

67104
E700.HOR.A

Ifremer

IFREMER, Laboratoire de
Génétique et Pathologie (LGP)
17390 La Tremblade



MOREAU Kévin

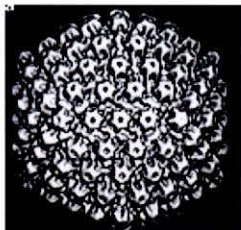
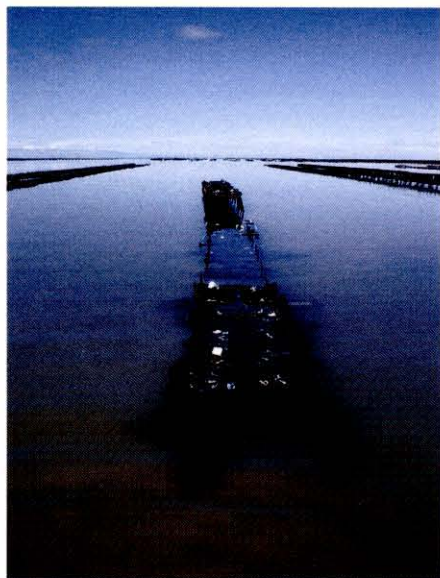
Master du Muséum National d'Histoire Naturelle

Mention Evolution, Patrimoine Naturel et Sociétés

Spécialité : Unité Diversité du Vivant (UDV)

Parcours : Toxines et Ecosystèmes

Stage effectué du 17 janvier 2005 au 17 juillet 2005



**Approche moléculaire des effets de polluants sur
l'infection à virus OsHV-1 (Ostreid Herpesvirus 1)
chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas***

Responsable scientifique :

Tristan RENAULT

LGP-BP 133

IFREMER La Tremblade

17390 La Tremblade

Tel :05.46.36.98.41

Responsable du Master

Daniel GILLET

Département d'Ingénierie et

d'Etudes des Protéines

CEA Saclay

91191 Gif sur Yvette

Tel :01.69.08.76.46

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 02684

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier respectueusement le docteur Tristan Renault, chef du Laboratoire de Génétique et Pathologie de l'Ifremer La Tremblade, pour l'accueil au sein du laboratoire afin de réaliser ce stage de Master.

Je remercie également le docteur Daniel Gillet, responsable du Master « Toxines et Ecosystèmes », pour l'acceptation du sujet de stage. C'est une personne dévouée pour ses étudiants. Ce fût un honneur d'assister à ses cours et à ceux du Master du Muséum. J'en profite ici pour remercier les personnes qui ont contribué à ma sélection pour ce Master.

Je remercie amicalement toutes les personnes du laboratoire pour leur aide, leur sympathie et leur bonne humeur. C'est toujours plus facile de travailler dans un environnement agréable. Je ne citerai pas tous les noms, la liste est trop longue. C'est la troisième fois que je viens en stage au laboratoire et c'est toujours un plaisir.

Je remercie les stagiaires qui contribuent à la bonne humeur du laboratoire et à son activité. Et en particulier à ma stagiaire, Lucile. C'est la première fois que je m'occupais d'un stagiaire, j'espère avoir été à la hauteur. Bonne chance pour la suite.

Je tiens à remercier spécialement plusieurs personnes. Tout d'abord, Nicole Faury, technicienne au laboratoire. C'est cette personne qui m'a initié aux joies de la biologie moléculaire. Son aide fût et reste précieuse. Sa joie de vivre et son caractère en font une personne à part. La réalisation de la technique SSH restera gravé dans ma mémoire.

Ensuite, je remercie une nouvelle fois le docteur Tristan Renault. Malgré toutes ses responsabilités, il reste une personne abordable et chaleureuse. Merci pour la correction de ce rapport. Ses conseils sont précieux pour moi depuis deux ans. Je lui dois beaucoup, notamment en terme d'éveil scientifique. Je le remercie de m'avoir permis d'assister à un meeting à Montpellier, ce fût un souvenir extraordinaire. La liste de ses qualités est trop longue et je ne pourrais pas toutes les citer. Donc, un seul mot : MERCI.

Je n'oublie pas la doctorante Béatrice Gagnaire qui a partagé le bureau avec moi et Tristan et qui a participé à mon travail. Ce fût très agréable de travailler avec elle. Sa compétence est indéniable. J'espère avoir ajouté une pierre dans son travail de thèse. Bonne chance pour le rapport et la présentation. Si tu n'y arrives pas, tu pourras toujours chercher un travail dans le secrétariat !

J'en arrive à saluer quatre personnes : Manu, Yann, Jean-Come et Nico. Merci pour les soirées passées ensemble. J'ai à l'esprit notamment deux soirées : l'anniversaire de Nico et celui de l'amie de Jean-Come. Je n'en dirai pas plus, ils sauront pourquoi. Je souhaite bonne chance à Manu pour sa recherche de thèse. Yann, tu peux arrêter la tienne, tu as déjà tout trouvé ! Merci pour ces discussions pendant les pauses café et ton aide pour ma recherche de thèse. Jean-Come ou le chef microbio, tu es le seul permanent de nous quatre ici, t'inquiètes pas, on t'oubliera pas. Et vive B.M ! Nico, bon courage pour la fin de ta thèse, tu y arriveras. Tu es une personne très humaine et avec en plus, de très bon talent d'acteur !

Je remercie enfin ma famille et surtout mes parents pour leur aide tout au long de mes études et de ma vie. Je les remercie de leur confiance. J'espère vous rendre en retour tout le bonheur que vous m'apportez.

J'en finirai là, il y a tant de choses à dire. Mille excuses à ceux que j'ai oublié.

Bonne lecture de ce rapport...

SOMMAIRE

SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION.....	3
II.	RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	5
II.1	L’huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>.....	5
	<u>II.1.1 Taxonomie.....</u>	<u>5</u>
	<u>II.1.2 Biologie.....</u>	<u>5</u>
	- <i>Caractères généraux</i>	
	- <i>Biologie de la reproduction</i>	
	<u>II.1.3 Système immunitaire.....</u>	<u>6</u>
	- <i>Comparaison des systèmes immunitaires vertébrés/invertébrés</i>	
	- <i>Système circulatoire et cellules de défense</i>	
	- <i>Mécanismes de défense</i>	
II.2	Les virus.....	10
	<u>II.2.1 Généralités.....</u>	<u>10</u>
	<u>II.2.2 Pathologies virales rencontrées chez les bivalves marins.....</u>	<u>10</u>
	<u>II.2.3 La famille des <i>Herpesviridae</i>.....</u>	<u>11</u>
	<u>II.2.4 OsHV-1 : un herpesvirus infectant les bivalves.....</u>	<u>12</u>
II.3	Les pesticides.....	13
	<u>II.3.1 Définition et utilisation.....</u>	<u>13</u>
	<u>II.3.2 Ecotoxicité des composés.....</u>	<u>13</u>
	<u>II.3.3 Relations entre polluants et sensibilité aux maladies infectieuses...14</u>	
III.	MATERIEL ET METHODES.....	15
III.1	Matériel biologique.....	15
III.2	Protocoles expérimentaux.....	15
	<u>III.2.1 Exposition aux xénobiotiques.....</u>	<u>15</u>
	<u>III.2.2 Essais d’infections par inoculation d’un broyat de larves.....</u>	<u>15</u>
	<u>infectées dans la cavité péricardique</u>	
	- <i>Origine du virus OsHV-1</i>	
	a – Broyat de larves axéniques infectées fraîches	
	b – Broyat de matériel biologique infecté congelé	
	- <i>Inoculation dans la cavité péricardique</i>	

<u>III.2.3 Prélèvement d'hémolymphe</u>	17
III.3 Techniques d'analyse moléculaire	17
<u>III.3.1 Extraction d'ARN</u>	17
<u>III.3.2 Recherche d'ADN et d'ARN viraux</u>	17
<u>III.3.3 Suivi de l'expression de gènes cellulaires par RT-PCR semi-quantitative</u>	17
<u>III.3.4 Analyse électrophorétique</u>	19
IV. RESULTATS	20
IV.1 Essais d'infections virales	20
<u>IV.1.1 Utilisation du matériel biologique infectée congelé</u>	20
<u>IV.1.2 Utilisation de larves axéniques infectées fraîches</u>	20
IV.2 Suivi de l'expression des gènes cellulaires viro-induits	21
V. DISCUSSION	23
VI. BIBLIOGRAPHIE	26
VII. WEBLIOGRAPHIE	30

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

La conchyliculture représente à l'échelle mondiale et en France une activité dont les enjeux économiques sont majeurs. Les données émanant d'organisations internationales tels que l'Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture (Food and Agriculture Organisation, FAO), l'Union Européenne (UE) ou encore le Comité International pour l'Exploitation de la Mer (CIEM) révèlent en particulier le rôle primordial occupé par la conchyliculture. La filière conchylicole française est notamment l'une des plus importantes au niveau mondial avec une production en 1999 de 200 000 tonnes et un chiffre d'affaire de 655 millions d'euros pour 5500 entreprises, 7000 exploitants et plus de 20 000 emplois. Elle se place ainsi au cinquième rang mondial, après la Chine, les USA, le Japon et la Corée. La France est également le principal producteur d'huîtres en Europe avec un tonnage représentant 65,5% des coquillages produits.

L'élevage de coquillages concerne un nombre limité d'espèces dont la plupart appartiennent à la classe des mollusques bivalves. Les deux principales espèces concernées en France métropolitaine sont l'huître creuse ou huître japonaise, *Crassostrea gigas*, et dans une moindre mesure l'huître plate, *Ostrea edulis*. L'huître creuse équivaut à elle seule à 98% de la production ostréicole française, soit plus de 150 000 tonnes par an (FAO, 2003). Pour ces raisons, l'ostréiculture est considérée par les autorités publiques et privées en France comme une activité à soutenir en terme de recherche fondamentale et appliquée.

L'intensification des élevages impliquant un nombre restreint d'espèces, le confinement ainsi que le transfert d'animaux entre bassins de production et entre pays (Héral, 1989) ont favorisé et favorisent l'émergence et la dissémination de maladies infectieuses. Ces infections représentent un facteur limitant au bon développement de la conchyliculture moderne.

Ainsi, plusieurs maladies d'origine virale affectant les bivalves ont été rapportées (Farley *et al.*, 1972). Notamment, des virus décrits comme des iridovirus, ont été associés à la disparition de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, des eaux françaises au début des années 70. Des virus présentant une morphologie similaire à celle des virus de la famille des *Herpesviridae* ont été mis en évidence, pour la première fois en 1972, chez l'huître américaine, *C. virginica* (Farley *et al.*, 1972). Ce type de virus a été par la suite décrit chez plusieurs espèces de bivalves marins dans le monde (Hine *et al.*, 1992 ; Nicolas *et al.*, 1992 ; Renault *et al.*, 1994 ; Renault, 1998 ; Renault *et al.*, 2000 ; Renault *et al.*, 2001a). Depuis 1991, de fortes mortalités de larves et de juvéniles ont été observées en France chez plusieurs espèces d'huîtres, *C. gigas*, *Ostrea edulis* (Nicolas *et al.*, 1992 ; Comps et Cochenne, 1993 ; Renault *et al.*, 1994 ; Renault *et al.*, 2000) et en Nouvelle Zélande chez *Tiostrea chilensis* (Hine *et al.*, 1998). Ces mortalités ont été associées à la détection en microscopie électronique à transmission, de particules virales de type herpès (Le Deuff, 1995 ; Renault *et al.*, 2000). La caractérisation du génome virale, la morphologie, la taille, la localisation intranucléaire et cytoplasmique, mais également la réplication virale et la structure de la nucléocapside du virus infectant les larves de *C. gigas* ont confirmé l'appartenance de ce virus à la famille des *Herpesviridae* (Arzul et Renault, 2002, Davison *et al.*, 2005). Il a été associé à cette famille en tant que nouveau membre et a été nommé Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) (Minson *et al.*, 2000 ; Arzul et Renault, 2002 ; Davison *et al.*, 2005).

Bien que l'impact des pathologies virales en aquaculture soit important, peu de moyens de lutte sont aujourd'hui disponibles. De plus, les connaissances sur l'immunité des invertébrés marins face aux infections virales sont peu nombreuses (Renault, 1998 ; Arzul *et*

al., 2001 ; Renault *et al.*, 2001). L'immunité non spécifique, constituant la première barrière de défense chez les vertébrés (Du Pasquier, 2001), représente le seul niveau de défense décrit à ce jour chez les bivalves marins (Salzet, 2001). Récemment, plusieurs études ont conduit à la caractérisation de protéines impliquées dans la réponse immunitaire non spécifique des invertébrés (Mitta *et al.*, 1999 ; Amiche *et al.*, 2000 ; Isaacson *et al.*, 2002 ; Olicard *et al.*, 2005) et à l'identification de gènes cellulaires impliqués dans les mécanismes de défense antivirale. C'est notamment le cas chez l'huître creuse où dix gènes cellulaires ont été identifiés comme surexprimés en présence d'OsHV-1 (Renault *et al.*, non publié). Ces gènes, s'ils ne peuvent pas être considérés comme des gènes de défense *sensus stricto*, sont néanmoins impliqués dans la réponse de l'organisme vis à vis de l'infection virale à OsHV-1.

Les interactions qui existent entre l'hôte et le pathogène peuvent également être influencées par l'environnement. Les activités anthropiques amènent, par l'intermédiaire des bassins versants, des quantités importantes de polluants de différentes natures (chimiques et biologiques) au niveau des zones d'estuaire. Les huîtres, vivant dans les zones littorales, sont des animaux sessiles et n'ont donc aucune possibilité de fuite pour éviter les contaminations de leur environnement. Elles peuvent bioaccumuler les polluants et peuvent donc être exposées à de fortes concentrations en xénobiotiques. Depuis plusieurs années, les travaux concernant les effets des polluants sur le système immunitaire des invertébrés se multiplient. En effet, l'altération des fonctions immunitaires des bivalves marins exposés à des contaminants environnementaux peut être associée à l'augmentation de la sensibilité aux maladies (Coles *et al.*, 1995). Les maladies infectieuses étant responsables de mortalités chez des espèces d'intérêt économique, l'étude du système immunitaire et la compréhension des capacités de défense de ces organismes sont les clés indispensables au bon développement de la conchyliculture. Ainsi, l'étude de la modulation du système immunitaire ou immunomodulation chez les mollusques marins apparaît comme l'une des voies de recherche privilégiée pour l'évaluation des effets physiologiques de facteurs environnementaux (Oubella et Auffret, 1995).

