

Les virus infectant les mollusques marins : un exemple d'actualité, les herpès virus



Par Tristan RENAULT

Laboratoire de Génétique et Pathologie
17390 La Tremblade
France

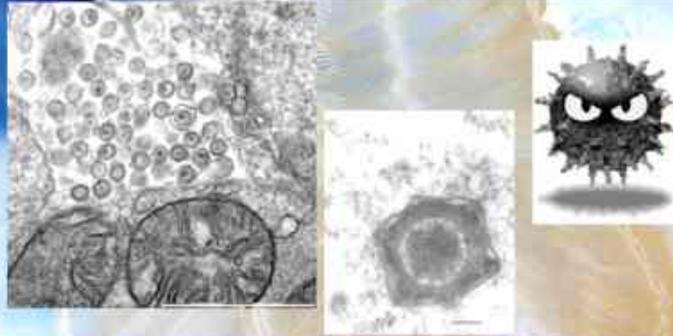
ifremer

Toutes sortes d'agents infectieux chez les mollusques



Des parasites métazoaires et protozoaires, des bactéries et des virus sont décrits chez les coquillages comme responsables de maladies

Différents virus rapportés chez les mollusques

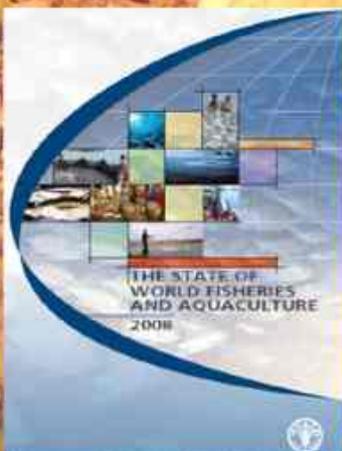


- Des virus interprétés comme appartenant aux familles des Iridoviridae, Papovaviridae, Togaviridae, Reoviridae, Birnaviridae et Picornaviridae
- Des herpes virus

Pourquoi s'intéresser aux maladies virales chez les mollusques?



L'aquaculture : une activité en développement



Une activité en développement avec une progression d'environ 9% par an, des années 50 à aujourd'hui

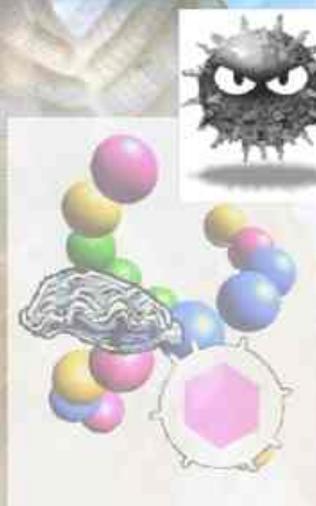
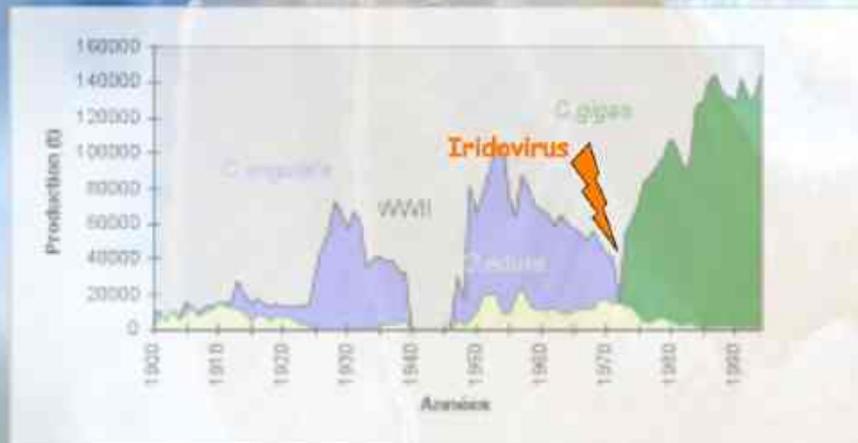
- 1950 : 1 million de tonnes
- 1996 : 34,1 millions de tonnes pour une valeur de 46,5 milliards de US\$
- 2006 : 51,7 millions de tonnes pour une valeur de 78,8 milliards US\$

