

DEPISTAGE DU VIRUS *Ostreid herpesvirus-1* CHEZ L'HUITRE CREUSE DU PACIFIQUE *Crassostrea gigas* COLLECTEE DANS UN ELEVAGE CONCHYLICOLE SITUE DANS LA LAGUNE DE BIZERTE

Yacine BELKHOJDA¹, Dorsaf EL AMRI², Rym KLEIFT², Ines NJEH³,
Zied BOUSLAMA⁴ et Inès TLIBA³.

1 : Ecole nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet. 2020 - Sidi Thabet, Ariana, Tunisie.

2 : Institut National des Sciences et Technologie de la Mer, La Goulette. Port de pêche-2060-La Goulette, Tunisie.

3 : Direction Générale des Services Vétérinaires. 30, rue Alain Savary-1002-Tunis le Belvédère.

4 : Institut Pasteur Tunis. Avenue Jugurtha, Tunis, Tunisie.

RESUME

L'infection de l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* par le virus *Ostreid Herpesvirus-1* constitue une maladie grave générant des mortalités parfois catastrophiques. De tels phénomènes pourraient entraver le développement du secteur ostréicole en Tunisie. Cet article présente les résultats d'une étude dont l'objectif est la détection de ce virus, par les techniques de PCR conventionnelle et de PCR en temps réel en utilisant les couples d'amorces spécifiques C2/C6 et OsHVDPFor/OsHVDPRev chez 320 huîtres creuses issues d'un élevage ostréicole situé dans la lagune de Bizerte. Les résultats obtenus par les deux techniques se sont révélés négatifs pour tous les échantillons analysés, laissant supposer qu'il n'existe pas de circulation virale au sein de l'élevage durant la période d'échantillonnage et que les huîtres analysées sont indemnes de l'herpesvirose.

ABSTRACT

The infection of the cupped Pacific oyster *Crassostrea gigas* by the virus *Ostreid herpesvirus-1* is a serious disease which may induce catastrophic mortalities. Such phenomena may hinder the development of the oyster industry in Tunisia. This article presents a study whose objective was the detection of this virus, by the techniques of conventional PCR and real time PCR, using specific primer pairs C2/C6 and OsHVDPFor/OsHVDPRev, among 320 Pacific cupped oysters from an oyster farm located in the lagoon of Bizerte. The results obtained by the two techniques were negative for all of the analyzed samples, suggesting that there was no virus circulation within the livestock during the sampling period and that the oysters analyzed were free of herpes virus.

INTRODUCTION

L'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* représente l'espèce de mollusque bivalve la plus commercialisée dans le monde avec une production de 626 milles tonnes en 2014 (FAO, 2015). En Tunisie, cette activité est pratiquée essentiellement dans la lagune de Bizerte (extrême Nord de la Tunisie). La moyenne annuelle des quantités produites est de l'ordre de 8 tonnes (DGPA, 2015).

Le virus *Ostreid herpesvirus-1* (OsHV-1) est considéré comme l'un des agents infectieux majeurs causant des pertes considérables au sein des populations de *C. gigas*. C'est un virus à ADN double brin appartenant à l'ordre des Herpesvirales et classé dans la famille des *Malacoherpesviridae* (Davison et al. 2005). Il est responsable de mortalités massives qui intéressent surtout les jeunes spécimens (larves, naissains et juvéniles). L'implication de l'*Ostreid herpesvirus-*

1 dans les épisodes de mortalité a fait que cette affection figure parmi la liste des maladies de l'organisation mondiale de la santé animale jusqu'à l'année 2014. En Tunisie, le virus OsHV-1 a été détecté dans la lagune de Bizerte à deux reprises en 2010 (El Mabrouk 2012) et en 2012 lors d'un épisode de mortalité observée chez des naissains d'huître creuse (Ben Aissa 2013). En l'absence de possibilité actuelle d'isolement en culture cellulaire ou de diagnostic immunologique, le diagnostic de ce pathogène repose essentiellement sur des outils de biologie moléculaire.