Le présent travail a consisté à étudier les interactions entre hôte/pathogène/environnement. Plus précisément, d'étudier les réponses de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, vis à vis d'une infection à OsHV-1 en présence de pesticides dont les concentrations utilisées sont celles pouvant être retrouvées dans l'environnement (bassin de Marennes-Oléron).

Pour cela, des animaux adultes ont été contaminés par des pesticides, puis des essais d'infection ont été entrepris avec le virus OsHV-1 provenant de deux sources différentes. La première source correspond à du matériel biologique infecté (larves ou naissain) congelé et archivé au laboratoire. La deuxième est du matériel biologique frais (larves axéniques) infecté expérimentalement avec le virus OsHV-1. Après l'inoculation du matériel infecté, les mortalités ont été relevées tous les jours et l'ARN des hémocytes a été extrait. Le suivi de l'infection et la réponse des individus face à OsHV-1 ont été étudiés par approche moléculaire. Celle-ci consiste à analyser l'expression de gènes cellulaires et viraux par la technique de RT-PCR semi-quantitative.

RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

II.1 L'huître creuse, *Crassostrea gigas*

II.1.1 Taxonomie

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est un mollusque bivalve. La classification de l'embranchement des mollusques s'est longtemps appuyée sur des critères morphologiques (charnière, coquille, structure palléale, etc.). Plus récemment, des études moléculaires principalement focalisées sur la relation de l'embranchement des mollusques avec d'autres phyla (Adamkewicz *et al.*, 1997) ont conduit à répartir les espèces de cet embranchement en huit classes dont celle des bivalves. La classe des bivalves est constituée de six sous-classes : *Palaeotaxodonta*, *Cryptodonta*, *Pteriomorphia*, *Palaeoheterodonta*, *Heterodonta* et *Anomalodesmata*. Les huîtres appartiennent à la sous-classe des *Pteriomorphia*.

Classe des *Bivalvia* (Lamellibranches)
Sous-classe des *Pteriomorphia*
Ordre des *Ostreoida*
Sous-ordre des *Ostreina*
Superfamille des *Ostreacea*
Famille des *Ostreidae*
Genre *Crassostrea* (Sacco, 1897)
Espèce *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

II.1.2 Biologie

- *Caractères généraux*

Adulte, l'huître adhère au support par la valve gauche (ou valve concave). Le manteau recouvre le corps de l'huître. Celui-ci est constitué de deux lobes (droit et gauche), eux-même bordés de trois feuillets. Le feuillet interne délimite une cavité palléale que les branchies séparent en une chambre inhalante et une chambre exhalante. Le volume d'eau qui traverse l'animal permet d'assurer l'apport de nourriture, les échanges gazeux respiratoires et l'expulsion des déchets. La bouche est entourée par quatre palpes labiaux foliacés et ciliés (Beaumont et Cassier, 1990).

- *Biologie de la reproduction*

Les huîtres sont des animaux hermaphrodites. Dès les mois de mai et juin, les huîtres matures perdent leurs réserves lipidiques hivernales qui vont être remplacées par des gamètes. La maturation sexuelle est due à l'élévation de la température de l'eau autour de 20°C. Elles se mettent alors à pondre en émettant une phéromone, incitant leurs congénères à faire de même. *Crassostrea gigas* est un organisme ovipare, c'est à dire que la fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes se produit dans le milieu extérieur ; il y a fécondation externe. La fécondation donne dans les premières heures des larves mobiles d'environ 50 µm et appelées larves trocophores. Au bout de 24 à 48 heures après l'éclosion, une coquille à deux valves apparaît. La larve est alors appelée veligère (ou larves D) et mesure environ 70 µm. Planctoniques, elles ont une durée de vie larvaire étroitement liée à la température de l'eau, pouvant aller de 21 à 28 jours. En deux à trois semaines apparaît le pied donnant le nom

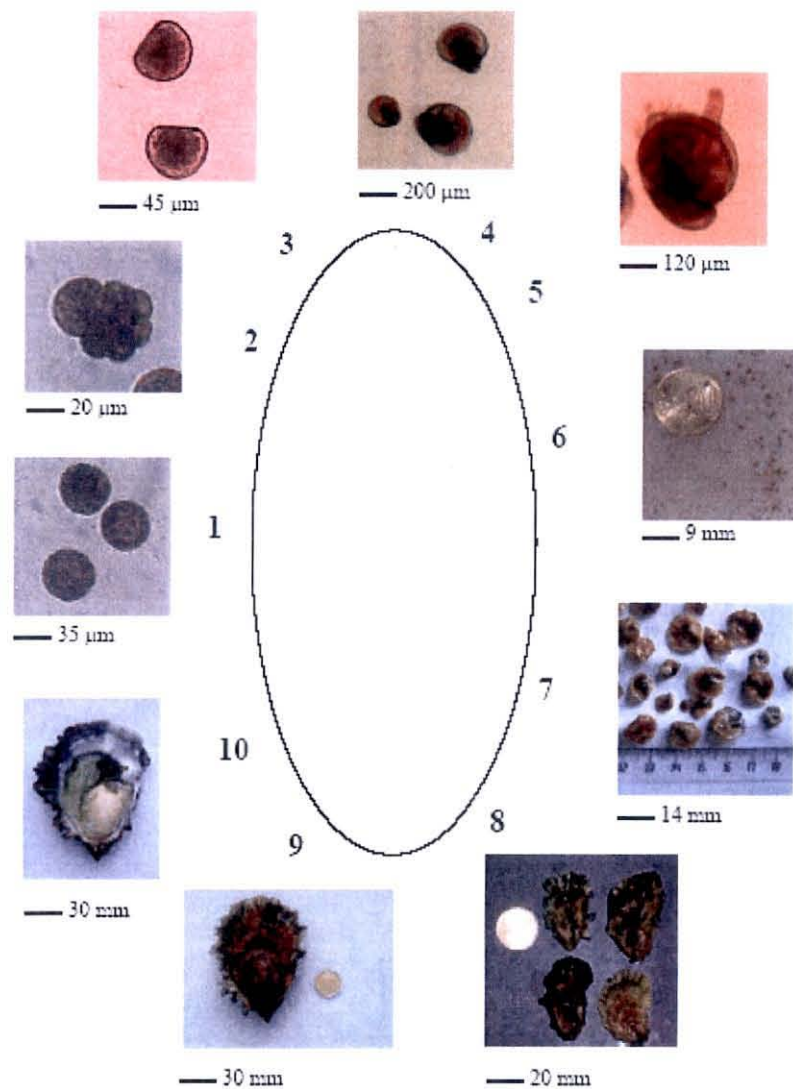


Figure 1 : Cycle de vie de l'huître creuse (d'après Dégremont, 2003). (1) Fécondation : ovocytes en présence de spermatozoïdes (points noirs ou réfringents). (2) Embryon stade morula (2-3 heures). (3) Larves D (24 heures). (4) Larves véligères (14 jours). (5) Larve pédivéligère (18 jours). (6) Naissain post-fixation (1 mois). (7) Naissain (2 mois). (8) Naissain (6 mois). (9) Adulte (10 mois). (10) Géniteur mature (10 mois).

aux larves de pédiveligère. C'est à ce moment qu'elles se fixent et se métamorphosent. Elles prennent le nom de naissain. Cette métamorphose qui suit le stade larvaire, conduit à des juvéniles morphologiquement semblables aux adultes (Figure 1).

II.1.3 Système immunitaire

- *Comparaison des systèmes immunitaires vertébrés/invertébrés*

La fonction principale du système immunitaire chez tous les animaux est de fournir une protection contre les agents infectieux (parasites, bactéries, virus et champignons) et les tumeurs et de rejeter les composants du non-soi. Chez les vertébrés, un ensemble de cellules lymphoïdes et non lymphoïdes communiquent entre elles *via* des molécules messagers pour créer un système immunitaire multi-fonctionnel. Les fonctions de ce système permettent d'une part des réponses rapides innées et d'autre part des réponses spécifiques par le biais d'un mécanisme de mémorisation des rencontres précédentes avec des antigènes étrangers. Ce second type de réponse possède une efficacité accrue en ciblant un agent infectieux particulier. Le phénomène de mémoire fait intervenir les lymphocytes. Ce mécanisme est possible du fait de la présence de récepteurs spécifiques portés à la surface de cette catégorie de cellules. Les réponses immunitaires innées sont médiées par les phagocytes mononucléaires et les granulocytes, qui peuvent reconnaître le corps étranger et répondre par la phagocytose et l'inflammation.

Le système immunitaire chez les invertébrés repose sur les défenses innées. Cependant il existe un mécanisme de reconnaissance du soi et du non-soi (Galloway et Delpledge, 2001). Il est également caractérisé par une absence de phénomène de mémoire immunitaire. Par ailleurs, des barrières physico-chimiques telles que la cuticule, la coquille et les couches de mucus représentent une première ligne de défense contre les agresseurs chez la majorité des invertébrés. Les invertébrés comptent un grand nombre de phyla ayant des origines ancestrales et des évolutions différentes. Les composants immunitaires varient non seulement d'une espèce à l'autre, mais également au sein de la même espèce, en fonction du stade de développement.

- *Système circulatoire et cellules de défense*

A l'exception des formes les plus primitives (éponges), qui présentent peu de différenciation des organes et des fonctions, la plupart des invertébrés possèdent un système circulatoire et des cellules « sanguines », hémocytes ou coelomocytes, de grande diversité et souvent d'origine incertaine.

Les mollusques bivalves possèdent un système circulatoire de type semi-ouvert, comprenant un cœur, des vaisseaux et des lacunes sous forme de sinus où circule l'hémolymphe contenant des cellules appelées hémocytes qui sont les supports de l'immunité chez les mollusques bivalves (Cheng, 1981) (Figure 2). Différentes sous-populations hémocytaires ont été identifiées par divers auteurs, mais leur description est souvent partielle et la nomenclature hétérogène. Afin d'établir une classification des types hémocytaires, différents critères peuvent être utilisés : morphologiques, cytochimiques, fonctionnels et moléculaires (Xue, 1998). Les hémocytes peuvent également être présents dans les tissus. Deux principaux types d'hémocyte sont observés chez les mollusques bivalves : les hémocytes granuleux et les hémocytes agranuleux (appelés également hyalinocytes,

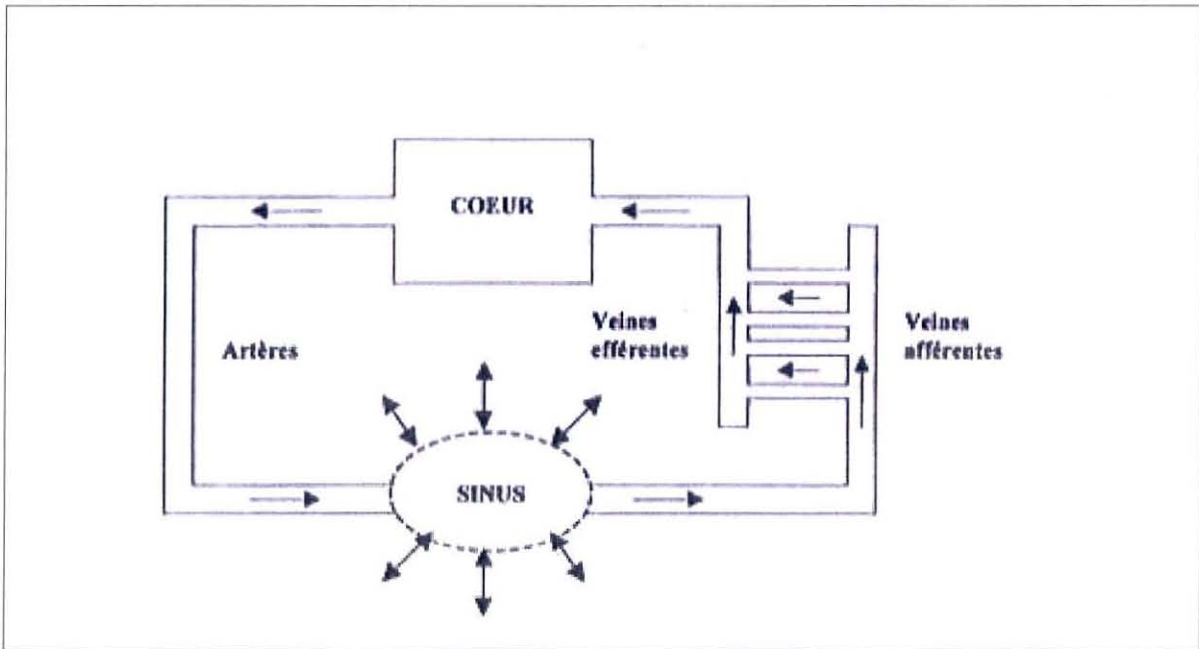


Figure 2 : Diagramme schématique représentant le système circulatoire de mollusques bivalves (modifié par Cheng, 1981)

« macrophage-like » ou « monocyte-like ») (Auffret, 1985). Si les fonctions des différentes sous-populations de granulocytes restent hypothétiques, l'observation de types de granules distincts suggère la possibilité de fonctions différentes, comme c'est le cas chez les vertébrés. La dégranulation des granulocytes (libération de lysozymes et enzymes hydrolytiques) peut intervenir dans la destruction des corps étrangers. Les hyalinocytes présentent les caractéristiques morphologiques de cellules peu différenciées. Dans tous les cas, ces cellules sont équipées d'un appareil lysosomal (Auffret, 1985).

