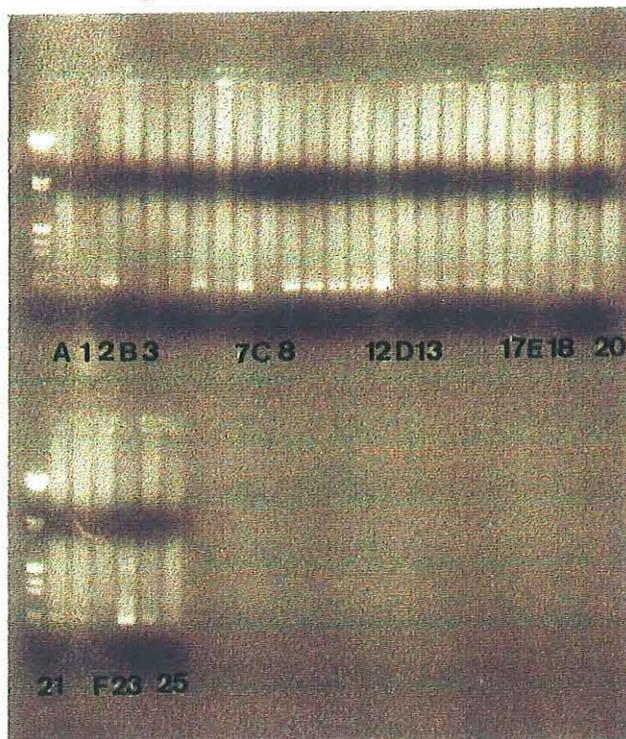


Figure 4

Recherche d'effets inhibiteurs de l'eau de mer sur la réaction de PCR. Analyse des produits de PCR2 en gel d'agarose.

A, B, C, D, E et F : témoins négatifs

1 et 2 : 5×10^7 copies avec respectivement $1 \mu\text{l}$ d'em et d'emfs.

3, 4, 5, 6, et 7 : 5×10^5 copies et $1 \mu\text{l}$ d'em

8, 9, 10, 11 et 12 : 5×10^5 copies et $1 \mu\text{l}$ d'emfs

13, 14, 15, 16 et 17 : 5×10^4 copies et $1 \mu\text{l}$ d'em

18, 19, 20, 21 et 22 : 5×10^4 copies et $1 \mu\text{l}$ d'emfs

23 : 5×10^7 copies et $1 \mu\text{l}$ d'eau bidistillée

24 : 5×10^5 copies et $1 \mu\text{l}$ d'eau bidistillée

25 : 5×10^4 copies et $1 \mu\text{l}$ d'eau bidistillée

2^{ème} expérience

Les résultats obtenus sont observés sur la figure suivante (figure 5). L'ensemble des analyses montre la présence d'une réponse positive en PCR. Cependant, des variations d'intensité sont observables en fonction de la nature de l'échantillon.

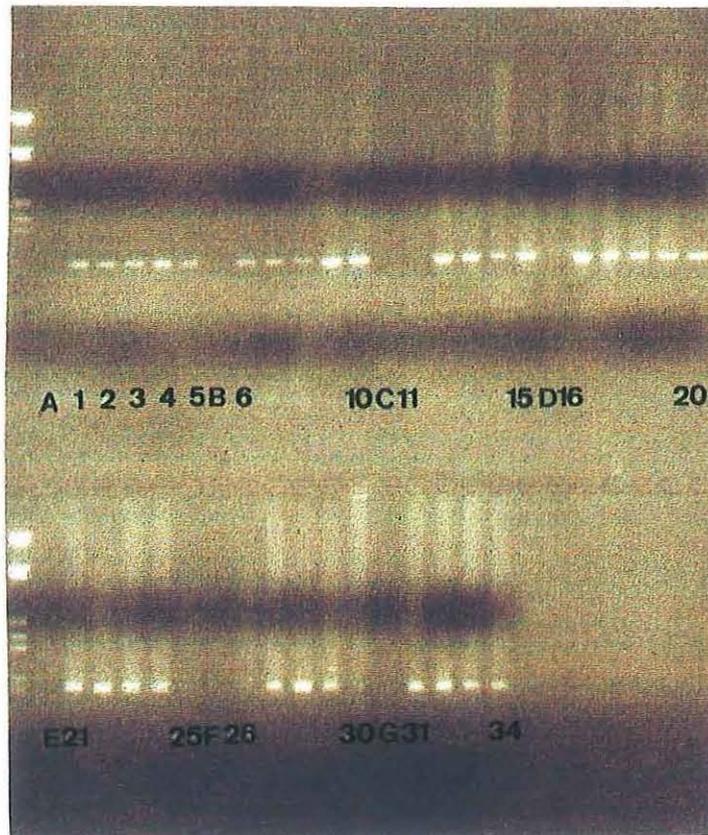


Figure 5

Recherche d'effets inhibiteurs de l'eau de mer sur la réaction de PCR. Analyse des produits de PCR2 en gel d'agarose.