Ainsi, des enquêtes épidémiologiques visant le suivi du virus OsHV-1 dans les élevages ostréicoles est d'une importance capitale. Ce présent travail constitue une étude de la prévalence de ce virus chez des huîtres creuses du Pacifique, prélevées dans un élevage conchylicole situé dans la lagune de Bizerte, par le biais d'outils moléculaires en appliquant la *polymerase chain reaction* (PCR) conventionnelle et en temps réel.

MATERIEL ET METHODES

Echantillons d'huîtres

Les huîtres qui ont fait l'objet de cette étude ont été collectées à partir d'une ferme située dans le sud de la lagune de Bizerte (région de Jouaouda). Seize visites ont eu lieu entre juin 2013 et mai

2015 conduisant à l'échantillonnage d'un nombre total de 320 huîtres (tableau I). Un témoin positif fourni par le laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (LGP2M, IFREMER – La Tremblade, France) a été utilisé lors de ce travail.

Tableau I : Données relatives aux prélèvements

Numéro de l'échantillon	Date du prélèvement	Date de mise à l'eau	Age (jours)	Stade de développement
1	9 Juin 2013	3 décembre 2012	554	Juvéniles
2	9 Juillet 2013	3 décembre 2012	584	Adultes
3	9 Aout 2013	3 décembre 2012	614	Adultes
4	9 Octobre 2013	31 janvier 2013	251	Naissains
5	16 Novembre 2013	31 janvier 2013	289	Naissains
6	14 Avril 2014	31 janvier 2013	436	Juvéniles
7	14 Mai 2014	31 janvier 2013	466	Juvéniles
8	14 Juin 2014	31 janvier 2013	498	Juvéniles
9	16 Septembre 2014	7 février 2014	221	Naissains
10	20 Octobre 2014	7 février 2014	255	Naissains
11	21 Novembre 2014	7 février 2014	287	Naissains
12	20 Décembre 2014	7 février 2014	316	Naissains
13	15 Janvier 2015	7 février 2014	342	Naissains
14	17 Février 2015	7 février 2014	375	Juvéniles
15	9 Avril 2015	7 février 2014	426	Juvéniles
16	9 Mai 2015	7 février 2014	456	Juvéniles

Préparation des échantillons d'huîtres, extraction et quantification de l'ADN

Les animaux prélevés à chaque visite n'ont pas été analysés individuellement mais ont été regroupés pour former un pool analysé globalement. L'extraction de l'ADN total a été réalisée à partir des manteaux, organe de prédilection du virus OsHV-1, en utilisant un kit d'extraction (QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen, Courtabœuf, France). La concentration et la qualité de l'ADN extrait ont été évaluées à l'aide d'un NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA).

Amplification de l'ADN viral et révélation du résultat

L'amplification moléculaire du virus OsHV-1 a

été réalisée en premier lieu par des PCR conventionnelles dont les résultats ont été révélés suite à une électrophorèse horizontale sur un gel d'agarose à 1,5%.

Ensuite, les résultats ont été confirmés par des PCR en temps réel SYBR® Green dont les résultats ont été interprétés par l'utilisation du logiciel 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Life Technologies, version 2.0.6) par comparaison de la Ct (cycle seuil) et la Tm (température de fusion) de chaque échantillon avec le témoin positif.

Ces deux techniques ont nécessité deux couples d'amorces distincts (tableau II).

Tableau II : Amorces utilisées dans les PCR conventionnelles et les PCR en temps réel

Amorces	Séquences (5'-3')	Région cible	Tailles (pb)	Références bibliographiques
C2*	CTCTTTACCATGAAGATACCCACC	Deux protéines de fonction inconnue	710	RENAULT et ARZUL, 2001
C6*	GTGCACGGCTTACCATTTT			
OsHVDPFor**	ATTGATGATGTGGATAATCTGTG	ADN polymérase	197	WEBB et coll., 2007
OsHVDRV**	GGTAAATACCATTTGGTCTTGTTC			

*PCR conventionnelle

** PCR en temps réel

RESULTATS

Résultats des PCR conventionnelles

Après visualisation du gel d'agarose contenant les produits PCR sous lumière ultra-violette, tous les prélèvements se sont révélés négatifs, et seul le

témoin positif a révélé une bande de 710 pb (figure 1).