Les hémocytes circulants ne semblent pas se multiplier dans l'hémolymphe. Certains auteurs supposent l'existence d'un organe hématopoïétique particulier, d'autres considèrent que le tractus digestif pourrait intervenir comme centre d'hématopoïèse (Lorteau *et al.*, 1995 ; Xue, 1998). Aucune de ces hypothèses n'a été vérifiée à ce jour.

- Mécanismes de défense

Les mécanismes de défense des bivalves impliquent les hémocytes ainsi que les molécules présentes dans le sérum. Les travaux de Blaise *et al.* (2002) précisent que les réponses impliquées dans l'inhibition ou la stimulation du système de défense sont toutefois largement influencées par le type de pathogène considéré.

▪ Mécanismes à médiation cellulaire

L'agrégation des hémocytes dite spontanée (en l'absence de pathogène) a lieu dans des conditions stressantes, et particulièrement *in vitro*. En général, le contact avec des objets ou l'agitation mécanique peuvent servir de stimulus (Auffret et Oubella, 1997). La formation d'amas hémocytaires peut se rapprocher du phénomène de coagulation sanguine chez les vertébrés, sauf que ce phénomène est réversible. L'agrégation permet la cicatrisation de plaies ou l'immobilisation de corps étrangers. Certaines substances permettent d'inhiber ce phénomène (Auffret et Oubella, 1997).

Par ailleurs, les hémocytes de mollusques bivalves peuvent phagocyter de nombreux micro-organismes et particules (bactéries, levures, virus, globules rouges, protéines) (Auffret, 1985). Une fois phagocytées, les particules sont dégradées et les produits de dégradation peuvent être accumulés dans les vacuoles sous forme de pigments, comme la mélanine. La phagocytose peut être divisée en quatre étapes : attraction, adhérence, internalisation et destruction (Cheng et Rodrick, 1975). Les trois premières phases reposent sur des capacités de locomotion, transformation et communication hémocyte-cible. La quatrième phase est celle de la destruction ; elle peut faire intervenir deux sortes de phénomène :

a – La dégradation par des enzymes lysosomiales : les particules étrangères sont internalisées dans une vacuole de phagocytose (phagosome primaire). Ce dernier fusionne avec des lysosomes qui contiennent des enzymes hydrolytiques, ce qui forme un phagolysosome à l'intérieur duquel les enzymes sont relarguées pour détruire les particules étrangères. Ces enzymes ont été mises en évidence chez différentes espèces de mollusques bivalves, dont *Crassostrea gigas* (Xue et Renault, 2000). Cheng (1983) a montré que la synthèse de ces enzymes lysosomiales augmentait après un contact avec des bactéries.

b – La production et la libération de radicaux toxiques de l’oxygène (mécanisme de flambée oxydative) : les hémocytes des mollusques sont capables de produire des dérivés de l’oxygène : radical anion superoxyde (O_2^-), peroxyde d’hydrogène (H_2O_2), radicaux hydroxyles (OH^\cdot) (Toreilles *et al.*, 1997). Ce système joue un rôle important dans l’activité antimicrobienne des cellules phagocytaires. Il peut être initié par divers processus physiologiques tels que la phagocytose, les composants de la paroi bactérienne ou des agents solubles. Cette réaction semble exister chez différentes espèces de mollusques bivalves comme la moule commune, *Mytilus edulis*, qui peut synthétiser la myeloperoxydase (Schlenck *et al.*, 1991) et chez la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis* (Toreilles *et al.*, 1997).

Au cours de la multiplication cellulaire et de la différenciation, de nombreuses cellules sont produites en excès ou bien de façon anormale. La mort cellulaire intervient alors en détruisant et en éliminant ces cellules afin de maintenir un équilibre dans l’organisme. Ce phénomène apoptotique, fondamentale chez les vertébrés, a aussi été étudié chez les invertébrés et largement chez les insectes (Claveria *et al.*, 1998 ; Greene *et al.*, 2003 ; Ishikawa *et al.*, 2003). Divers travaux de recherche ont permis de mettre en évidence le phénomène apoptotique chez les invertébrés (Foster *et al.*, 2000 ; Wiens *et al.*, 2003), notamment chez les bivalves marins telles que la moule, *Mytilus galloprovincialis*, (Micic *et al.*, 2001 ; Micic *et al.*, 2002) et la palourde, *Ruditapes philippinarium*, (Renault *et al.*, 2001b). Ce phénomène a aussi été mis en évidence chez l’huître européenne, *Ostrea edulis*, et chez l’huître creuse, *Crassostrea gigas* (Lacoste *et al.*, 2002). Les travaux de Sunila et LaBanca (2003) montrent que les mécanismes d’apoptose pourraient prévenir des transmissions des maladies infectieuses chez l’huître américaine, *C. virginica*. Egalement, les travaux de Terahara *et al.* (2003) ont mis en évidence la présence d’un peptide cellulaire dans les hémocytes d’huître creuse, *C. gigas*, qui serait impliqué dans l’induction de l’apoptose.

Elle est également activée en réponse à des infections par de nombreux virus (Ravzi et Welsh, 1995). Ses caractéristiques (Terahara *et al.*, 2003) correspondent à l’arrondissement des cellules, une condensation de la chromatine, une fragmentation de l’ADN cellulaire, des transformations comme le bourgeonnement au niveau des membranes cellulaires (Cohen, 1994). L’apoptose est une réponse immédiate face à une infection virale, en empêchant la dissémination des agents pathogènes dans l’organisme. Si la mort cellulaire programmée est impliquée dans les défenses contre les infections virales, certains virus sont capables de moduler ce mécanisme afin de persister dans l’organisme (Cohen, 1994). Certains herpesvirus sont capables d’inhiber le processus de mort cellulaire programmée leur permettant ainsi d’assurer une infection productive dans les cellules cibles. A l’inverse, le phénomène d’induction de l’apoptose est largement décrit chez les virus comme le VIH ou chez les *Herpesviridae* vis à vis de cellules de l’immunité.

- Substances solubles présentes dans l’hémolymphe

Des substances circulantes intervenant dans les réactions de défense (lysozyme, enzymes lysosomiales, peptides antimicrobiens) sont produites par des cellules et libérées dans l’hémolymphe (Pipe, 1990).

Le lysozyme est une enzyme bactériolytique retrouvée dans le sérum comme dans les hémocytes des bivalves (Cheng et Rodrick, 1975). Les autres enzymes lysosomiales (β -glucuronidase, phosphatase, estérase, peroxydase, aminopeptidase) sont également présentes dans le sérum et dans les hémocytes (Xue et Renault, 2000). Ces enzymes sont contenues

dans les granules, présents dans les cellules phagocytaires. Les estérases participent à la dégradation intracellulaire des corps étrangers (Auffret, 1985). Les aminopeptidases catalysent l'hydrolyse du peptide N-terminal des protéines et dégradent des protéines de surface des parasites (Cheng *et al.*, 1978). Les peroxydases interviennent dans la flambée oxydative. La β -glucuronidase, les phosphatases acides, l'amylase et la lipase ont également été recensées dans l'hémolymphe de plusieurs bivalves, notamment chez le clam, *Mercenaria mercenaria*, (Cheng et Rodrick, 1975). Les lectines sont des molécules pouvant s'attacher à des sucres. Elles servent dans les phénomènes d'agglutination et d'opsonisation, notamment lors de la phagocytose d'agents infectieux (virus, bactéries, champignons et parasites) (Pipe, 1990).

Les protéines de stress (Heat Shock Proteins : HSP) interviennent lors de blessures, d'infections et d'exposition à des métaux lourds. Ces molécules sont très conservées dans le règne animal. Elles peuvent être induites par une augmentation de la température, une variation de la salinité ou un choc osmotique.

Les oxydes nitriques synthétases (NOSs) catalysent la production d'oxyde nitrique qui intervient en tant qu'agent anti-bactérien et anti-tumoral (Toreilles *et al.*, 1999).

La phénoloxydase est une enzyme dépendante du cuivre et existe dans les cellules sous forme d'un précurseur, la prophénoloxydase. Ce précurseur est activé sous l'action de lipopolysaccharides via une cascade de sérines protéases pour aboutir à la formation de phénoloxydase. Cette enzyme catalyse alors la réaction de conversion de substrats phénoliques en quinones pour ensuite conduire à la biosynthèse de mélanine (Gourdon *et al.*, 1998). Les composés formés semblent être impliqués dans les mécanismes de reconnaissance de particules étrangères et d'opsonisation lors de la phagocytose et de la communication intercellulaire (Söderhall, 1992). L'activité phénoloxydase a pu être mise en évidence dans les hémocytes de moules, *Mytilus edulis*, (Coles et Pipe, 1994), *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997), et *Perna viridis* (Asokan *et al.*, 1997). Une activité de même type a également été détectée chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et chez plusieurs espèces de coquilles Saint Jacques, *Argopecten ventricosus* et *Nodipecten subnodosus* (Smith et Söderhall, 1991 ; Luna-Gonzales *et al.*, 2003).

Les travaux de Mitta *et al.* (2000) ont démontré la présence dans les hémocytes circulants des moules de substances ayant des propriétés antimicrobiennes (défensines, mytilines). Elles semblent être présentes dans des sous-populations d'hémocytes spécifiques. Elles interviennent dans la destruction des bactéries à l'intérieur des phagocytes, puis sont ensuite relarguées dans l'hémolymphe pour prendre part aux réponses systémiques. Ce type d'action est unique et se rapproche davantage des phagocytes mammaliens que de ceux des insectes.

La recherche sur les activités antivirales des ascidies a abouti dans les années 80 à l'identification de Didemines et d'Eudistomines, molécules antibactériennes et antivirales, notamment contre HSV-1 (Rinehart *et al.*, 1981 ; Kobayashi *et al.*, 1984). Par la suite, Azumi *et al.* (1990), ont isolé une Halocyamine issue d'hémocytes d'ascidies inhibant la croissance d'un rhabdovirus (virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse : NHI) et d'un birnavirus (virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse : NPI). Cette activité a été mise en évidence *in vitro* sur des cellules d'ovaire de truite. Le peptide Kahalalide E, présentant une activité anti-HSV-2, a été isolé à partir du mollusque *Elysia rufescens*, par Hamann *et al.* (1996). Tamamura *et al.* (1993) démontrent l'effet de la Tachypleisine issue d'hémocytes de limule,

Tachypleus tridentatus, sur le virus VIH-1. Parallèlement Yasin *et al.* (2000) démontrent une activité anti HSV-1 et HSV-2 de cette même molécule. Récemment, Maier *et al.* (2001) décrivent deux molécules, les Liouvillosides A et B, issues de concombres de mer, *Straurocucumis liouvillei*, de nature glycosidique et présentant des activités virucides contre HSV-1 à de faibles concentrations. En 1990, Bachère *et al.* ont mis en évidence *in vitro* une substance issue de l'hémolymphe de *Crassostrea gigas*, capable de neutraliser l'activité du coliphage T3. Cette activité serait due à une sérine protéase. Enfin, Lee et Maruyama (1998) identifient à leur tour, un peptide issu d'un hydrolysât protéique d'huître, *C. gigas*, intervenant en tant qu'inhibiteur de la protéase du VIH-1.

II.2 Les virus

II.2.1 Généralités

Les virus sont des agents infectieux, capables de répliquer leur matériel génétique au dépend de cellules hôtes vivantes qu'ils infectent. Les fonctions métaboliques des cellules hôtes sont détournées au profit de la synthèse de l'acide nucléique (ADN ou ARN) et des protéines virales, afin que le virus puisse se développer et se multiplier. Les virus peuvent être vus alors comme des assemblages supra moléculaires qui parasitent les cellules et ils diffèrent des autres organismes vivants par leur parasitisme intracellulaire obligatoire (Garrett et Grisham, 2000). Les virus représentent un groupe qualitativement, mais aussi quantitativement très important.

II.2.2 Pathologies virales rencontrées chez les bivalves marins

Les infections virales décrites chez les bivalves sont associées à des virus appartenant à différentes familles de virus (*Papovaviridae*, *Herpesviridae*, *Iridoviridae*, *Togaviridae*, *Retroviridae*, *Paramyxoviridae* et *Reoviridae*) (Farley, 1978 ; Matthews, 1982 ; Elston, 1997). Cependant, parmi les maladies infectieuses observées chez les bivalves marins, les infections virales sont souvent mal connues en raison d'une certaine inadéquation des techniques de diagnostic utilisées (histologie) par les laboratoires impliqués dans les analyses lors d'épisodes de mortalités anormales rapportées chez les bivalves. La microscopie photonique demeure en effet insuffisante en cas de pathologie virale si elle n'est pas complétée par d'autres approches telles que la microscopie électronique, la recherche d'effet cytopathogène sur lignées cellulaires ou encore la détection de l'agent infectieux à l'aide de réactifs spécifiques. Les avancées scientifiques n'ont à ce jour pas permis le développement de lignées cellulaires de mollusques bivalves. La recherche *in vitro* d'effets cytopathogènes en système homologue est donc impossible. Par ailleurs, l'absence de cellules productrices d'anticorps chez les invertébrés fait que seul le diagnostic direct (recherche de l'agent infectieux lui-même) est envisageable (Renault, 1998). Parmi les nombreux cas de mortalités à caractère épizootique observés chez les coquillages et dont l'étiologie est restée inconnue à ce jour, il est fortement présumé que certains de ces épisodes aient pu être liés à des virus non détectés.

En France, diverses maladies infectieuses parmi lesquelles des épizooties d'origine virales ont marqué l'ostréiculture. Des mortalités massives ont été observées en 1967 chez l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, dans le bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime, France). Elles ont gagné tout le territoire en 1968 et ont été rapportées jusqu'en 1970 (Alderman et Gras, 1969). Comps *et al.* (1976) ont alors montré que ces mortalités

étaient associées à la détection d'un virus apparenté à la famille des *Iridoviridae* (Comps, 1970 ; Comps *et al.*, 1976 ; Comps et Bonami, 1977). Un second virus, a été associé à une nouvelle vague de mortalités de 1970 à 1973 conduisant à la disparition quasi totale de *C. angulata* sur le littoral atlantique français. Depuis 1975, l'ostréiculture française repose essentiellement sur l'exploitation de l'huître creuse, *C. gigas*, espèce de substitution de *C. angulata*. Cependant, apparemment moins sensible aux infections à iridovirus elle ne semble pas être à l'abri d'infections virales et notamment par des virus de type herpes.