- A, B, C, D, E, F et G : témoins négatifs
- 1, 2, 3, 4 et 5 : 5×10^7 copies d'ADN et $1 \mu\text{l}$ d'em
- 6, 7, 8, 9 et 10 : 5×10^7 copies d'ADN et $1 \mu\text{l}$ d'emfs
- 11, 12, 13, 14 et 15 : 5×10^5 copies d'ADN et $1 \mu\text{l}$ d'em
- 16, 17, 18, 19 et 20 : 5×10^5 copies d'ADN et $1 \mu\text{l}$ d'emfs
- 21, 22, 23, 24 et 25 : 5×10^4 copies d'ADN et $1 \mu\text{l}$ d'em
- 26, 27, 28, 29 et 30 : 5×10^4 copies d'ADN et $1 \mu\text{l}$ d'emfs
- 31 : 5×10^7 copies d'ADN et $1 \mu\text{l}$ d'eau bidistillée
- 32 : 5×10^5 copies d'ADN et $1 \mu\text{l}$ d'eau bidistillée
- 33 : 5×10^4 copies d'ADN et $1 \mu\text{l}$ d'eau bidistillée
- 34 : 2500 copies d'ADN et $1 \mu\text{l}$ d'eau bidistillée

III/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR LARVES AXENIQUES

Cinq essais ont été réalisés. Les oeufs fécondés obtenus après fécondation en conditions stériles sont répartis dans des volumes d'eau de mer filtrée stérile. Après 24 heures, on inocule un ultrafiltrat de broyat de larves infectées dans les fioles ou les ballons infectés 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 en fin d'expérience et analysées en PCR.

Le tableau suivant (tableau III) 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.

TABLEAU III

	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 de larves éclosionerie* et du lot 95-201.2 dans 20 ml inoculation : 8 ml de U1 ou de U2 dans chaque ballon.
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 éclosionerie* dans 20 ml inoculation : 5 ml 7 jours après 1 ^{ère} infection		

¹ * larves fraîches provenant de l'éclosionerie de IFREMER La Tremblade, contrôlées positives en PCR

IV/ ESSAIS DE REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR NAISSAIN

Avant les essais d'infection, 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 de cinq animaux .

Quatre essais d'infection 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 mise en contact avec 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 (tableau IV).

TABLEAU IV

	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 (600 mg) 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	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

Remarques

Essai 1 les antibiotiques utilisés sont les suivants :

Pénicilline G-Streptomycine
Fluméquine

Essai 2 Afin de limiter l'introduction de bactéries dans le milieu de fécondation, le surnageant des ovules est éliminé après sédimentation de ces derniers. Les ovules sédimentés sont alors transvasés dans un Erlen Meyer contenant 300 ml d'eau de mer filtrée stérile.

Essai 3 Les larves infectées du lot 95-201.2 ont été réparties dans plusieurs flacons, l'échantillon utilisé dans l'essai 3 n'avait encore jamais été testé.

Essai 4 Les quatre lots utilisés sont les suivants :

95R159
95R186-1
95R186-2
95R201.2.

Ils s'agit pour ces quatre lots de larves provenant des Ferranges dans la baie de Bourgneuf, conservées depuis 1995 à -20°C .

Essai 5 Au cours de l'essai 4, l'un des bacs de larves conventionnelles infectées est traité de la même façon que sont conduits les élevages larvaires de l'écloserie d'IFREMER La Tremblade. Le contenu du bac cylindro-conique est filtré sur des tamis dont la maille augmente proportionnellement à la taille des larves, l'eau d'élevage est ainsi renouvelée le lundi, le mercredi et le vendredi. La densité larvaire est alors ajustée. A chaque renouvellement, des antibiotiques sont ajoutés à l'eau d'élevage (Erythromycine à la posologie de 10 mg/l). Des algues phytoplanctoniques sont apportées tous les jours. Entre chaque renouvellement d'eau le bac est désinfecté et rincé.

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.