Figure 1: Résultat de l'amplification de l'ADN à l'aide des amorces C2/C6 (710 pb) sur gel d'agarose à 1,5%.

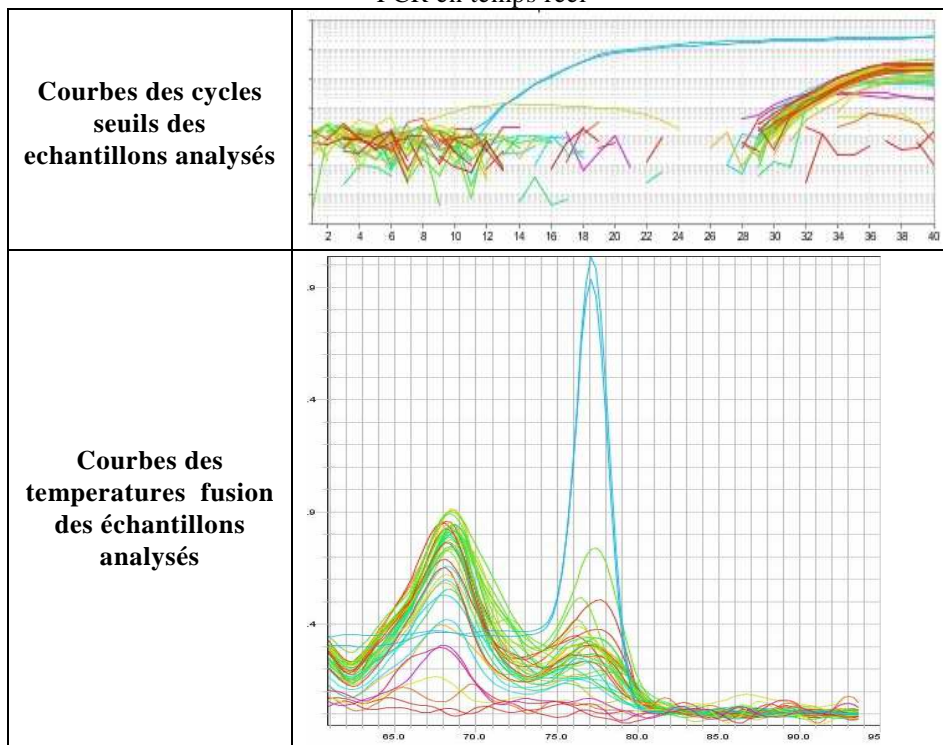
Mq : 100 pb, puits 1-6 : ADN d'huîtres, puits 7 : T-extraction (eau sans ADN), puits 8 : T-PCR (eau), puits 9 : T+ d'extraction

Résultats des PCR en temps réel

En comparant les courbes des Ct (*Cycle threshold* ou cycle seuil) et des Tm (*melting temperature* ou température de fusion) des échantillons analysés

avec celles du témoin positif (courbes bleues), tous les résultats se sont révélés négatifs (tableau III).

Tableau III : courbes des Ct et des Tm des différents échantillons analysés par la technique PCR en temps réel



DISCUSSION

Plusieurs enquêtes menées dans le monde et en Tunisie suite à l'observation de phénomènes de mortalité anormale affectant l'huître creuse *C. gigas* ont conclu à l'existence d'une relation entre

ces mortalités et la détection de l'*Ostreid herpesvirus-1*. Pour limiter ces phénomènes de mortalité dans notre pays et mettre en œuvre un programme de lutte à l'encontre de ce virus, des études épidémiologiques approfondies sont nécessaires. Ainsi, une enquête épidémiologique

menée par la Direction Générale des Services Vétérinaires en collaboration avec l'Institut National des Sciences et Technologie de la Mer (annexe de La Goulette) a permis de mettre en œuvre cette enquête. Le but était le suivi de la prévalence de l'*Ostreid herpesvirus-1* chez l'huître creuse *C. gigas* dans une ferme ostréicole de la lagune de Bizerte, pendant les années 2013, 2014 et 2015.