II.2.3 La famille des *Herpesviridae*

Les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* constituent les agents étiologiques de nombreuses maladies. Ils ont la faculté d'infecter un large spectre d'hôte : aussi bien les hommes, les mammifères, les oiseaux que les reptiles (Roizman *et al.*, 1992 ; Minson *et al.*, 2000) et récemment les mollusques bivalves (Renault, 1998 ; Arzul et Renault, 2002 ; Davison *et al.*, 2005). La particularité des *Herpesviridae* concerne leurs propriétés structurales et physiologiques communes (Agut *et al.*, 1997). Ce sont des virus à ADN double brin, enveloppés qui persistent de façon définitive dans l'hôte après une primo-infection. L'infection demeure sous forme latente, mais peut conduire à des réactivations qui correspondent à une reprise de la multiplication active du virus.

Les herpesvirus sont parmi les plus nombreux et les plus complexes de tous les virus (Roizman et Batterson, 1985). Leur spécificité d'hôte indique qu'ils ont pu et su évoluer avec leur hôte durant de longues périodes (Davison, 2002).

Les différents virus de la famille des *Herpesviridae* présentent quatre éléments de structure commune : un nucléoïde ou core contenant l'information génétique virale, une capsidie entourant le nucléoïde, un tégument et une enveloppe (Francki *et al.*, 1991) (Figure 3). La taille des particules virales matures est comprise entre 90 et 300 nm en fonction de l'épaisseur du tégument (Roizman et Batterson, 1985). L'information génétique des herpesvirus est portée par un ADN double brin linéaire contenu dans le nucléoïde. La taille de cet ADN varie de 100 à 240 kpb et porte soixante-dix à deux cents gènes en fonction du virus considéré (Furlong *et al.*, 1972 ; Kieff et Shenk, 1998). La capsidie protéique de symétrie icosaédrique de 125 nm de diamètre environ est constituée par l'assemblage de 162 capsomères dont 12 pentamériques et 150 hexamériques (Minson *et al.*, 2000). Le tégument est présent entre la capsidie et l'enveloppe virale, de façon asymétrique. Il correspond à une structure fibreuse composée de protéines spécifiques et dont la taille varie selon le type de virus (Roizman et Furlong, 1974). L'enveloppe de morphologie sphérique, dérive de la membrane du réticulum endoplasmique ou du Golgi de la cellule hôte. Elle est caractérisée par une double couche de phospholipides d'origine cellulaire et modifiée par l'insertion de protéines et de glycoprotéines virales. Elle est indispensable à l'infectiosité des particules virales et détermine la morphologie sphérique du virus.

Dans son hôte, lorsque les conditions sont favorables, le virus se multiplie induisant ainsi une lyse cellulaire. Le cycle viral aboutissant à la production de particules virales filles, se décompose en plusieurs étapes : la pénétration du virus dans la cellule hôte, les synthèses virales, la réplication de l'ADN virale et l'assemblage et la libération des particules virales filles.

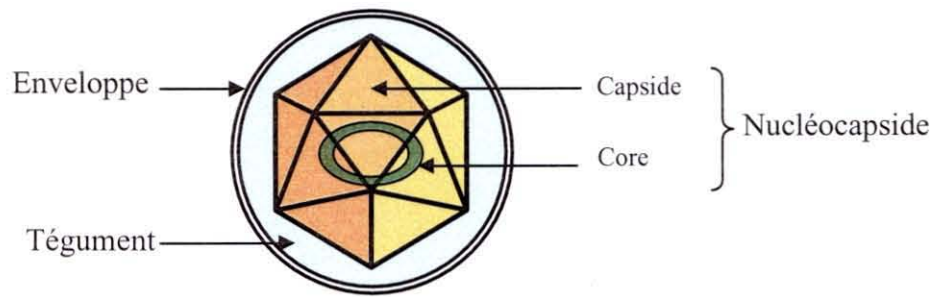


Figure 3 : Schéma représentant la structure générale d'une particule virale de type herpès (d'après RENAULT *et al.*, 1997)

II.2.4 OsHV-1 : un herpesvirus infectant les bivalves

L'herpesvirus de l'huître, OsHV-1 (Ostreid Herpesvirus 1), récemment identifié comme le virus de la famille des *Herpesviridae* infectant les larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, possède des caractéristiques communes aux autres herpesvirus (structure, taille, etc.).

Le génome du virus OsHV-1 est composé d'un ADN double brin linéaire de 206 kpb dont le pourcentage en G+C est de 39% (Arzul et Renault, 2002 ; Davison, 2002 ; Davison *et al.*, 2005). La capside, de symétrie icosaédrique, est un assemblage de 162 capsomères dont 12 pentamériques et 150 hexamériques (Arzul et Renault, 2002 ; Davison *et al.*, 2005). Cette structure est comparable à celle du virus de l'herpès simplex 1 (HSV-1), virus de vertébrés de la sous-famille des alphaherpesvirus.

OsHV-1 est un nouveau membre de la famille des herpesvirus. Il est le seul représentant décrit à ce jour chez les invertébrés. Cependant si OsHV-1 présente des homologues avec HSV-1 dans la structure et l'organisation de son génome, il n'en est pas de même quant aux séquences des gènes. En effet, le séquençage du génome complet de OsHV-1 (Davison *et al.*, 2005) et les séquences obtenues ont permis d'identifier un certain nombre de gènes et notamment :

- Sept gènes codant pour des enzymes (ADN polymérase, désoxyuridine triphosphatase, ribonucléotide réductase, hélicase, terminase et primase).
- Sept gènes codant pour des protéines similaires à des protéines inhibitrices de l'apoptose (Inhibitor Apoptosis Protein, IAP). Considérant le fait que les virus infectant les insectes et les crustacés (baculovirus et entomopoxovirus) codent également pour des IAPs, la voie apoptotique en réponse aux infections virales, semble être privilégiée par les invertébrés.
- Dix gènes codant pour des protéines membranaires. Dix sept autres protéines présentent un domaine hydrophobe suggérant une possible association avec des membranes.

L'absence de lignées cellulaires provenant de bivalves marins ainsi que l'impossibilité d'infecter d'autres lignées cellulaires avec OsHV-1, ne permet pas actuellement l'étude du cycle de réplication de OsHV-1 *in vitro* (Le Deuff *et al.*, 1994 ; Renault *et al.*, 1995 ; Deniau, 2000).

Le développement d'outils moléculaires (PCR et hybridation *in situ*) a permis de détecter OsHV-1 chez des individus adultes asymptomatiques (Arzul *et al.*, 2002). Les huîtres adultes étudiées, ne développant pas de symptômes et ne présentant pas de mortalités étaient infectées par OsHV-1. Ces résultats semblent indiquer que ce virus persiste dans son hôte après une primo-infection (Arzul *et al.*, 2002).

Il y a peu de connaissances concernant les mécanismes de défense vis à vis des agents infectieux viraux chez les espèces aquacoles marines. Un projet de recherche financé par l'Union Européenne (Anti Viral Infection Non-Specific Immunity : AVINSI) est en cours de réalisation et a pour objectif d'isoler et de caractériser des molécules antivirales chez différentes espèces d'intérêt aquacole, d'identifier des gènes cellulaires de bivalves, de crustacés et de poissons, induits lors d'une infection virale et enfin d'étudier l'expression de gènes inhibiteurs d'apoptose chez ces mêmes organismes. Dans le cadre de ce projet, le Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP) (Station Ifremer de La Tremblade, (Charente-

Maritime), a permis d'identifier des gènes cellulaires viro-induits par OsHV-1 dans des hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, par la technique d'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH) (Tableau 1). De part leur homologie avec des gènes identifiés chez d'autres organismes, une interprétation de leur rôle peut être proposée. Ainsi, les glypicans servent de récepteurs pour différents virus et en particulier les herpesvirus (Xia *et al.*, 2002) et pourraient alors être les récepteurs à OsHV-1 chez l'huître creuse. Plusieurs gènes sont également impliqués dans les mécanismes de transduction de signal (une nucléoporine, la protéine Ras 3, une oxydase, la phospholipase C, la pompe Na⁺/K⁺ ATPase), de dégradation d'agents étrangers (protéine du péroxysome, l'ubiquitine) ou d'apoptose (la protéine PNAS-2). L'ubiquitine intervient notamment dans la dégradation de particules étrangères et pourrait être une réponse des organismes face aux infections virales.

II.3 Les pesticides

II.3.1 Définition et utilisation

Les pesticides sont définis comme étant des substances destinées à lutter contre des organismes « indésirables ». Ils regroupent des composés organiques et inorganiques à action plus ou moins spécifiques, tels que les herbicides, les fongicides et les insecticides, qui sont les trois plus importants types de produits utilisés.

En France, les pesticides appelés aussi produits phytosanitaires, sont utilisés principalement en agriculture. D'un point de vue économique, l'utilisation de pesticides apparaît bénéfique : en l'absence de traitements, les rendements de production seraient diminués. Les autres utilisations sont liées aux industries (bois, textile, agro-alimentaire) ou aux traitements des voies ferrées et des routes.

L'utilisation de substances de synthèse telles que les pesticides pose cependant des problèmes en matière de santé publique et de dommages sur les écosystèmes. Aucun pesticide introduit dans l'environnement ne peut être considéré comme étant inoffensif. Les préoccupations concernant les effets de pesticides ne sont apparues que récemment, avec l'augmentation du nombre de molécules synthétisées et l'extension de leur utilisation.

II.3.2 Ecotoxicité des composés

Comparée à l'étude de la toxicité chez l'homme, celle de la toxicité pour les espèces environnementales passe souvent au second plan. Cependant, il a été mis en évidence, par exemple, une corrélation entre l'activité acétylcholinestérasique des poissons et l'épandage de pesticides organophosphorés sur les zones côtières (http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp). L'atrazine est un herbicide appartenant à la famille des triazines très persistant dans les sols. Il est peu accumulé chez les poissons et les autres animaux aquatiques. Gagnaire *et al.* (2003) n'ont pas observé d'effets de l'atrazine sur les paramètres hémocytaires (mortalité hémocytaire, estérase, peroxydase, lysosome, phagocytose, pourcentage de granulocytes) testés chez *Crassostrea gigas*. Cette molécule est pourtant connue pour sa génotoxicité (Bouilly *et al.*, 2002) et ses actions perturbatrices du développement embryonnaire chez cette même espèce. L'atrazine a aussi causé un taux de mortalité élevé (60 à 70%) à des concentrations de 0,1 et 0,2 mg/L après deux mois d'exposition chez des adultes de *C. gigas* (Moraga et Tanguy, 2000). Les effets de l'atrazine susceptibles d'affecter les organismes aquatiques sont très variés. Des effets sur la capacité de développement, le potentiel reproducteur, le comportement, le métabolisme, la photosynthèse,

Gènes cellulaires identifiés	Espèce à l'origine de l'identification
Sous-unité alpha de la pompe Na ⁺ /K ⁺ ATPase (ATPa)	Crabe
Nucléoporine 98 (Nuc)	Homme
Protéine Finger (Fing)	Xénope - Souris
Protéine RAS 3 (Ras)	Drosophile
Protéine précurseur du Glypican-6 (Gly)	Homme – Souris
Protéine de l'apoptose PNAS-2 (PNAS)	Homme
NADPH Oxydase (Oxy)	Homme
Protéine du péroxisome (Per)	Poisson zèbre
Phospolipase C (Phos)	Homme
Facteur d'élongation d'acides gras (E2F)	Macaque
Calmoduline	Oursin
Ubiquitine E1	Poisson rouge
Protéine Rho1	Drosophile

Tableau 1 : Gènes cellulaires viro-induits par OsHV-1, nouvellement identifiés chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

la croissance, la mortalité ont été reportés et montrent des modes d'action de l'atrazine différents selon les organismes. La terbutylazine, un algicide, un bactéricide et un bactériostatique appartenant à la famille des triazines comme l'atrazine, persiste dans les sols car peu sensible à l'hydrolyse et à la photolyse. Il est légèrement toxique vis à vis des invertébrés aquatiques, mais peut devenir très toxique pour les espèces d'invertébrés vivant au niveau des estuaires (Environmental Protection Agency : EPA, 1995). Le diuron, un herbicide appartenant à la famille des urées substituées, est également persistant dans les sols. Il est modérément toxique pour les poissons, mais toxiques pour les invertébrés aquatiques (<http://extoxnet.orst.edu/pips/diuron.htm>). Nebeker et Schuytema (1998) ont conduit des tests de toxicité du diuron en suivant des effets sur la survie, la croissance et les embryons de quatre espèces de grenouille. Les résultats sont statistiquement significatifs pour des concentrations en diuron de l'ordre de 7 mg/L, concentration non retrouvée dans le bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime, France) où elle se situe à 0,51 µg/L. Le carbaryl, un insecticide de la famille des carbamates, est également utilisé comme molluscide. Il est non toxique pour les oiseaux et modérément toxique pour les poissons où il est rapidement métabolisé. De plus, il est peu persistant dans les sols (demi-vie de 7 à 14 jours) en raison d'une dégradation par les bactéries et la lumière (<http://extoxnet.orst.edu/pips/carbaryl.htm>) Le glyphosate, un herbicide non sélectif, apparaît comme peu toxique pour les poissons et modérément toxique pour les invertébrés aquatiques (<http://extoxnet.orst.edu/pips/glyphosate.htm>). Néanmoins, des effets de ce composé ont été montrés sur le développement, la croissance et la physiologie des mollusques (http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp). L'alachlore, un herbicide de la famille des chloroacétamides, est décrit comme peu toxique chez les invertébrés marins et fortement toxique pour les plantes aquatiques (EPA, 1998). Des effets toxiques sont également rapportés sur le phytoplancton et le zooplancton en terme de mortalité, reproduction et développement (http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp). Le fosetyl-al, un fongicide, est considéré comme sans risque vis à vis des oiseaux et des poissons (EPA, 1991). Des effets ont été observés néanmoins sur les mollusques (intoxication), les poissons (mortalités), le zooplancton et le phytoplancton (http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp).