Des prélèvements ont été réalisés pour les étapes suivantes :

Surnageant de broyat de larves du lot 95-201.2.

Surnageant ultrafiltré à 0,45 µm de broyat de larves du lot 95-201.2.

1 ml d'eau de mer filtrée stérile des ballons de larves axéniques à J6 (infectées à J4).

1 ml d'eau de mer dans les trois bacs cylindro-coniques contenant les larves conventionnelles :

- Juste avant contact avec les larves axéniques (larves à J3).
- 30 minutes après contact avec les larves axéniques.
- Deux jours après contact avec les larves axéniques.

Echantillons de larves conventionnelles provenant des trois bacs cylindro-coniques :

- Juste avant contact avec les larves axéniques.
- Deux jours après contact avec les larves axéniques.

1 ml d'eau de mer dans chaque bac de naissain :

- Immédiatement après contact avec les larves conventionnelles.
- Trois jours après contact avec les larves conventionnelles.

Les analyses en PCR n'ont été positives que pour le surnageant non ultrafiltré et ultrafiltré à 0,45 µm de broyat de larves infectées du lot 95-201.2.

Essai 2

De la même façon, on effectue les prélèvements suivants :

Surnageant de broyat de larves infectées du lot 95-201.2.

Surnageant ultrafiltré à 0,45 µm de broyat de larves infectées du lot 95-201.2.

Surnageant de broyat de larves infectées de l'écloserie.

Surnageant ultrafiltré à 0,45 µm de broyat de larves infectées de l'écloserie.

1 ml d'eau de mer filtrée stérile des ballons de larves axéniques à J5 infectées depuis 48 heures.

1 ml d'eau de mer dans les bacs cylindro-coniques contenant des larves conventionnelles

- Juste avant contact avec les larves axéniques (larves à J3) dans les trois bacs.

- 1 ml d'eau de mer dans les bacs cylindro-coniques contenant des larves conventionnelles
 - Juste avant contact avec les larves axéniques (larves à J3) dans les trois bacs.
 - Dans un des bacs "infectés" et dans le bac "non infecté", 3 jours après contact avec les larves axéniques.
 - Dans un des bacs "infectés" et dans le bac "non infecté", 4 jours après contact avec les larves axéniques.
- Récupération des larves des bacs cylindro-coniques A et B, 7 jours après contact avec les larves axéniques.
- Récupération des larves du bac cylindro-conique Témoin négatif, 7 jours après contact avec les larves axéniques.

Le surnageant ultrafiltré de broyat de larves infectées du lot 95-201.2 est positif en PCR, tandis que non ultrafiltré, il apparaît négatif. Les prélèvements d'eau de mer réalisés dans les ballons de larves axéniques et dans les bacs cylindro-coniques avant et après contact avec les larves axéniques sont également négatifs. Cependant, les larves récupérées après filtration du contenu des bacs cylindro-coniques A et B apparaissent positives (figure 6).

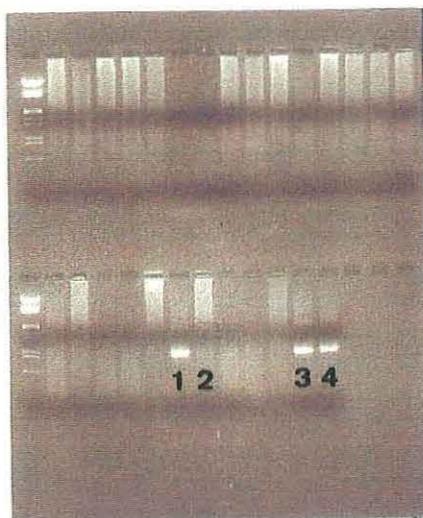


Figure 6

Analyse des produits de PCR2 en gel d'agarose. 1 : larves conventionnelles des bacs A et B; 2 : larves conventionnelles du bac témoin; 3 et 4 : témoins positifs respectivement 5×10^7 et 2500 copies d'ADN.

Les larves conventionnelles n'ont pas été mises au contact du naissain pour cette expérience.

Au cours de cet essai, aucune mortalité n'a été observée dans les différents bacs de naissain.

Essai 3

Au cours de ce troisième essai d'infection du naissain, les prélèvements suivants sont réalisés :

Surnageant de broyat de larves infectées du lot 95-201.2 provenant d'un nouveau flacon.

Surnageant ultrafiltré de broyat de larves infectées du lot 95-201.2 provenant d'un nouveau flacon.

1 ml d'eau de mer filtrée stérile des ballons de larves axéniques à J4, infectées depuis 48 heures.