Au total, 320 huîtres ont été prélevées entre juin 2013 et mai 2015, moyennant 16 visites. Ce plan d'échantillonnage a permis de réaliser une enquête longitudinale permettant un suivi de la présence du virus OsHV-1 afin de calculer son incidence.

Le développement de l'infection par l'OsHV-1 dépend étroitement de la saison, de l'activité sexuelle de l'huître et de l'âge des animaux ; ainsi, l'échantillonnage a été réalisé aussi bien lors des saisons chaudes, où les huîtres sont en activité sexuelle intense et la température de l'eau est élevée, que lors des périodes où les huîtres sont en repos sexuel et la température de l'eau est faible. De même, il a intéressé les animaux sensibles (naissains et juvéniles) et les porteurs asymptomatiques du virus (adultes).

Le diagnostic et le dépistage du virus OsHV-1 reposent essentiellement sur l'utilisation de techniques de biologie moléculaire représentées principalement par les techniques de PCR conventionnelle et de PCR en temps réel.

La PCR conventionnelle est une technique approuvée pour la détection du virus OsHV-1 par l'utilisation de différents couples d'amorces. En se référant à l'article de Batista et al. (2007) qui est une revue critique portant sur la détection de l'ADN de l'OsHV-1 par la technique de PCR conventionnelle, une multitude de couples d'amorces ont été cités, mais plusieurs d'entre eux présentent un ou plusieurs inconvénients pouvant compromettre notre étude. Le choix s'est porté sur le couple d'amorce C2/C6, pour deux raisons : la région ciblée est présente en double exemplaire sur l'ADN du virus puisqu'elle se trouve dans une région génomique à répétition (région C et C') augmentant ainsi les chances d'une éventuelle amplification, et il permet de distinguer entre la souche de référence OsHV-1 et le variant OsHV-1var (Renault et Arzul 2001).

Afin de s'assurer qu'il n'existe pas un faible niveau d'infection, nous avons ensuite eu recours à la PCR en temps réel SYBR Green qui constitue la technique de référence pour le diagnostic du virus OsHV-1 (OIE 2014) ; elle a été approuvée pour la détection de ce virus par l'utilisation de différents couples d'amorces (Pepin et al. 2008). Le couple d'amorces OsHVDPFor / OsHVDPRev qui a été choisi pour la détection du virus OsHV-1 par la technique de PCR en temps réel admet pour

région cible l'ADN polymérase amplifiant des fragments d'une taille de 197 pb selon le cadre de lecture ORF100 (Webb et al. 2007).

Suite aux analyses effectuées avec les deux techniques de PCR, conventionnelle et de PCR en temps réel, nous avons constaté que sur les 320 huîtres prélevées pendant les années 2013, 2014 et 2015, aucun échantillon ne s'est révélé positif. Nous pouvons donc conclure que la prévalence de l'herpesvirose chez les huîtres dans l'élevage étudié durant cette période est inférieure à 3% avec un risque d'erreur de 5%.