La conchyliculture : une activité économique d'importance

Mollusques : groupe d'importance économique majeure au niveau mondial et au niveau français

14,1 millions de tonnes, 27% de la production mondiale d'aquaculture pour une valeur de 11,9 milliards US\$ en 2006 dont 4,6 millions de tonnes d'huîtres (FAO, 2008)

Les maladies infectieuses : un risque majeur en conchyliculture



FOCUS
sur les virus de type herpès infectant les bivalves marins (huîtres)

Une très large distribution géographique des virus de type herpès



De nombreuses espèces hôtes



Crassostrea virginica
C. gigas
Ostrea edulis
O. angasi



Tiostrea chilensis
Ruditapes decussatus
R. philippinarum
Pecten maximus
Chlamys farreri



Haliotis diversicolor supertexta
Haliotis laevigata
Haliotis rubra

Infections virales décrites chez différentes espèces de mollusques en association à des épisodes de mortalité

Des travaux depuis 1991 en France

1991 : Première détection d'un virus de type herpes associé à des mortalités (90-100%) d'huîtres creuses en éclosion, en France

1992 : Démonstration du pouvoir pathogène du virus au stade larvaire

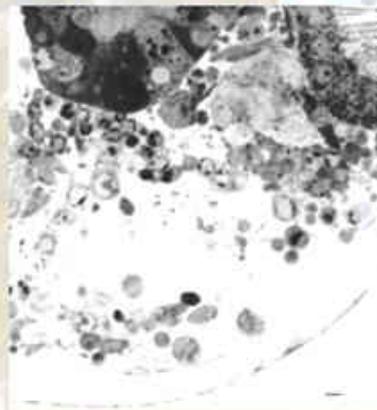
1993 : Description d'un virus de type herpes associé à des mortalités (40 à 80 %) de naissain d'huître creuse sur estran (en période estivale) et en nurserie

Signes de l'infection



Section semi-fine d'une larve d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, infectée.

Lésions du velum chez une larve d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, infectée



Description d'un virus de type herpès

Particules virales enveloppées avec présence d'une capside et d'un nucléoïde

Capside icosaédrique (72-75 nm)

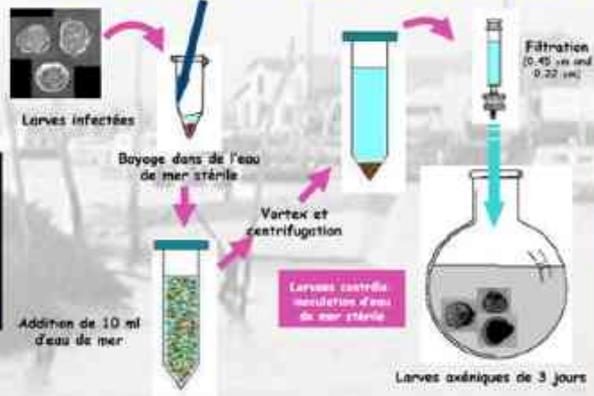
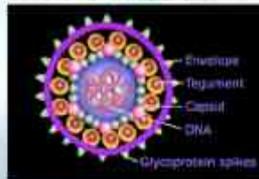
Enveloppe (90-120 nm)

Core

Caractéristiques morphologiques des particules virales similaires à celles des herpès virus

Reproduction expérimentale de l'infection virale

Infection expérimentale de larves axéniques



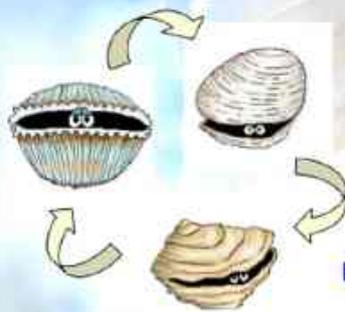
1995 : Purification du virus infectant les larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas* (une première pour un virus infectant un coquillage)

A partir de 1996

- Identification du virus : séquençage complet de son génome
- Développement d'outils de diagnostic (PCR, hybridation *in situ*, PCR *in situ*, anticorps, PCR en temps réel, mini-array)
- Utilisation des outils développés dans des approches épidémiologiques

OsHV-1, un virus infectant les huîtres creuses en France

Description chez les huîtres creuses en France (larves et naissain)



Pouvoir pathogène et transmission (infections expérimentales)

Purification du virus (extraction de l'ADN viral, clonage, séquençage...)