Récupération après filtration à 20 µm des larves axéniques du ballon non infecté.

1 ml d'eau de mer dans les trois bacs cylindro-coniques :

- Juste avant contact avec les larves axéniques.
- 30 minutes après contact avec les larves axéniques.
- Quatre jours après contact avec les larves axéniques.

Echantillon des larves conventionnelles provenant des trois bacs cylindro-coniques quatre jours après contact avec les larves axéniques.

1 ml d'eau de mer dans les sept bacs de naissain :

- Immédiatement après contact avec les larves conventionnelles.
- Un jour après la mise en contact larves conventionnelles.
- Deux jours après la mise en contact larves conventionnelles.

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 observée. Aucune analyse n'a donc été réalisée en PCR.

Essai 4

Les prélèvements effectués sont :

Surnageant de broyat de larves infectées du lot 95-201.2.

Surnageant ultrafiltré de broyat de larves infectées du lot 95-201.2.

1 ml d'eau de mer filtrée stérile dans les trois ballons de larves axéniques.

Récupération d'un échantillon de larves axéniques dans les trois ballons.

Ovules et spermatozoïdes servant à la ponte des larves conventionnelles.

Récupération des larves conventionnelles lors du renouvellement d'eau dans le bac cylindro-conique A.

- 1 ml d'eau de mer dans les bacs cylindro-coniques :
 - Immédiatement après contact avec les larves axéniques.
 - 48 heures après contact avec les larves axéniques dans les deux bacs "infectés".
 - Trois jours après contact avec les larves axéniques dans les deux bacs "infectés".
 - Quatre jours après contact avec les larves axéniques dans les deux bacs "infectés".
 - Cinq jours après contact avec les larves axéniques dans les deux bacs "infectés".

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 du lot 95-201.2 non filtré et filtré à 0,45µm apparaît quant à lui, positif (figure 7).

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.

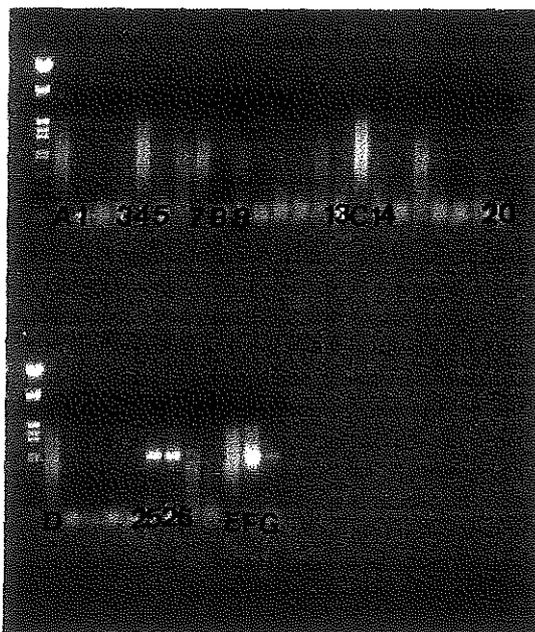


Figure 7

Analyse des produits de PCR2 en gel d'agarose. 1 à 3 : eau provenant des ballons de larves axéniques après infection; 4 : larves axéniques après infection; 5 à 7 : eau des bacs cylindro-coniques avant mise en contact avec les larves axéniques; 8 à 13 : eau des bacs cylindro-coniques après mise en contact avec les larves axéniques; 14 à 20 : eau des bacs de naissain après mise en contact avec les larves conventionnelles; 25 et 26 : surnageant de broyat de larves du lot 95-201.2 ultrafiltré et non ultrafiltré; 27 : larves conventionnelles des bacs A et B après mise en contact avec les larves axéniques; 28 : larves conventionnelles du bac témoin; A, B, C, D et E : témoins négatifs; F et G : témoins positifs.

Essai 5

Au cours de cet essai, les larves conventionnelles de l'expérience précédente (Essai 4) sont réutilisées.

Les prélèvements effectués sont les suivants :

Surnageant de broyat de larves des quatre lots utilisés.

Surnageant ultrafiltré à 0,45 μm de broyat de larves des quatre lots utilisés.

1 ml d'eau de mer filtrée stérile des ballons de larves axéniques à J7 (infectées à J2).

Echantillons de larves conventionnelles réinfectées provenant des trois bacs cylindro-coniques.

