

Herpesvirus observé chez les huîtres - Resultats août 1995/avril 1996

Les travaux concernant le virus de type herpès, observé chez les huîtres, ont été poursuivis en 1995-1996 et ont ainsi permis d'aboutir à la mise au point d'un protocole de purification du virus, malgré l'ensemble des difficultés rencontrées (impossibilité de reproduire le virus sur lignées cellulaires, dépendance vis à vis des professionnels pour l'approvisionnement en matériel infecté et difficulté de planifier les expériences). De ce fait, le point de blocage que représentait l'obtention de particules virales en nombre suffisant pour le développement d'outils de diagnostic fiables et sensibles a été levé.

Etude des cas de mortalités

L'étude de ces cas concerne essentiellement l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, pour l'année 1995, avec comme objectif fixé d'essayer de préciser les relations mortalités et infection à virus de type herpès. 2378 huîtres (stade naissain) provenant de l'ensemble du littoral français ont ainsi été analysées sur coupes histologiques. 206 individus présentaient des anomalies cellulaires et nucléaires laissant suspecter une infection virale à herpès virus. Ces animaux provenaient de 52 lots différents.

Essais de reproduction de l'infection virale

Divers essais ont été menés au cours de l'année 1995, afin de reproduire la maladie au laboratoire.

Il a été ainsi possible de reproduire comme les années précédentes, l'infection chez des larves axéniques par inoculation dans les ballons d'élevage de broyats de larves virosées. Ce résultat est intéressant dans la mesure où il montre qu'il est possible, grâce à la congélation de matériel virosé, de reproduire la maladie à tout moment. De plus, il a été possible d'infecter expérimentalement des larves conventionnelles, en inoculant dans les bacs d'élevage des larves axéniques virosées expérimentalement. Ce type d'infection permet d'obtenir de plus grandes quantités d'animaux virosés. Cette approche a été développée dans le but de disposer de quantités de matériel biologique suffisantes pour entreprendre des essais de purification.

Quelques essais ont été également réalisées sur naissains et adultes. Dans ce cas, aucune mortalité n'a été observée chez les animaux ayant subi les essais.

Purification

En effet, il a été possible de purifier à plusieurs reprises des particules virales à partir de larves virosées fraîches. Cependant, le même protocole testé sur des lots de naissains présentant des mortalités anormales n'a pas permis d'aboutir à un résultat probant.

Par ailleurs les essais effectués à partir de larves ou de naissains virosés conservés congelés à -20°C, ont été infructueux.

Extraction de l'ADN viral, clonage et séquençage

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

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

- De cloner des fragments de l'ADN extrait des particules virales purifiées, après digestion par l'enzyme EcoRI. Le clonage a été réalisé en plasmide Bluescript II KS (-). Ce

type de clonage permet d'obtenir relativement rapidement des sondes nucléiques adéquates pour l'obtention d'outils spécifiques de diagnostic. Quatre des fragments clonés ont été choisis en fonction de leur longueur différente, afin de vérifier leur spécificité. Les premiers essais d'hybridation sur membrane ont donné des résultats très positifs. En effet, les quatre fragments testés donnent un marquage net sur les ADN extraits de larves et de naissains virosés et pas de marquage sur de l'ADN extrait d'huîtres creuses adultes saines.

- Suite à ces résultats, le séquençage de ces quatre fragments clonés a été entrepris par C. Delsert (IFREMER, Sète), afin de pouvoir définir des zones propices à la construction de couples d'amorces pour la PCR. Nous disposons à l'heure actuelle d'amorces qui nous permettent d'obtenir une amplification claire sur ADN viral purifié, sur ADN extraits de larves virosés, sur broyats de larves et de naissains infectés et une absence d'amplification sur ADN d'huîtres adultes saines. Une méthodologie a été ainsi définie au laboratoire de La Tremblade pour le traitement des échantillons de larves et de naissain présentant des mortalités.

- D'envoyer au Dr A. Davison (Medical Research Council Virology Unit, Glasgow) de l'ADN viral extrait de particules purifiées afin qu'il puisse réaliser le séquençage complet du génome viral et le comparer à d'autres virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*.

Obtention d'anticorps spécifiques du virus

Trois souris BalbC ont été immunisées avec du virus purifié. Les sérums et les ascites (contenant des anticorps spécifiques) ont été récupérés après sacrifice des animaux. L'une des ascites montre une réactivité claire sur coupes histologiques de tissus d'huîtres infectées. Par ailleurs, les animaux immunisés ont également servi à réaliser une fusion lymphocytaire dans le but d'obtenir des anticorps monoclonaux spécifiques du virus. Les analyses pour cette dernière expérimentation sont en cours.