II.3.3 Relations entre polluants et sensibilité aux maladies infectieuses

Le système de défense des huîtres repose essentiellement sur les hémocytes, qui possèdent différentes activités, notamment la phagocytose, la production et la libération de molécules actives, et la destruction de corps étrangers (virus, bactéries et parasites). L'altération des fonctions hémocytaires chez les bivalves marins exposés à des contaminants environnementaux peut être associée à l'augmentation de la sensibilité aux maladies (Cheng, 1988 ; Alvarez et Friedl, 1992 ; Sami *et al.*, 1993 ; Chu et Hale, 1994 ; Coles *et al.*, 1994, 1995 ; Pipe *et al.*, 1999 ; Chu *et al.*, 2002). Une étude rapporte l'effet du paraoxon, de l'éserine et du DFP (di-isopropylfluorophosphate) sur les estérases de la moule, *Mytilus edulis*, après 24 heures de contact *in vivo* à 3 mM (Galloway *et al.*, 2002).

Les données disponibles à l'heure actuelle montrent une altération des capacités du système immunitaires chez les mollusques bivalves et en particulier des huîtres exposées à différents types de contaminants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Sami *et al.*, 1993 ; Coles *et al.*, 1994 ; Wootton *et al.*, 2003), Les pesticides (Baier-Anderson et Anderson, 2000), les métaux lourds (Auffret *et al.*, 2002 ; Gagnaire *et al.*, 2004) ou encore les sédiments contaminés par différentes molécules (Olivier *et al.*, 2003).

MATERIELS ET METHODES

III. MATERIEL ET METHODES

III.1 Matériel biologique

Les huîtres utilisées proviennent de l'écloserie de la station Ifremer de La Tremblade (Charente-Maritime, France). Elles sont âgées de deux ans et mesurent environ 5cm. Les animaux sont maintenus en bac de 100 litres. La température de l'eau est progressivement augmentée d'un degré par jour pour atteindre une température finale de 19-20°C puis les animaux sont maintenus à cette température.

III.2 Protocoles expérimentaux

III.2.1 Exposition aux xénobiotiques

Les huîtres, après acclimatation à 19-20°C, sont disposées dans deux bacs de 100 litres dont un sert de témoin et l'autre à la contamination par un cocktail de pesticides : carbaryl, diuron, atrazine, terbutylazine, alachlore, metolachlore, glyphosate et fosetyl-al (Figure 4). Les concentrations utilisées sont proches de celles retrouvées dans le bassin de Marennes-Oléron (Tableau 2) (RNO, 2002 et GRAP, 2002). Ce mélange a été défini sur la base des tonnages épandus en Charente-Maritime et de la toxicité des composés. Chaque bac contient 150 huîtres. La température est ajustée à 20°C grâce à un système de résistances et un bullage est installé dans les bacs. L'eau des bacs est changée tous les jours (Figure 5). L'apport de nourriture est réalisée avec du phytoplancton, produit à l'écloserie Ifremer de La Tremblade, à raison de 5 litres par bacs (*Chaetoceros gracialis*). La contamination se déroule pendant huit jours au minimum, durée au bout de laquelle des premiers effets sur les hémocytes peuvent être observés, notamment une diminution de la phagocytose. Cette manipulation a été élaborée et optimisée dans le cadre d'un travail de thèse sur l'immunomodulation chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, par des pesticides (Gagnaire, communication personnelle).

III.2.2 Essais d'infection par inoculation d'un broyat de larves infectées dans la cavité péricardique

- *Origine du virus OsHV-1*

a – Broyat de larves axéniques infectées fraîches

▪ *Production de larves axéniques*

Les géniteurs, qui proviennent de l'écloserie IFREMER de La Tremblade (Charente-Maritime), sont tout d'abord brossés sous l'eau courante, rincés à l'alcool (70%) et séchés sous hotte à flux laminaire. Ensuite, les huîtres sont ouvertes avec un couteau stérilisé à l'alcool. Les animaux sont alors rincés successivement avec de l'eau de mer filtrée à 0.22µm, autoclavée et additionnée de Tween 80 (0.1%) et de l'eau de mer filtrée à 0.22µm autoclavée.

Pour identifier mâles et femelles, des gamètes sont prélevés à l'aide d'un couteau stérile et observés au microscope photonique. Seuls les individus possédant des gamètes adaptés à une fécondation (ovocytes en forme de poire et spermatozoïdes mobiles) sont sélectionnés et traités à la Bétadine (10%) (rinçage, puis contact de 10 minutes).

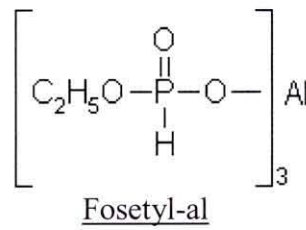
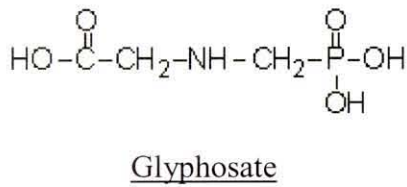
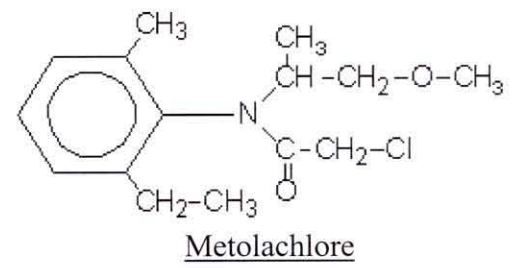
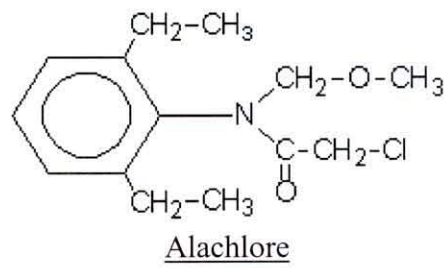
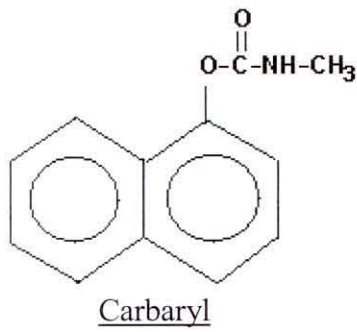


Figure 4 : Structure chimique des pesticides utilisés

Nom	Carbaryl	Diuron	Atrazine	Terbutylazine	Alachlore	Metolachlore	Glyphosate	Fosetyl-al
Concentration (µg/L)	0,05	0,5	0,7	0,6	0,8	0,6	0,7	0,6

Tableau 2 : Concentration des pesticides utilisée pour la contamination des huîtres

Après scarification de la gonade à l'aide d'une lame de scalpel stérile, les gamètes sont prélevés à l'aide d'une pipette stérile par aspiration, puis distribués dans un Erlen-Meyer contenant 200 mL d'eau de mer filtrée à 0,22 µm et autoclavée. La fécondation est effectuée pendant une heure avec une proportion de 15 spermatozoïdes pour un ovocyte à 23-24°C. Les œufs fécondés sont répartis dans huit bouteilles contenant 500 mL d'eau de mer filtrée, autoclavée et additionnée d'antibiotiques (acide oxolinique à 0.1 mg/L, kanamycine à 0.1 mg/L, érythromycine à 0.1 mg/L, pénicilline G à 0.75 mg/L, streptomycine à 1.5 mg/L et fluméquine à 30 µg/L) à raison de 1000 ovocytes fécondés par mL. Les ovocytes sont comptés à l'aide d'une cellule de Sedgewick. Les larves axéniques sont maintenues sans bullage ni apport de nourriture à une température de 23°C, puis 26°C après l'infection.

▪ *Infection des larves axéniques*

Des échantillons de larves congelées issues d'épisodes de mortalités survenus en 2004 à l'écloserie Ifremer de La Tremblade (Charente-Maritime), contrôlés comme infectées par PCR, sont utilisés. Cinq cents milligrammes de ce matériel sont broyés au piston Pellet stérile, puis repris dans 10 mL d'eau de mer filtrée et autoclavée. Après une centrifugation (2000 g, 10 minutes à 4°C), le surnageant est récupéré, puis filtré à 0.22µm et enfin distribué dans quatre bouteilles contenant les larves axéniques âgées d'environ huit jours. Les quatre autres bouteilles servent de témoin négatif.

Après sédimentation (de 48 à 72 heures après inoculation), les larves sont récupérées et reprises dans de l'eau de mer filtrée stérile afin de préparer la suspension virale. Le poids des larves est d'environ 500 mg. Des contrôles en PCR et en RT-PCR permettent de s'assurer de l'infection des larves.

b – Broyat de matériel biologique infecté congelé

Un essai d'infection des huîtres a été réalisé avec un broyat préparée à partir de larves congelées issues d'épisodes de mortalités survenus au cours de l'été 2004 à l'écloserie Ifremer de La Tremblade (Charente-Maritime), archivées au laboratoire et contrôlées comme infectées par PCR. Ce matériel biologique a été de nouveau contrôlé en PCR pour les essais d'infection.

- *Inoculation dans la cavité péricardique*

Les huîtres contaminées par le mélange de pesticides et non contaminées sont anesthésiées par balnéation dans une solution de chlorure de magnésium (MgCl₂) : 250g MgCl₂ sont ajoutés à un mélange d'eau de mer et d'eau douce (2/3), pendant trois heures.

Pendant l'anesthésie, le broyat est préparé. Les larves axéniques infectées ou le matériel biologique infecté congelé, sont repris dans 300µL d'eau de mer filtrée stérile, puis broyées au Piston-Pellet dans la glace. Dix millilitres d'eau de mer filtrée stérile y sont ajoutées. Cette suspension est centrifugée pendant 10 minutes (1500 g par minute) à 4°C. Le surnageant est ensuite filtré à 0,22µm. Le filtrat sert à l'inoculation dans la cavité péricardique des huîtres. Des contrôles en PCR sont réalisés pendant cette préparation afin de déterminer si il y a présence de virus dans la suspension virale ainsi préparée. Les témoins sont réalisés avec un broyat de larves axéniques contrôlées comme non infectées en PCR ou avec de l'eau de mer stérile, filtrée à 0,22 µm.

Après trois heures dans la solution de chlorure de magnésium, les deux valves des huîtres sont ouvertes laissant apparaître la cavité péricardique. Les huîtres contaminées avec

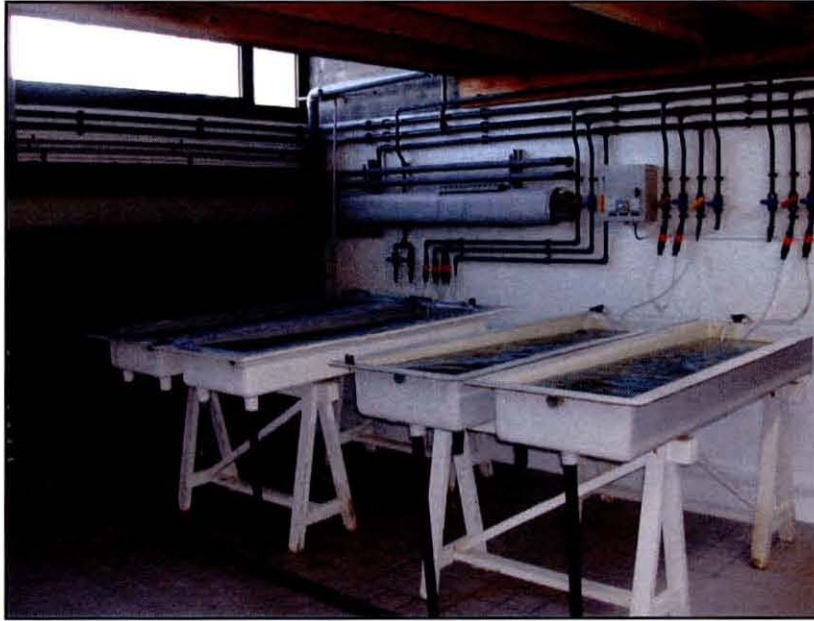


Figure 5 : Aperçu du dispositif expérimental pour la contamination des huîtres par des pesticides.

les pesticides et non contaminées sont alors inoculées à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille de 0,9*25 mm avec 50 µL de la suspension préparée précédemment. Les huîtres inoculées sont ensuite placées dans des aquariums de quatre litres à raison de 30 huîtres par aquarium. Un bullage assure l'oxygénation des aquariums et l'apport de nourriture se fait avec du *Chaetoceros gracialis*. La mortalité des animaux est relevée tous les jours.

Pour résumé, deux expériences ont été réalisées, la première en prenant le matériel congelé infecté pour préparer le broyat servant à l'inoculation. Dans ce cas, de l'eau de mer stérile et filtrée à 0,22 µm a servi de contrôle négatif. La deuxième en prenant des larves axéniques infectées fraîches pour préparer le broyat servant à l'inoculation. Dans ce cas, un broyat de larves axéniques non infectées a servi de témoin (Figure 6).

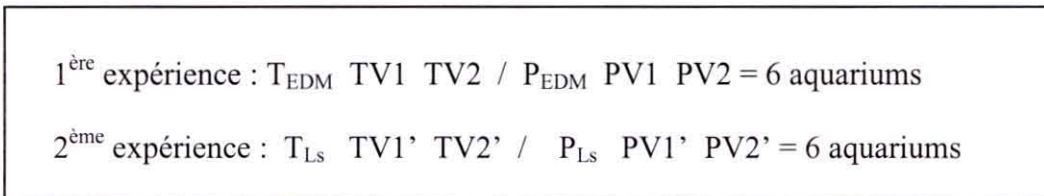


Figure 6 : Schéma du dispositif des aquariums des deux expériences d'infections (T : huîtres non contaminées ; P : huîtres contaminées par des pesticides ; V : aquarium inoculé avec le broyat issu de larves axéniques infectées; V' : aquarium inoculé avec le broyat issu de matériel congelé infecté ; EDM : inoculation d'eau de mer stérile, filtrée à 0,22 µm ; Ls : inoculation d'un broyat de larves axéniques non infectées).