Les larves conventionnelles n'ont pas été mises en contact avec le naissain. Par ailleurs, aucune mortalité n'a été observée dans les différents bacs de naissain au cours de cette expérience.

Les analyses en PCR se sont avérées positives pour le surnageant non ultrafiltré et ultrafiltré à 0,45 μm de broyat de larves infectées des quatre lots de larves utilisés, ainsi que pour les prélèvements d'eau de mer filtrée stérile provenant des deux ballons de larves axéniques infectées. Cependant, les échantillons de larves conventionnelles réinfectées sont négatifs en PCR.

Remarque

Les analyses en microscopie électronique à transmission n'ont porté uniquement sur des prélèvements effectués au cours de l'essai 1. Elles ont été réalisées sur des échantillons de larves conventionnelles trois jours après leur mise en contact avec les larves axéniques. Elles n'ont pas révélé la présence de particule virale.

DISCUSSION

I/ CONTROLE EN PCR DES LOTS SERVANT AUX EXPERIENCES

Les résultats obtenus en PCR permettent de constater que l'ADN viral peut être détecté dans les broyats de larves du lot 95-201.2 indiquant que cet échantillon est bien positif.

Cependant, l'intensité des bandes observées en gel d'agarose varie en fonction du mode de préparation du broyat de larves. En effet, les produits de PCR sont nettement plus visibles pour les broyats réalisés au Potter qu'ils soient ultrafiltrés à 0,22 μm ou non, que pour les broyats réalisés en tube Eppendorf à l'aide d'un piston Pellet. Ces différences dans l'intensité des bandes observées sur gel d'agarose peuvent s'expliquer par le fait que les dilutions réalisées au cours des broyages ne sont pas les mêmes. En effet, pour les broyats préparés au Potter, 50 mg de larves pour 20 ml d'eau bidistillée sont utilisés en moyenne, alors que pour les échantillons traités en tube Eppendorf, 50 mg sont broyés dans 50 μl d'eau bidistillée. Dans ce cas, une dilution au dixième est réalisée immédiatement après traitement par la chaleur (100°C, 10 minutes) et centrifugation. Il existe donc une différence d'un facteur 40 dans la concentration des surnageants obtenus entre les deux traitements. Les surnageants les plus dilués (broyat au Potter) donnant les meilleurs résultats, il est possible de suspecter la présence, dans les échantillons de larves, de substances inhibitrices de la réaction de PCR. Une plus forte dilution des larves au moment du broyage permettrait de diluer également ces substances et ainsi, d'améliorer le rendement des réactions de PCR.

II/ ETUDE DE LA STABILITE DE L'ADN VIRAL

Des travaux concernant l'étude de la stabilité de l'ADN du virus de type herpès dans l'eau ont été initiés en 1996, au laboratoire IFREMER de La Tremblade (Charente Maritime) (Séverin, 1996). Les essais menés avaient permis de mettre en évidence que l'ADN du virus était détecté à faible dose (de l'ordre de 15 mg de larves infectées, sous forme d'un ultrafiltrat, pour 400 ml d'eau de mer) en PCR. Il est détectable pendant une assez longue période (plus de 13 jours) en eau de mer stérile et la détection n'est possible que jusqu'à 18 heures après dilution pour l'eau de mer non stérile. Cependant, les essais réalisés au cours de ces travaux préliminaires étaient réduits en nombre. Il semblait donc intéressant de répéter les expériences en multipliant les tests afin de vérifier les premiers résultats obtenus.

Cependant, les quatre essais effectués au cours de ce travail n'ont pas permis d'aboutir aux mêmes résultats. Il est possible d'observer une grande variabilité dans les données, avec en particulier une difficulté à répéter les tests. Lors d'une expérience, il est en effet difficile d'obtenir pour des échantillons identiques des résultats d'analyse en PCR identiques. Ainsi, l'ADN viral peut être détecté jusqu'à 19 jours après son inoculation dans des fioles contenant de l'eau de mer stérile, mais cette détection est aléatoire. Aucune différence significative ne semble apparaître pour la stabilité de l'ADN viral en fonction de la nature de l'eau dans laquelle il a été dilué.

Différentes hypothèses peuvent être proposées pour tenter d'expliquer ces résultats, tout particulièrement la variabilité observée.