Développement d'outils de diagnostic

Caractérisation du génome viral

Génome du virus OsHV-1

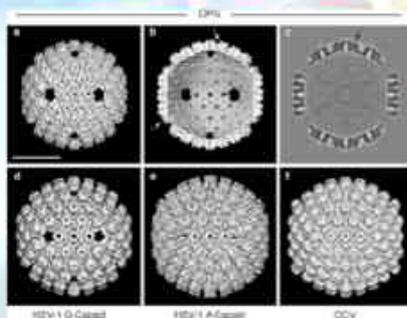
Structure du génome (double brin linéaire de 207 kpb) comparable à celle de certains herpes virus de vertébrés (herpes simplex virus and human cytomegalovirus)



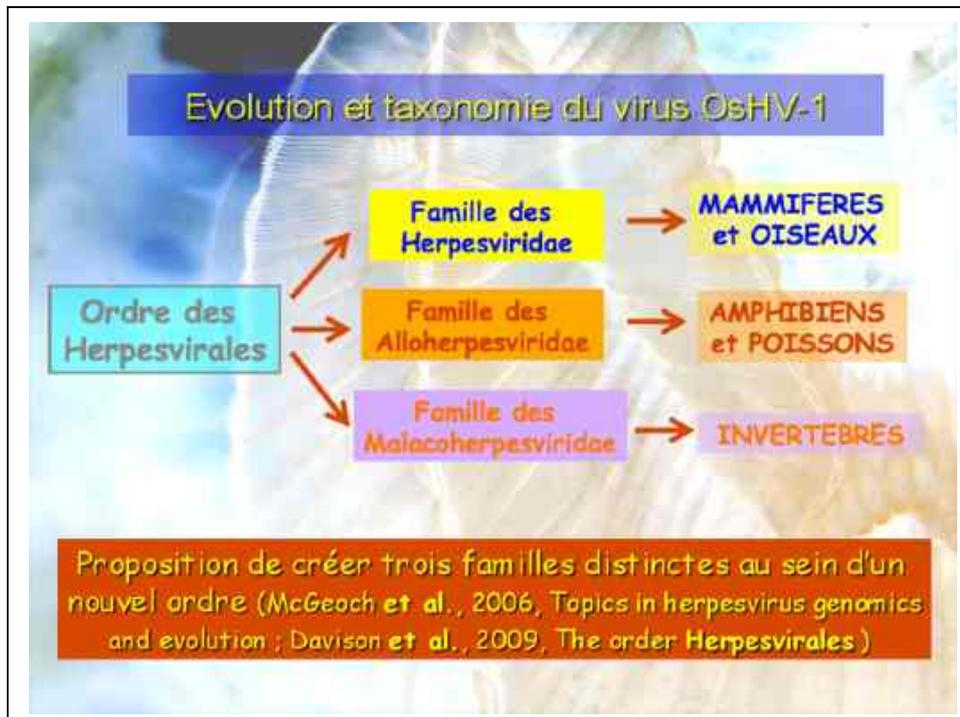
Cependant, OsHV-1 ne ressemble pas aux herpes virus infectant les vertébrés sur la base de gènes qu'il code (très peu d'homologies avec les herpes virus connus)

Caractérisation du virus OsHV-1

Indication d'une origine commune à OsHV-1 et herpes virus des vertébrés : gène codant pour la sous-unité ATPase d'une terminase (présente chez tous les herpes virus)



Analyses en cryomicroscopie et reconstitution en 3D de capsides purifiées à partir de larves infectées (162 capsomères dont 12 pentamériques et 150 hexamériques) : structure de la capside identique à celle d'autres herpes virus