III.2.3 Prélèvement d'hémolymphe

Après 24 et 48 heures post-inoculation, l'hémolymphe de dix huîtres par bacs est prélevée dans le muscle adducteur à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille de 0,9*25 mm. Environ 1 mL d'hémolymphe par huître est prélevé. L'hémolymphe des dix animaux est poolée afin de diminuer les variations inter-individuelles, puis centrifugée pendant 10 minutes à 4°C (1500 g par minute). Le culot contenant les hémocytes est repris dans 1,5 mL de Trizol afin d'extraire l'ARN et conservé à -20°C.

III.3 Techniques d'analyse moléculaire

III.3.1 Extraction d'ARN

Les ARN des hémocytes sont extraits suivant le protocole du fournisseur Gibco BRL (Annexe 1). Il est basé sur l'utilisation d'un réactif contenant du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine appelé Trizol®. La qualité des ARN est contrôlée par une méthode spectrophotométrique et par électrophorèse en gel d'agarose (1%).

III.3.2 Recherche d'ADN et d'ARN viraux

Le virus OshV-1 est recherché dans les échantillons d'ARN extraits d'hémocytes en PCR et RT-PCR avec des amorces spécifiques de OshV-1. Trois couples d'amorces sont utilisés : OHV1/OHV2, Gp1/Gp2 et IAP1/IAP2. Le premier couple permet d'amplifier une zone codant pour deux protéines de fonction inconnue, le deuxième couple un fragment du gène Gp codant pour une glycoprotéine putative et le troisième couple un fragment d'un gène

codant pour une protéine virale ayant des homologies avec une protéine inhibitrice de l'apoptose.

III.3.3 Suivi de l'expression de gènes cellulaires par RT-PCR semi-quantitative

Neuf gènes cellulaires d'intérêt sont suivis en RT-PCR semi-quantitative : sous-unité alpha de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase (ATPa), nucléoporine 98 (Nuc), protéine finger (Fing), protéine RAS 3 (Ras), précurseur du glypican-6 (Gly), protéine d'apoptose PNAS-3 (PNAS), NADPH oxydase (Oxy), phospholipase C (Phos) et protéine du péroxysome (Per).

Un gène cellulaire témoin dont l'expression est homogène dans les deux populations d'ARN est également suivi en RT-PCR afin d'estimer et de contrôler les quantités d'ARN au début de la RT-PCR. Ce gène code pour la sous-unité ribosomale 28S (DNAx).

Des amorces spécifiques de ces gènes ont été dessinées puis fabriquées par l'entreprise Eurogentec (Tableau 3).

Le kit « Access RT-PCR system » de Promega est utilisé pour réaliser les analyses en RT-PCR. Le mix réactionnel est présenté dans le tableau 4 :

	Volume (µL)	Concentration finale
Tampon 5X	20	1X
dNTP (10mM)	2	0,2mM
MgSO ₄ (25mM)	4	1mM
Amorce 1	0,5	1µM
Amorce 2	0,5	1µM
Reverse Transcriptase (5u/µL)	2	0,1u/µL
<i>Tfi</i> DNA polymerase	2	0,1u/µL
ARN	2	2ng
Eau	66	

Tableau 4 : Préparation du mix réactionnel pour la RT-PCR (en bleu : paramètres optimisés)

La quantité de MgSO₄ est optimisée pour chaque gène étudié. Afin de comparer l'intensité du signal, la RT-PCR est réalisée avec la même quantité d'ARN pour chaque échantillon : 100 ng/µL.

Le cycle de la réaction est le suivant :

- 45°C pendant 45 minutes : reverse transcription
- 94°C pendant 2 minutes : inactivation de la reverse transcriptase
- 94°C pendant 30 secondes : dénaturation
- 60°C pendant 1 minute : hybridation (cette température varie suivant les amorces utilisées à cause de la température de fusion : T_m)
- 68°C pendant 2 minutes : élongation
- 68°C pendant 7 minutes : extension finale

40 cycles

Afin d'étudier l'évolution de l'intensité du signal en fonction du nombre de cycle de PCR, 7 µL de la réaction sont prélevés tous les cycles à partir du 19^{ème} cycle jusqu'au 27^{ème} cycle. Ensuite 7 µL sont prélevés au cycle 30, 33 et 40. Cette manière de prélever élimine le cycle d'extension final à l'exception du 40^{ème} cycle.

Gènes cellulaires	Nom des amorces	Séquence des amorces	Nombre de bases	Tm (°C)	Amplicons (pb)
Sous-unité ribosomale 28S (DNAx)	DNAx1	AAGGGCAGGAAAAGAACTAAC	22	62	350
	DNAx2	TTCCCTCTAAGTGGTTTCAC	21	60	
Sous-unité alpha Na ⁺ /K ⁺ ATPase (ATPa)	ATPa1	AGGCAAGTGTCTTGGTTGG	20	60	159
	ATPa2	GCTCACATGTGGTTTGATGG	20	60	
Nucléopore 98 (Nuc)	Nuc1	ACCTGCCAAGTTAGGTGGTG	20	62	184
	Nuc2	TGAGGTCCACATTCCATCAA	20	58	
Protéine finger (Fing)	Fing1	TCTCATTCCAGGCCAATTC	20	58	155
	Fing2	CTGAGGCAGTCTCTGGTTCC	20	64	
Protéine Ras 3 (Ras)	Ras1	GCCATGTTGTTTTGTTACG	20	58	166
	Ras2	TCCATCAGAATAGGCCGAAC	20	60	
Précurseur du Glypican-6 (Gly)	Gly1	GCCTACCACTCGAACTCAA	19	58	166
	Gly2	TCACCCTCAGGCTGTTTTCT	20	60	
Protéine d'apoptose PNAS-2 (PNAS)	PNAS1	GCAACTACCGGTAACATGC	21	62	226
	PNAS2	GAGCATGAAGGAAGGAAACG	20	60	
NADPH oxydase (Oxy)	OXY1	AGCTGTTTGGTCCAATGTCC	20	60	190
	OXY2	CATCTGGGGTGTGTCATCTG	20	62	
Protéine du peroxysoxe (Per)	Per1	TGCCTGTTGAATACCGTGTTA	21	60	250
	Per2	TTGGAATCTCACATATCAAGCA	22	60	
Phospholipase C (Phos)	Phos1	GCTCAGCCTCTTTCTGGATG	20	62	217
	Phos2	GGGCAGTAGGACAGACTCCA	20	64	

Tableau 3 : Séquence et caractéristiques (nombre de bases et température d'hybridation : Tm) des amorces des gènes cellulaires étudiés et la taille des amplicons attendus.

III.3.4 Analyse électrophorétique

Les produits de PCR ou RT-PCR sont déposés sur gel d'agarose (1%) pour effectuer une électrophorèse. Une caméra numérique permet la numérisation des photos du gel afin de permettre l'analyse d'image.

Un schéma récapitulatif des expérimentations est présenté en figure 7.

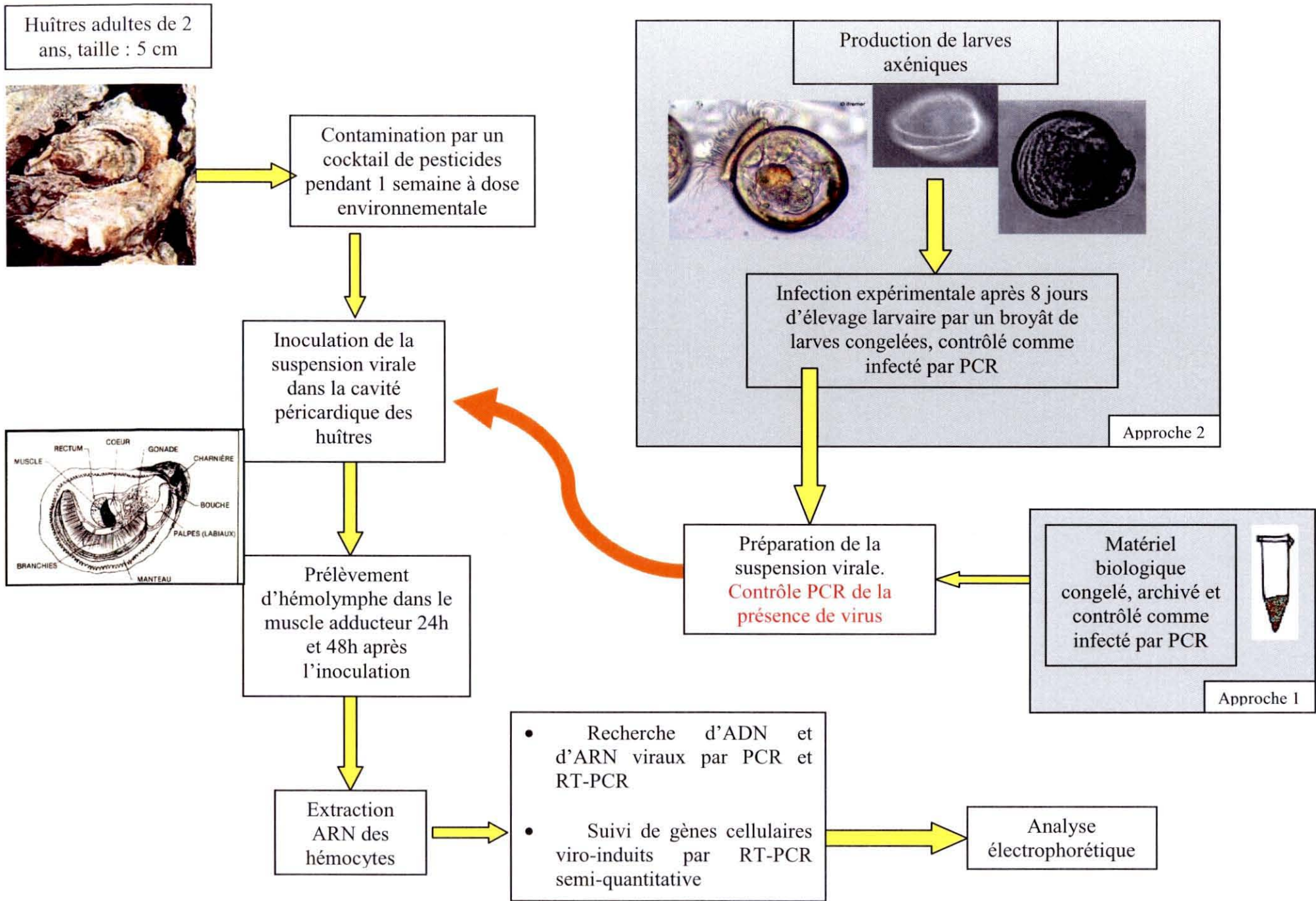


Figure 7 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

RESULTATS

IV. RESULTATS

IV.1 Essais d'infection virale

IV.1.1 Utilisation du matériel biologique infecté congelé

- *Contrôle du matériel biologique*

De l'ADN viral a été détecté en PCR sur les larves congelées et archivées servant à la préparation du broyat pour l'inoculation des huîtres adultes (Figure 8).

- *Recherche d'ADN/ARN viraux dans les hémocytes d'huîtres adultes ayant reçu une injection de broyat de larves infectées*

Un essai préliminaire d'infection sur des huîtres non contaminées par des pesticides a été réalisé avec du matériel biologique infecté congelé. De l'ARN viral a été détecté en RT-PCR dans les hémocytes des huîtres inoculées après 48 heures (V1 et V2, Figure 9). Néanmoins, l'intensité du signal est nettement plus importante dans l'un des deux aquariums (V2) (Figure 9). Une bande de faible intensité est également observée 48 heures après inoculation pour l'échantillon d'ARN provenant d'un lot témoin (T2, Figure 9). Aucune mortalité n'a été relevée durant cet essai.

Dans une seconde étape, un essai d'infection avec le même matériel biologique infecté congelé a été réalisé. La présence d'ADN et d'ARN viraux dans les hémocytes d'huîtres contaminées et non contaminées que ce soit à 24 heures ou 48 heures post-inoculation, n'a pas été montrée. De plus, aucune mortalité n'a été observée dans les deux types de population.

IV.1.2 Utilisation de larves axéniques infectées fraîches

- *Production de larves axéniques infectées et recherche d'ADN/ARN viraux*

Deux essais d'infection de larves axéniques pour préparer le broyat servant à l'inoculation des huîtres adultes ont été effectués. La sédimentation des larves axéniques a été observée pour les bouteilles « infectées » lors des deux essais. Elle a permis d'apprécier l'état d'infection de ces larves. Aucune sédimentation n'a été détectée dans les bouteilles témoins. Cependant, les contrôles en PCR et en RT-PCR sur les larves provenant des bouteilles « infectées » n'ont pas montré la présence d'ADN et d'ARN viraux. Il en est de même pour les larves provenant des bouteilles témoins.

Le contrôle du matériel biologique (larves axéniques fraîchement produites) avant injection aux huîtres adultes n'a pas permis la détection de virus en PCR pour les deux essais d'infection réalisés. Malgré ces résultats, les larves provenant du second essai ont été utilisées pour réaliser une injection chez les huîtres adultes.

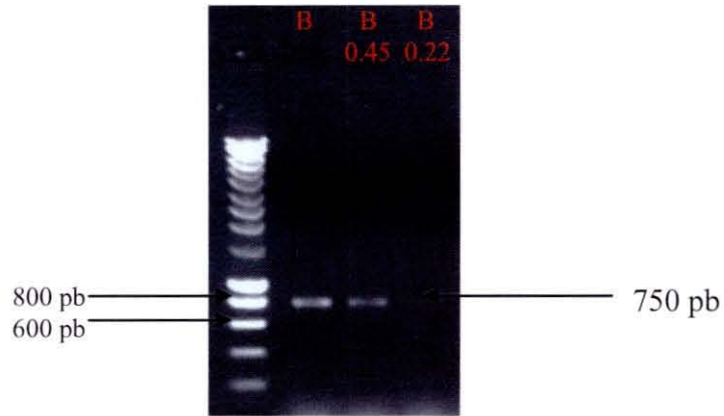


Figure 8 : Contrôle du matériel biologique par PCR avec l'amorce OHV (B : broyat pur ; B 0.45 : broyat filtrée à 0.45 μm ; B 0.22 : broyat filtrée à 0.22 μm).