❖ Il pourrait exister un problème d'homogénéisation de l'inoculum viral dans les fioles d'expérience. Les prélèvements réalisés ne seraient pas représentatifs du milieu contenu dans les récipients. Cette hypothèse est étayée par le fait que pour plusieurs expériences, l'ADN viral n'est détecté en PCR qu'à partir du deuxième ou troisième jour suivant le début du test. Cependant, chaque prélèvement (1 ml à la pipette stérile de 10 ml) était précédé d'une série d'aspiration/refoulement afin d'homogénéiser le milieu. Pour les expériences réalisées en 1996 (Séverin, 1996), des ballons de verre de 1 litre contenant 400 ml d'eau de mer avaient été utilisés, ce qui facilitait l'homogénéisation du contenu.

❖ Il est possible également qu'une quantité trop faible d'ADN viral ait été utilisée pour réaliser certaines expériences. En effet, pour les deux premiers essais, les quantités de larves étaient respectivement de 30 mg pour 4 litres d'eau de mer (20 fioles de 200 ml) et 40 mg pour 2 litres d'eau de mer (10 fioles de 200 ml). Dans les expériences réalisées en 1996 (Séverin, 1996), la quantité de larves était plus importante, soit 15 mg pour 400 ml d'eau de mer (1 ballon de 1 litre). Cependant, les deux autres essais réalisés au cours de ce stage ont utilisé respectivement 50 mg de larves dans 200 ml d'eau de mer (10 tubes de 20 ml) et 75 mg de larves pour 750 ml d'eau de mer (15 fioles de 50 ml). Dans ce cas, les résultats sont identiques à ceux obtenus lors des deux premiers essais.

❖ Le défaut de répétabilité des résultats pourrait également s'expliquer par la présence d'inhibiteurs dans l'eau de mer (sels par exemple ; Innis *et al.* , 1990). Les deux expériences réalisées en vue de vérifier l'effet de la qualité de l'eau de mer sur la réaction de PCR permettent d'apprécier l'interaction entre deux paramètres que sont la qualité de l'eau et la quantité d'ADN matrice utilisée. Il est ainsi possible de remarquer des bandes moins intenses en gel d'agarose pour les fortes quantités d'ADN matrice (5×10^7 copies) en eau de mer non stérile que pour les faibles quantités (5×10^4 copies). L'inverse est observé quand on ajoute de l'eau distillée ou de l'eau de mer stérile.

L'ensemble des résultats obtenus montrent la difficulté à utiliser la technique de PCR pour réaliser une approche expérimentale. La reproductibilité est un problème essentiel, rencontré pour ce type d'expérience. Ce problème reste sensible dans la mesure où la PCR est très dépendante d'un grand nombre de facteurs (réactifs, thermocycleurs, manipulateurs, etc ...).

III/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR LARVES AXENIQUES

Des travaux réalisés au laboratoire IFREMER de La Tremblade (Charente Maritime) ont montré qu'il était possible de reproduire expérimentalement l'infection à virus de type herpès sur des larves axéniques d'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Le Deuff *et al.*, 1994). Dans cette étude, 48 heures après inoculation d'un ultrafiltrat de broyat de larves infectées, l'ensemble des larves axéniques sédimente et présente des anomalies de velum (hypertrophie et détachement des cellules du velum). Les élevages infectés présentent alors 100% de mortalité tandis que les témoins négatifs ne présentent que 3% de mortalité.

Les cinq essais réalisés dans la présente étude n'ont pas permis d'obtenir de tels résultats. 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 95-201.2 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 95-201.2 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.

IV/ REPRODUCTION DE L'INFECTION SUR NAISSAIN

Les travaux entrepris en 1995 consistaient à infecter du naissain par balnéation en présence de broyats ultrafiltrés de larves et de naissain contaminés, conservés congelés à -20°C. En outre, des essais d'infection d'adultes avaient été tentés par inoculation intracardiaque de ces mêmes broyats. Aucun phénomène de mortalité n'avait pu être observé au cours de ces essais. Il faut noter que dans ce cas, les particules virales présentes chez les animaux infectés sont libérées par dissociation mécanique des tissus et peuvent, de ce fait, être altérées.

Au vu de ces résultats, les essais ultérieurs d'infection de naissain d'huître (T. Renault *et al.*, 1996) ont été réalisés en utilisant un support biologique vivant (contact avec des larves infectées expérimentalement vivantes). De cette façon, des particules virales infectieuses sont produites par les larves infectées et libérées dans le milieu extérieur à mesure que l'infection se poursuit. Différents essais réalisés en 1996, en utilisant ce schéma, avaient abouti à l'observation de mortalités différentielles significatives entre des bacs de naissain contrôle et des bacs de naissain mis au contact de larves conventionnelles expérimentalement infectées pour une expérience. De plus, les analyses en PCR montraient la présence d'ADN viral pour le naissain mis au contact des larves infectées, alors qu'elles étaient négatives pour les animaux témoins négatifs.