Développement d'outils de diagnostic spécifiques

Histologie - Microscopie électronique

PCR - Hybridation in situ - Anticorps

Développement de différentes techniques de PCR sur la base de données de séquençage du génome

Journal of Virological Methods 144 (2008) 17–26

ScienceDirect

Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France

Tristan Rausch^{a,*}, Ros-Maria Le Duff, Cécile Lipart, Claude Debet

^a Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, BP 101, 17000 La Rochelle, France

Journal of Virological Methods 144 (2008) 209–216

ScienceDirect

Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: A critical review

Fredéric H. Baillat^{a,b}, Isabelle Auzat^a, Jean-François Papiot^a, Françoise Buisson^a, Caroline S. Desbrières^c, Pierre Hingray^c, Tristan Rausch^d

^a Institut National de Recherche pour l’Exploitation de la Mer (INRIMER), IFREMER, BP 101, 17000 La Rochelle, France

^b Centre de Recherche pour l’Exploitation de la Mer (CEREM), IFREMER, BP 101, 17000 La Rochelle, France

^c Centre National de Référence pour l’Hépatite A, HAN, IFREMER, BP 101, 17000 La Rochelle, France

^d Laboratoire de Génétique et Pathologie, IFREMER, BP 101, 17000 La Rochelle, France

Journal of Virological Methods 144 (2008) 209–216

ScienceDirect

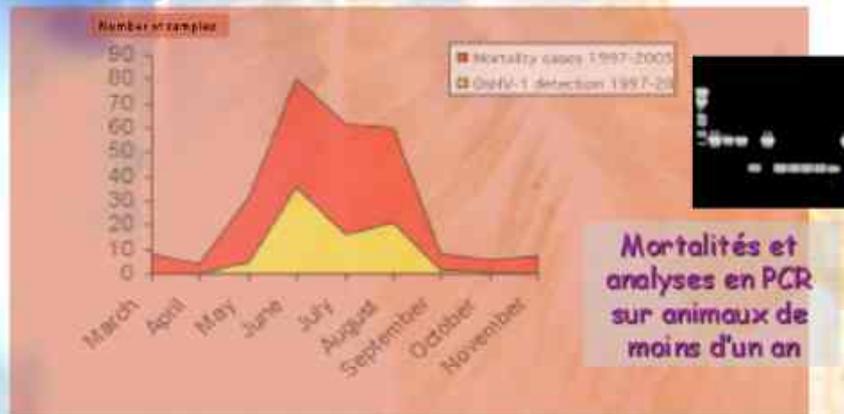
Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR

J.F. Papiot^a, A. More, T. Bernitt

^a Centre National de Référence pour l’Hépatite A, HAN, IFREMER, BP 101, 17000 La Rochelle, France

Analyses réalisées dans le cadre de REPAMO entre 1997-2005

Analyses en PCR sur animaux de moins d'un an



De nouvelles orientations pour les travaux de recherche

Le virus et son hôte

Depuis 2000

- Recherche de molécules à activité antivirale chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dans le cadre d'un projet européen (AVINSI) et d'une thèse
- Recherche de gènes vira-induits en présence du virus OsHV-1 chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dans le cadre d'un projet européen (AVINSI) et d'une thèse
- Bases génétiques de la résistance au virus OsHV-1 chez l'huître creuse

Bases génétiques de la résistance au virus

Status	Family	N	Positive	Negative	Prevalence (% of infected individuals)
Dead individuals	R*X	0*	-	-	-
	R*O	150	142	8	94,67
	Z*AC	150	143	7	95,33
Living individuals	R*X	96	9	87	9,38
	R*O	107	89	18	83,18
	Z*AC	102	81	21	79,41

* No mortality recorded in the R*X family

Les surmortalités d'huîtres creuses en France et en Europe : une actualité pressante



Mortalités anormales d'huîtres creuses depuis 2008 en France

Animaux affectés

- Uniquement l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, atteinte
- Majoritairement animaux de classes d'âge inférieur à 18 mois avec des pourcentages de mortalité variant de 40 à 100%