En Tunisie, les enquêtes réalisées dans le cadre des travaux d'El Mabrouk (2012) et Ben Aissa (2013) ont montré des taux d'infection par le virus OsHV-1 respectifs de 90% et de 10%. Il est à noter que les chercheurs supposent que ces infections seraient dues à une propagation du virus dans le site d'élevage suite à l'introduction de naissains contaminés. En France, les analyses réalisées par le réseau REPAMO pendant l'année 2014 ont montré un taux d'infection de 77% (Repamo, 2014). En Italie, une enquête menée par Serracca et al. (2015) sur des huîtres collectées dans le golfe de Zpezia (Italie) a révélé qu'en 2013 les taux d'infection étaient de l'ordre de 25,4% ; tandis qu'en 2014, aucune détection du virus herpétique n'a été rapportée. Cette enquête mentionne aussi que tous les animaux qui se sont révélés positifs pendant cette enquête avaient pour origine des écloséries françaises ; les huîtres originaires d'écloséries italiennes étant par contre indemnes de ce pathogène.

CONCLUSION

La présente étude nous a permis de conclure à l'absence quasi-certaine du virus *Ostreid herpesvirus 1* dans la ferme dont proviennent les échantillons pendant les années 2013, 2014 et 2015. En tenant compte du fait que les naissains sujets d'élevage ont pour origine des écloséries françaises, que ces dernières ont présenté plusieurs cas d'infection par ce virus pendant les dernières années, et que les enquêtes réalisées dans notre pays et dans des pays voisins notamment en Italie ont rapporté que les naissains importés d'écloséries françaises seraient à l'origine de cette infection, il est important de mettre en œuvre un réseau de surveillance de l'*Ostreid herpesvirus 1*. Ce réseau aurait pour but le dépistage systématique de ce pathogène au moment de l'importation de naissains afin de s'assurer de sa non réintroduction dans nos sites d'élevage. Une base juridique qui règlemente le réseau de surveillance de ce pathogène serait d'un grand intérêt. Ce réseau doit s'inscrire dans le cadre d'une approche intégrée avec surveillance des

principaux pathogènes et contrôle des paramètres d'élevage.

REMERCIEMENT

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet **SecurAqua** PS1.3.020 "Sécurité et Qualité des Produits Aquacoles le Développement d'une Voie Commune Tuniso-Sicilienne" co-financé par l'Union Européenne à travers la coopération transfrontalière Italie-Tunisie (Programme Instrument Européen de Voisinage et de Partenariat-IEVP).

BIBLIOGRAPHIE

- Batista, R., Humberto, J. L., Chiari, E. & Oliveira, A. B. (2007). Bioorg. Med. Chem. 15, 381–391.
- Ben Aissa G. (2013). Diagnostic et caractérisation moléculaire de l'herpès virus OsHV-1 chez les huîtres (*Crassostrea gigas*). *Mémoire de Master en Sécurité Alimentaire des Aliments*, Faculté des Sciences de Bizerte.
- Davison A.J., Trus B.L., Cheng N., Steven A.C., Watson M.S., Cunningham C., Le Deuff R.M. et Renault T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.*, 86: 41-53.
- DGPA (2015) (Direction générale de la pêche et de l'aquaculture) *Annuaire statistique*.
- El Mabrouk M. (2012). Détection de l'OsHV-1 chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Mémoire de Master en production et écosystèmes aquatique*, Institut National Agronomique de Tunis, 58 p.
- FAO (2015). Fisheries and Aquaculture Department.
- OIE (2014). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Chapitre 2.4.9: infection with *Ostreid herpesvirus 1* microvariants.
- Pepin J.F., Riou A. et Renault T. (2008). Rapid and sensitive detection of *Ostreid herpesvirus 1* in oyster samples by real-time PCR. *J. Virol. Methods*, 149: 269-276.
- Renault T. et Arzul I. (2001). Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *J. Fish. Dis.*, 24: 161-167
- REPAMO (2014) (Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins), Bilan.
- Serracca L., Rossini I., Battistini R. and Ercolini C. (2015). Mortality and *Ostreid herpesvirus 1* infection in the pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Gulf of La Spezia, Italy. *Aquacult Int.*, 24 (1): 199-209
- Webb S.C., Fidler A. et Renault T. (2007). Primers for PCR-based detection of *Ostreid herpesvirus-1* (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*, 272: 126-139.