L'objectif de la présente étude était de reprendre les expériences initiées en 1996 et de tenter d'établir un protocole reproductible pour transmettre expérimentalement l'infection à virus de type herpès à des huîtres au stade naissain.

L'ensemble des essais réalisés n'a pas permis d'aboutir à des mortalités sur le naissain. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les larves axéniques utilisées comme premier maillon dans l'obtention de matériel vivant contaminé n'étaient pas infectées.

CONCLUSION

La récente apparition de nombreuses infections à virus de type herpès chez différentes espèces d'huître nécessite le développement d'outils diagnostiques adaptés.

Les techniques de détection utilisées jusqu'alors pour rechercher ces infections virales, histologie et microscopie électronique à transmission, sont plus ou moins satisfaisantes tant par leur sensibilité, le temps qu'elles nécessitent et leur coût.

La PCR appliquée à la détection des herpèsvirus chez les vertébrés est largement documentée (Boyle et Blackwell, 1991 ; Casas *et al.*, 1996 ; Cassinotti *et al.*, 1996 ; de Gee *et al.*, 1996). Par ailleurs, de récents progrès ont été réalisés dans le développement de méthodes moléculaires de détection de virus humains transmissibles par les coquillages (Lees *et al.*, 1993 ; Le Guyader *et al.*, 1994 ; Atmar *et al.*, 1995). Cependant, aucune technique de détection des virus infectant les bivalves et faisant appel à la biologie moléculaire n'a fait l'objet, à ce jour, de publication.

Le laboratoire IFREMER de Ronce les Bains a donc développé un protocole de mise en évidence d'un virus de type herpès associé à des mortalités de larves et de naissain chez l'huître creuse. Ce protocole fait appel à la PCR (Renault *et al.*, en préparation).

Pour les travaux réalisés au cours de ce stage, l'utilisation de ce protocole de PCR a été appliquée au suivi de la stabilité de l'ADN viral en eau de mer et à l'analyse des prélèvements effectués au cours des divers essais de reproduction expérimentale de l'infection à virus de type herpès.

Au vu des difficultés de répétabilité rencontrées, la technique de PCR ne semble pas être une méthode de choix pour l'étude de la stabilité de l'ADN viral. En revanche, la rapidité et la facilité de mise en oeuvre de cette méthode d'analyse nous ont aidés dans le bon déroulement des essais d'infection expérimentale de naissain. En effet, l'analyse rapide des prélèvements conditionnait la poursuite ou l'arrêt de l'expérience en cours.

Les essais de transmission expérimentale de l'infection au stade naissain, réalisés au cours de ce stage, n'ont pas permis d'aboutir à l'induction de mortalité et à la définition d'un protocole reproductible. Cependant, ces essais seront poursuivis afin de vérifier et de démontrer que le virus de type herpès est bien l'agent pathogène responsable des mortalités de naissain.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Atmar, R.L., Metcalf, T.G., Neill, F.H. et Estes, M.K. (1993) Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 631-635.
- Boyle, J. et Blackwell, J. (1991) Use of polymerase chain reaction to detect latent Channel Catfish Virus. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1965-1968.
- Casas, I., Tenorio, A., de Ory, F., Lozano, A. and Echevarria, J.M. (1996) Detection of both herpes simplex and Varicella-Zoster viruses in cerebrospinal fluid from patients with encephalitis. *J. Med. Virol.* 50, 82-92.
- Cassinotti, P., Mietz, H. and Siegl, G. (1996) Suitable and clinical application of a multiplex nested PCR assay for the diagnosis of herpes simplex virus infections. *J. Med. Virol.* 50, 75-81.
- Comps, M. et Cochenec, N., (1993) A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L. *J. Inv. Pathol.* 62.
- Farley, C.A., Banfield, W.G., Kasnic, J.R.G., Foster, W.S. (1972) Oyster herpes-type virus. *Science, Wash.D.C.* 178, 759-760.
- de Gee, A.L.M., Wagter, L.H.A. and Hage, J.J. (1996) The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Microbiol.* 53, 163-168.
- Hine, P.M., Wesney, B. et Hay B. E. (1992) Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Dis. aquat. Org.* 12(2), 135-142.
- Innis, M.A. et Gelfand, D.H. (1990) Optimization of PCRs. In : M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (Eds), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 3-12.
- Le Deuff, R.-M., Nicolas J.-L., Renault, T. et Cochenec, N. (1994) Experimental transmission of herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 142(2), 69-72.
- Le Deuff, R.-M. (1995) Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux *Iridoviridae* et aux *Herpesviridae*. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux II, pp. 234.
- Le Deuff, R.-M., Renault, T. et 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.
- Lees, D.N., Henshlwood, K. et Dore, W.J. (1994) Development of a method for the detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Appl. environ. Microbiol.* 60, 2999-3005.
- Le Guyader, F., Dubois, E., Menard, D. et Pommepuy, M. (1994) Detection of hepatitis A, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3665-3671.