Mortalités d'huîtres creuses rapportées en Irlande, à Jersey et en Angleterre

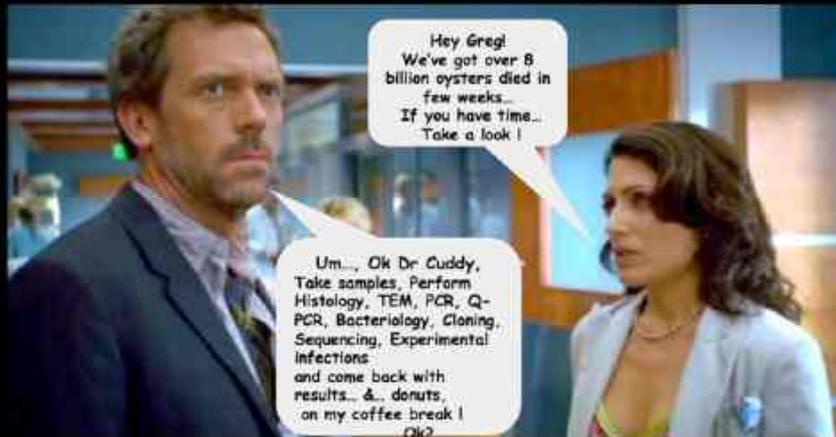
Prélèvements - Mai à septembre 2008

- ↪ 51 lots de *Crassostrea gigas*
- ↪ 50 - 100 individus par lot
- ↪ 5 lots d'adultes, 23 lots de juvéniles, 21 lots de naissain, 2 lots de larves
- ↪ 27 constats dans le cadre de Repamo



D'après Jean-Francois Pepin

SUMMER MORTALITY - SEASON 9 - Episode 17



Recherche et détection du virus OsHV-1

• PCR et PCR en temps réel

Détection d'OsHV-1 (76% en 2008, 95% en 2009 et 89% en 2010)

Plusieurs cas de co-détection du virus OsHV-1 et *Vibrio splendidus* et/ou *V. aestuarianus*

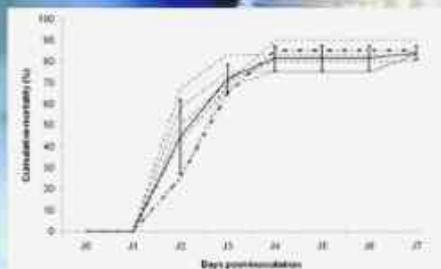


Recherche et détection du virus OsHV-1

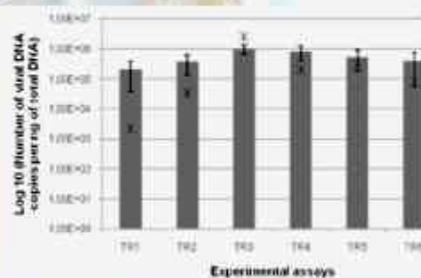
- Essais de pathologie expérimentale



OsHV-1 : infection par injection



Mortalités cumulées de naissain après injection intra-musculaire de broyats d'huîtres infectées (6 essais)



Quantité d'ADN viral détecté dans les animaux morts après injection intra-musculaire de broyats d'huîtres infectées (6 essais)

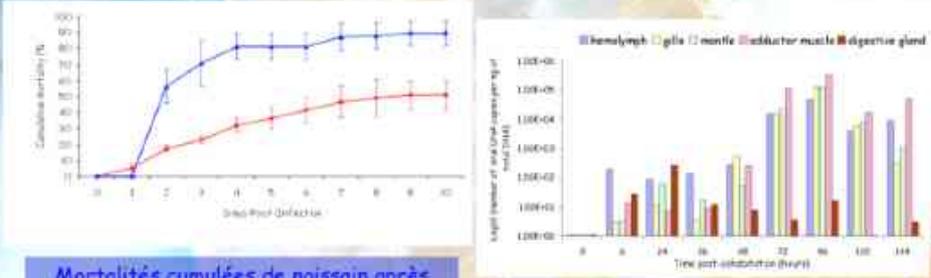
Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by Ostroid herpesvirus 1 (OsHV-1): development of an experimental protocol and demonstration of *C. gigas* spat susceptibility (2011) D. Schikowski, T. Renault, D. Sautier, J. Faury, P. Marsau and J. F. Papin. (Veterinary Research)