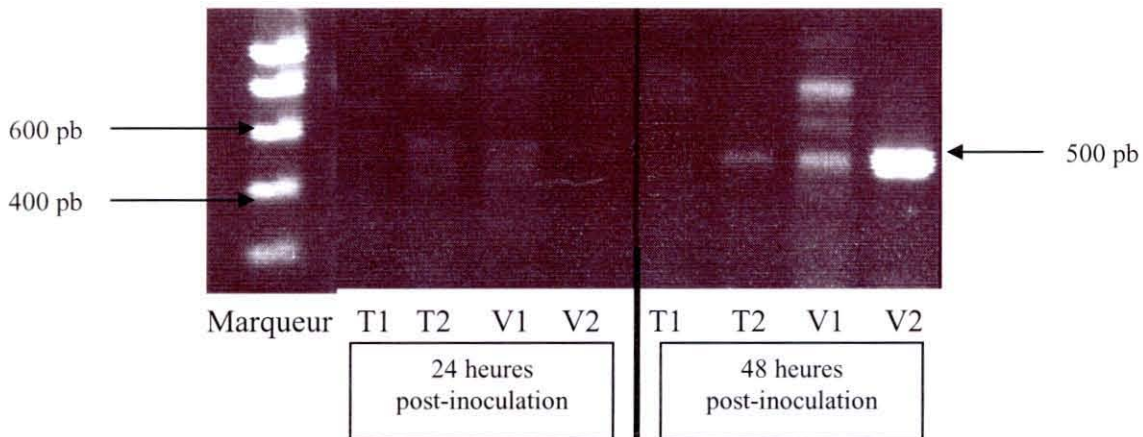


Figure 9 : Essai d'infection d'huîtres creuses adultes (non contaminées par des pesticides) par inoculation de larves infectées congelées. Recherche d'ARN viral par RT-PCR 24 heures et 48 heures post-inoculation (T : Témoin, inoculation d'eau de mer ; V : Virus, inoculation de la suspension virale).

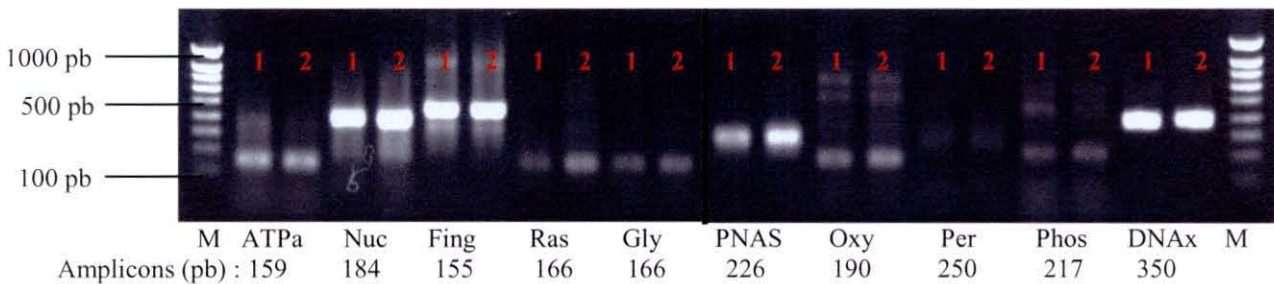


Figure 10 : Optimisation de l'utilisation d'amorces dessinées pour amplifier des gènes cellulaires viro-induits et un gène de contrôle codant la sous-unité ribosomale 28S (DNAX). Analyse électrophorétique des produits obtenus en RT-PCR sur deux échantillons d'ARN d'hémocytes (1 et 2) pour rechercher la spécificité des amorces dessinées pour les gènes (M : marqueur de taille).

- *Recherche d'ADN/ARN viraux dans les hémocytes d'huîtres adultes ayant reçu une injection de broyat de larves « fraîches »*

Il n'a pas été retrouvé d'ADN viral en PCR et d'ARN viral en RT-PCR dans les hémocytes des animaux inoculés avec le broyat issu de larves axéniques expérimentalement « infectées ». De plus, aucune mortalité n'a été observée à 24 heures et à 48 heures après l'inoculation des huîtres adultes.

IV.2 Suivi de l'expression des gènes cellulaires viro-induits

- *Optimisation des conditions de RT-PCR*

Des amorces spécifiques pour neuf gènes candidats et un gène témoin ont été dessinées (un couple d'amorces par gène, Tableau 3) et leurs conditions d'utilisation optimisées. Sur les dix couples d'amorces testées, six ont permis l'obtention d'amplicons de taille attendue (ATPa, Ras, Gly, PNAS, Per et DNAX). Des bandes de tailles dépassant 400 pb, taille supérieure à celle des amplicons attendues sont observées pour les couples d'amorces permettant d'amplifier les gènes Nuc et Fing (Tableau 3). Pour les couples d'amorces spécifiques des gènes Oxy et Phos, il y a présence de bandes multiples, dont la bande de taille attendue (190 pb et 217 pb respectivement) (Figure 10). Ces résultats sont obtenus après optimisation des conditions de PCR en faisant varier la température d'hybridation, la concentration en MgCl₂ ainsi que la quantité d'ARN matrice.

- *Suivi de l'expression de gènes cellulaires viro-induits chez des huîtres adultes après contact avec un mélange de pesticides :*

a. Après inoculation de larves axéniques non infectées :

L'expression des gènes cellulaires ATPa, Ras, Gly, PNAS et Per dans les hémocytes des huîtres contaminées est globalement plus faible par rapport aux huîtres non contaminées. Cette observation est particulièrement vérifiée pour un nombre de cycles de PCR allant de 19 à 25 de PCR (Figure 11). Il est également observé relativement peu de différences d'expression suivant le temps post-inoculation (24 heures et 48 heures) dans les premiers cycles de PCR, quelle que soit la population d'huîtres étudiées (contaminées ou non contaminées). Dans les derniers cycles, les fluctuations semblent plus aléatoires (Figure 11 et Figure 12).

L'expression du gène contrôle (DNAX) varie peu entre la population d'huîtres contaminées et non contaminées et ce quel que soit le temps post-inoculation (24 heures et 48 heures) (Figure 12).

Plus spécifiquement, pour le gène ATPa, outre la sous-expression dans la population d'huîtres contaminées, il semblerait qu'il y ait de légères variations, pour la population non contaminée, suivant le temps post-inoculation. A 24 heures, le signal est plus fort (Figure 11). Pour le gène Gly, la sous-expression dans la population contaminée est nette, notamment pour un nombre de cycles de PCR de 24 (Figure 12). Dans les derniers cycles de PCR, il existe des différences, dans la population contaminée, suivant le temps post-inoculation. Pour un nombre de cycle de 30, 33 et 40, le signal à 48 heures post-inoculation, atteint celui de la population témoin (Figure 11). Pour le gène Per, les différences sont observables jusqu'au

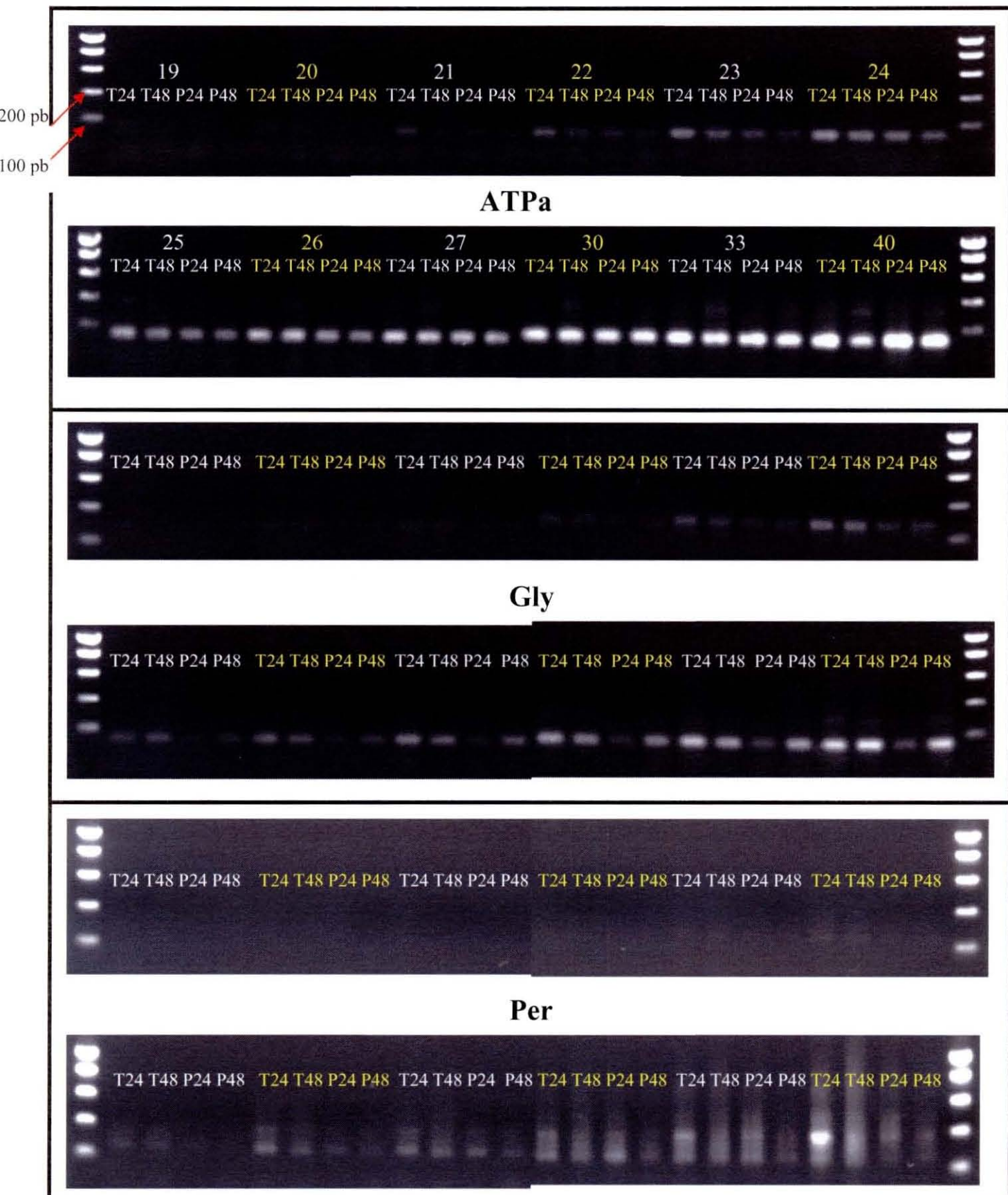


Figure 11 : Suivi d'expression des gènes cellulaires (ATPa, Gly et Per) par la technique de RT-PCR semi-quantitative, 24 et 48 heures post-inoculation avec un broyat provenant de larves axéniques non infectées (en couleur : cycle de PCR, de 19 à 40 ; T : huîtres non contaminées ; P : huîtres contaminées par des pesticides).

25^{ème} cycle de PCR. La sous-expression, dans la population contaminée, est bien observable pour un nombre de cycles de 24 (Figure 11). Pour le gène PNAS, la sous-expression entre les deux populations d'huîtres est particulièrement observable pour les nombres de cycles 24 et 25. Il y a peu de variations suivant le temps inoculation dans les deux populations, exceptées pour les derniers cycles de PCR dans la population d'huîtres contaminées (Figure 12). Pour le gène Ras, les profils d'expression ressemblent à ceux obtenus avec le gène Per. C'est à dire, une sous-expression observable dans les premiers cycles de PCR.

b. Après inoculation d'eau de mer stérile, filtrée à 0,22 µm

Les résultats sont identiques à ceux obtenus en utilisant un broyat de larves axéniques non infectées, à savoir une sous-expression globale des gènes cellulaires ATPa, Ras, Gly, PNAS et Per dans les hémocytes des huîtres contaminées. Seuls les résultats pour les gènes Gly, PNAS et ATPa, 48 heures post-inoculation, sont représentés d'une manière différente que précédemment (Figure 13, 14 et 15 respectivement). Dans cette manière de présenter, la différence d'expression dans les deux populations d'huîtres est surtout marquée pour les derniers cycles de PCR (Figure 13, 14 et 15).

- *Suivi de l'expression de gènes cellulaires viro-induits chez des huîtres adultes contaminées et non contaminées par des pesticides après inoculation de matériel biologique infecté :*

a. Après inoculation de larves axéniques « infectées » :

Les échantillons ont été extraits et sont en cours d'analyses.

b. Après inoculation du broyat infecté (matériel congelé infecté) :

Les échantillons ont été extraits et sont en cours d'analyses.

DISCUSSION

V. DISCUSSION

Les mécanismes par lesquels l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, répond aux agents infectieux, notamment le virus OsHV-1, restent largement inconnus. L'utilisation de la technique d'hybridation soustractive suppressive (SSH) a été utilisée pour aider à la compréhension des mécanismes moléculaires de la réponse de l'animal vis à vis du virus OsHV-1. En effet, les gènes cellulaires, étudiés dans ce travail, ont été nouvellement identifiés par SSH comme des gènes sur-exprimés en présence du virus. La première étape de cette étude a été d'optimiser les conditions d'amplification de ces gènes d'intérêt en RT-PCR. Dans un second temps, leur expression a été suivie dans des hémocytes d'huîtres contaminées et non contaminées par un mélange de pesticides, afin d'étudier les capacités immunomodulatrices de ces composés. En effet, des travaux menés au LGP (La Tremblade, Charente-Maritime) ont permis de montrer qu'un mélange de pesticides induisait chez l'huître creuse une diminution de la phagocytose (Gagnaire, communication personnelle). Ensuite, des essais d'infection avec le virus OsHV-1 ont été réalisés et le succès de l'infection expérimentale a été recherché en mettant en œuvre des outils moléculaires (PCR et RT-PCR). Dans une dernière étape, la sensibilité d'huîtres creuses adultes au virus OsHV-1 en présence de pesticides a été explorée par approche moléculaire.