- Nicolas, J.-L., Comps, M. et Cochenec, N. (1992) Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12(1), 11-13.
- Renault, T., Cochenec, N., Le Deuff, R.-M. et Chollet, B. (1994) Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 14(2), 64-66.
- 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 herpes et la mise au point de méthodes de diagnostic de l'infection - Juin/septembre 1996. Note IFREMER.
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Lipart, C. et Delsert C. (en préparation) Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters.
- Roizman, B., Batterson, W. (1985) Herpesviruses and their replication, dans Virology, Fields, B.N. *et al.*, 25, 497-526.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Falcoma, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230, 1350-1354.
- Séverin, P. (1996) Technique de PCR appliquée à la détection du virus de type herpes de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : diagnostic et applications expérimentales. Rapport de stage, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, pp 41

ANNEXES

ANNEXE 1 : Composition des solutions antibiotiques utilisées

1 - Pénicilline-Streptomycine

La solution de Pénicilline-Streptomycine est préparée par dissolution des antibiotiques à la concentration de 10^5 U/ml de Pénicilline G et de 100 mg/ml de Streptomycine dans de l'eau distillée. Cette solution est conservée à -20°C . Dans les milieux d'élevage larvaire, elle est utilisée à la dilution 1/1000.

2 - Fluméquine

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

ANNEXE 2 : Electrophorèse en gel d'agarose

1 - Réactifs

TBE concentré (utilisé dilué dix fois) :

Tris base	54 g
Acide borique	27,5 g
EDTA	1 mM

Gel d'agarose :

Le gel utilisé est à 1% d'agarose.
Peser la quantité requise d'agarose.
Ajouter le volume nécessaire de TBE dilué et porter à ébullition.

Tampon de dépôt (utilisé dilué six fois, soit 2 μ l pour 10 μ l d'échantillon) :

Bleu de bromophénol	0,25%
Xylène cyanol FF	0,25%
Sucrose	40%
Stocker à 4°C.	

Bromure d'éthidium : 10 mg/ml

2 - Méthode

Laisser refroidir le gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium, en dessous de 50°C, couler dans le moule et insérer un peigne afin de former des puits.

Oter le peigne après complet refroidissement de l'agarose et placer le gel dans une cuve à électrophorèse horizontale, contenant du tampon TBE dilué.

Déposer dans les puits les échantillons, contenant 1/5 volume de tampon de dépôt.

Un voltage de 20 à 70 Volts est appliqué, le bleu de bromophénol et le xylène cyanol permettent de visualiser deux fronts de migration, le gel est observé sous lumière ultraviolette.

ANNEXE 3 : Solutions et réactifs utilisés en microscopie électronique

1 - Préparation des solutions

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

Chlorure de sodium 2% et 10% en eau distillée

Tampon cacodylate pH 7,4 :

	1000 mOsm	
Cacodylate de sodium	50 ml du stock à 0,4M	
NaCl	20 ml du stock à 10%	
Eau distillée	30 ml	
Ajuster le pH à 7,4		

Glutaraldéhyde 3% :

	1000 mOsm	
Glutaraldéhyde à 25%	2,5 ml	6
Cacodylate de sodium 0,4 M	5 ml	12
NaCl 10%	3,5 ml	3,4
Eau distillée	9 ml	21,6

Acide osmique 1% :

	1000 mOsm	
Acide osmique à 4%	1 vol.	
Cacodylate de sodium 0,4 M	1 vol.	
NaCl	1 vol. du stock à 10%	
Eau distillée	1 vol.	

EDTA 5%

EDTA disodique	5 g
Tampon cacodylate	100 ml

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

Mélange Epon

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

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

2 - Préparation des réactifs utilisés pour le contraste des coupes

Acétate d'uranyle :

Solution stock à 5% en eau distillée

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

Citrate de plomb :

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

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

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