OsHV-1 : infection par injection



• Microscopie électronique à transmission
 Détection de particules virales de type herpès
 Détection de nombreuses L particules

OsHV-1 : infection par baignation



Mortalités cumulées de naissain après injection intra-musculaire et après contact

Quantification de l'ADN viral dans différents tissus après contamination par baignation

Experimental Ostroid herpes virus 1 (OsHV-1) infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples (2011) D. Schikowski, H. Faury, J. F. Pospin, D. Saulnier, B. Tourbiac and T. Renault (Virus Research)

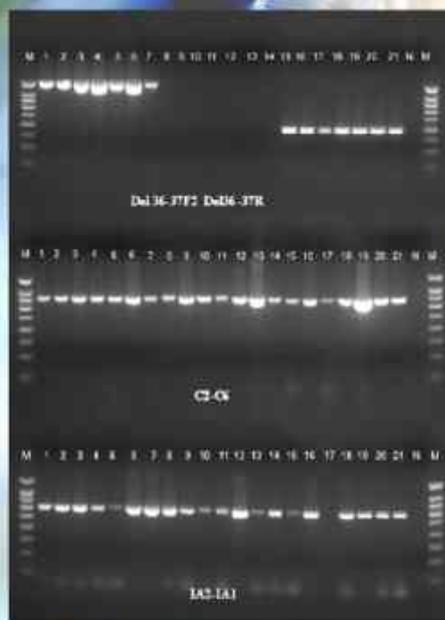
Recherche et détection du virus OsHV-1

- **Comparaison de séquences**

Recherche du génotype OsHV-1 μ Var dans des échantillons archivés (ORF4, ORFs 35/36/37/38 et ORFs 42/43)

Parmi 67 lots archivés d'huîtres infectées collectées entre 1993 et 2010 en France, USA, Japon, Chine et Nouvelle Zélande

Polymorphisme du virus OsHV-1



Produits de PCR : tailles identiques pour l'ensemble des échantillons pour les ORF4 ORFs 42/43

3 types de profil observés pour la région de l'ORF37 : 589 pb, 334 pb et absence d'amplification (une délétion de 605 caractérisant les isolats de type OsHV-1 μ var)

Polymorphisme du virus OsHV-1

- ORF4 (460 pb) : 82 mutations définissant 19 groupes
- ORFs 35/36/37/38 (856 pb et 298 pb) : polymorphisme restreint à l'exception d'une délétion de 605 pb
- ORFs 42/43 (509 pb) : 2 mutations définissant 3 groupes

Deux groupes majeurs (ORF4, ORFs 35/36/37/38 et ORFs 42/43) regroupant :

- d'une part, les isolats français prélevés de 1993 à 2008 (*GenBank accession n° AY509253*)
- et d'autre part, certains échantillons français collectés en 2008 et les échantillons prélevés en 2009 et 2010 (OsHV-1 μ Var) (*GenBank accession n° HQ842610*). Les échantillons provenant de Chine, du Japon et de Nouvelle Zélande apparaissent comme proches de ce groupe

Polymorphisme du virus OsHV-1



Perspectives

Séquençage du génome complet de différents isolats (espèces, origines géographiques, années, ...) : évolution du virus (virulence)

Cinétique d'expression des gènes (gènes très précoces, précoces et tardifs) : mieux connaître le génome viral

Mieux connaître les fonctions des protéines virales (production de protéines virales recombinantes)

Perspectives

Etudier les interactions virus et hôte (pathologie expérimentale et métabolomique)

Etudier les interactions virus, hôte et environnement (métabolomique)

Identifier des marqueurs de sélection potentiels