Après optimisation des conditions de RT-PCR, la technique de RT-PCR semi-quantitative a été utilisée pour évaluer l'expression de gènes cellulaires ciblés. L'expression du gène codant la sous-unité ribosomale 28S est considérée comme relativement constante dans la cellule et sert à la vérification des quantités d'ARN utilisées pour la RT-PCR. Ce gène présente un profil d'expression similaire dans les hémocytes d'huîtres contaminées et non contaminées. De ce fait, les quantités d'ARN ayant servi pour la RT-PCR au début de la réaction entre les ARN extraits d'hémocytes provenant d'huîtres contaminées (pesticides) et non contaminées ont été considérés comme similaires, conditions *sine qua none* à la comparaison des profils d'expression.

L'expression de cinq gènes cellulaires (identifiés comme ayant des homologues avec la sous-unité alpha de la pompe Na^+/K^+ ATPase (ATPa), la protéine Ras 3 (Ras), le précurseur du glypican-6 (Gly), la protéine d'apoptose PNAS-2 (PNAS) et la protéine du péroxysome (Per)) a été étudiée dans des hémocytes d'huîtres non contaminées et contaminées pendant huit jours avec un mélange de pesticides à concentrations environnementales et inoculées avec une suspension témoin (broyat de larves axéniques non infectées ou eau de mer stérile, filtrée à 0,22 μm). L'analyse densitométrique des bandes d'électrophorèse a montré, malgré quelques variations, une sous-expression de ces gènes dans la population d'huîtres contaminées. Ce résultat est observé à 24 heures post-inoculation, à 48 heures post-inoculation le gène Gly et PNAS retrouvent des niveaux d'expression comparables au témoin (huîtres non contaminées). Quatre gènes n'ont pas pu être étudiés (Nuc, Fing, Oxy et Phos) en raison de l'absence de bandes de tailles attendues ou par la présence de bandes multiples sur le gel d'électrophorèse. Une sous-expression des gènes ciblés a été observée chez les huîtres au contact d'un mélange de pesticides. Ce type de résultats a déjà été rapporté chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. En effet, Tanguy *et al.* (2005) ont démontré que chez cette espèce, une exposition à un mélange de trois pesticides (atrazine, diuron et isoproturon) induisait des modulations de l'expression de différents gènes. Par ailleurs, chez cette même espèce, il a été démontré que le gène de la monoamine oxydase A était sous-exprimé après un contact avec des pesticides (Boutet *et al.*, 2004). Il ressort de ce travail qu'un mélange de pesticides modulent l'expression (sous-expression) de gènes identifiés comme sur-exprimés dans les hémocytes d'huîtres en présence du virus OsHV-1. Les gènes cellulaires ciblés ne sont pas considérés comme des gènes de défense à proprement parler. Le rôle des produits

issus de ces gènes reste à déterminer. Dans ces conditions, il est difficile d'imaginer les effets de leur sous-expression sur la sensibilité des animaux à l'infection à OsHV-1.

Des essais d'infection d'huîtres adultes avec le virus OsHV-1 ont été réalisés au cours de ce travail dans l'objectif d'étudier les interactions entre contamination avec des pesticides et sensibilité à l'infection virale. Deux sources différentes de virus ont été utilisées : des larves naturellement infectées et conservées à -20°C et des larves expérimentalement infectées. Pour suivre le succès de l'infection expérimentale chez les animaux adultes, il a été choisi de rechercher le virus dans les hémocytes par PCR et RT-PCR. Les analyses réalisées pour suivre les essais d'infection réalisés n'ont pas permis la mise en évidence d'ADN viral et d'ARN viral dans les hémocytes, excepté dans un essai préliminaire utilisant comme source de virus du matériel infecté congelé. Un essai d'infection avec ce matériel, sur des huîtres non contaminées, a abouti à la détection d'ARN viral dans les ARN extraits d'hémocytes. Ce résultat peut laisser suspecter la réplication virale chez des huîtres adultes et montre l'intérêt d'utiliser des outils moléculaires (sensibles) pour suivre l'infection. Des travaux réalisés au LGP (La Tremblade, Charente-Maritime) ont montré la difficulté à obtenir un protocole reproductible d'infection expérimentale au stade naissain et adulte chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Arzul, 1997 ; Arzul, 1998). Chez les huîtres adultes, aucune mortalité et aucune lésion n'ont pu être observées après essais d'infection expérimentale. Cependant, les outils moléculaires permettant une recherche spécifique du virus n'étaient alors pas disponibles. Les résultats négatifs obtenus dans ce travail pourraient s'expliquer de différentes manières :

- une absence de particules virales infectieuses (intègres) dans les différentes sources de virus utilisées aboutissant à une absence d'infection expérimentale ;
- un défaut de détection du virus du fait d'une inadéquation des couples d'amorces utilisés et des gènes viraux ciblés ;
- un choix des cellules sélectionnées (hémocytes) non adapté au suivi de l'infection virale.

Ces observations traduisent les difficultés pour s'approvisionner en virus OsHV-1. L'absence de lignée cellulaire de bivalves marins ainsi que l'impossibilité d'infecter des lignées cellulaires existantes avec OsHV-1 ne permet pas de produire le virus *in vitro* (Le Deuff *et al.*, 1994 ; Renault *et al.*, 1995 ; Deniau, 2000). La technique de production de larves axéniques infectées comme système de multiplication du virus, a été établie pour permettre de remédier à ces difficultés (Le Deuff *et al.*, 1994 ; Le Deuff *et al.*, 1996 ; Arzul *et al.*, 2001a et 2001b). Cependant, le pouvoir infectieux du virus peut être perdu dans du matériel biologique conservé à -20°C (larves naturellement infectées conservées congelées). La congélation peut avoir un effet destructeur sur l'enveloppe virale, composant indispensable à la pénétration du virus dans les cellules cibles. L'absence de système cellulaire permettant la multiplication du virus *in vitro* empêche toute évaluation *a priori* du pouvoir infectieux des particules virales contenues dans du matériel archivé.

La recherche d'ADN viral et d'ARN viral est réalisée en prenant trois couples d'amorces spécifiques d'OsHV-1 : OHV, Gp et IAP. L'extraction d'ARN des hémocytes des huîtres est effectuée 24 heures et 48 heures après l'inoculation de la suspension virale. Le cycle de réplication viral n'étant pas connu, les gènes viraux ciblés pour la détection ne pourraient ne pas permettre de détecter une infection précoce. Le gène Gp code pour une glycoprotéine d'enveloppe. Chez HSV-1, la formation de l'enveloppe se situe à la fin du cycle de réplication, aux alentours de 18 heures (Huraux *et al.*, 2003). Le gène OHV code pour

deux protéines de fonction inconnue et le gène IAP code pour une protéine inhibitrice de l'apoptose. Aujourd'hui, les gènes d'expression précoce et tardive n'ont pas été identifiés chez le virus OsHV-1. Le ciblage de gènes précoces permettrait de détecter la multiplication du virus dans les premières heures après l'inoculation.

Une expérimentation préliminaire au cours de ce travail a permis de détecter de l'ARN viral dans des hémocytes d'huîtres. De ce fait, ce type cellulaire a été choisi pour suivre le succès des infections expérimentales. Ce sont de plus des cellules faciles à collecter ou à prélever. Cependant, la rare détection du virus dans les hémocytes en microscopie électronique au cours d'épisodes d'infections naturelles pose la question de leur permissivité au virus OsHV-1. Dans ces conditions, d'autres types cellulaires pourraient être plus adaptés pour apprécier la réplication virale dans des animaux expérimentalement infectés. Les cellules de type fibroblastique des tissus conjonctifs semblent de bons candidats dans la mesure où ce type cellulaire correspond aux cellules cibles. Cependant, il apparaît une difficulté en terme de prélèvement.

Le suivi de l'expression des cinq gènes cellulaires dans les hémocytes d'huîtres (contaminées et non contaminées) inoculées avec le broyat de larves « infectées » (matériel congelé *versus* larves axéniques) est en cours d'analyse. Les ARN sont extraits, la technique de RT-PCR n'est pas encore réalisée. De ce fait, il n'est pas possible d'étudier les interactions entre contamination par des pesticides et sensibilité à l'infection par OsHV-1 des huîtres creuse. Cependant, aucune mortalité n'a été relevée 48 heures post-inoculation, dans les deux populations.

BIBLIOGRAPHIE

VI. BIBLIOGRAPHIE

- Adamkewicz S.L., Harasewych M.G., Blake J., Saudek D. and Bult C.J. (1997). A molecular phylogeny of the bivalve mollusks. *Mol. Biol. Evol.*, **14** (6) : 619-629.
- Agut H, Dupin N., Aubin J.T. and Calvez V. (1997). L'herpèsvirus humain 8. *Virologie*, **1** : 31-39.
- Alderman D.J. and Gras P. (1969). Gill disease of Portuguese oyster. *Nature*, **224** : 616-617.
- Alvarez M.R. and Friedl F.E. (1992). Effects of a fungicide on in vitro hemocyte viability, phagocytosis and attachment in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, **107** : 135-140.
- Amiche M., Seon A.A., Wroblewski H. and Nicolas P. (2000). Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermasptin genes family. *Eur. J. Biochem.*, **267** : 4583-4592.
- Arzul I. (1997). Essais de transmission de l'infection à virus de type herpès chez les huîtres creuses, *Crassostrea gigas*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. Rapport de stage. 48 pp.
- Arzul I. (1998). Transmission expérimentale du virus de type herpès chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Diplôme d'Etudes Approfondies d'Océanologie Biologique. 33 pp.
- Arzul I., Renault T. and Lipart C. (2001a). Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves : demonstration of interspecies transmission. *Dis. Aquat. Org.*, **46** : 1-6.
- Arzul I., Nicolas J.L., Davison A.J. and Renault T. (2001b). French scallops : a new host for ostreid herpesvirus-1. *Virology*, **290** : 342-349.
- Arzul I. and Renault T. (2002). Herpèsvirus et bivalves marins. *Virologie*, **6** : 169-174.
- Asokan R., Arumugan M. and Mullainadhan P. (1997). Activation of prophenoloxdase in plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis*. *Developmental and Comparative Immunology*, **21** : 1-12.
- Auffret M. (1985). Morphologie comparative des types hémocytaires chez quelques mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse de 3^{ème} cycle d'Océanographie mention Biologie. Université de Bretagne Occidentale (Brest). 153 pp.
- Auffret M. and Oubella R. (1997). Hemocyte aggregation in the oyster, *Crassostrea gigas* : in vitro measurement an experimental modulation by xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol.*, **118A**, 705-712.
- Auffret M., Mudjdzic N., Corporeau C. and Moraga D. (2002). Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research*, **54** : 585-589.
- Azumi K., Yokosawa H. and Ishii S-I. (1990). Halocyanines: Novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biochemistry*, **29** : 159-165.
- Bachère E., Hervio D., Mialhe E. and Grizel H. (1990). Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Developmental and Comparative Immunology*, **14** : 261-268.
- Baier-Anderson C. and Anderson R.S. (2000). The effects of chlorothanil on oyster hemocyte activation : phagocytosis, reduced pyridine nucleotides, and reactive oxygen species production. *Environmental Research Section A*, **83** : 72-78.
- Beaumont A. et Cassier P. (1990). Biologie animale. Tome 1. édition Dunod, Paris, 3^{ème} édition, pp.459.
- Blaise C., Trottier S., Gagné F., Lallement C. and Hansen P.D. (2002). Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by miniaturized phagocytosis assay. *Environmental Toxicology*, **17** (3) : 160-169.
- Bouilly K., Leitao A., McCombie H. and Lapègue S. (2002). Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **22** : 219-223.
- Boutet I., Tanguy A. and Moraga D. (2004). Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1679** : 29-36.
- Carballal M.J., Lopez C., Azevedo C. and Villalba A. (1997). Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.*, **70** : 96-105.
- Cheng T.C. (1981). Bivalves. *Invertebrate Blood Cells* (N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley, eds), pp. 233-299. Academic Press, London.
- Cheng T.C. (1983). The role of lysosomes in molluscan inflammation. *American Zoology*, **23** : 129-144.
- Cheng T.C. (1988). In vivo effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica* : phagocytic and endocytotic indices. *Journal of Invertebrate Pathology*, **51** : 215-220.
- Cheng T.C. and Rodrick G.E. (1975). Lysozyme and other enzymes in hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **52** : 443-447.
- Cheng T.C., Lie K.J., Heyneman D. and Richard C.S. (1978). Elevation of aminopeptidase activity in *Biomphalaria glabrata* (mollusca) parasitized by *Echinostoma lindoense* (Trematoda). *Journal of Invertebrate Pathology*, **31** : 57-62.
- Chu L.E. and Hale R.C. (1994). Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in the easter oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.*, **38** : 243-256.

- **Chu F.-L., Volety A.K., Hale R.C. and Huang Y.** (2002). Cellular response and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field-contaminated sediments. *Marine Environmental Research*, **53** : 17-35.
- **Claveria C., Albar J.P., Serrano A., Buesa J.M., Barbero J.L., Martinez C. and Torres M.** (1998). Drosophila grim induces apoptosis in mammalian cells. *The EMBO Journal*, **17** (24) : 7199-7208.
- **Cohen J.J.** (1994). Apoptosis : physiologic cell death. *J. Lab. Clin. Med.*, **124** (6) : 761-765.
- **Coles J.A. and Pipe A.K.** (1994). Phenoloxydase activity in the hemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish and Shellfish Immunology*, **4** : 337-352.
- **Coles J.A., Farley S.R. and Pipe R.K.** (1994). Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, **30** : 367-379.
- **Coles J.A., Farley S.R. and Pipe R.K.** (1995). Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Disease of Aquatic Organisms*, **22** (1) : 59-65.
- **Comps M.** (1970). La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*, caractéristiques et évolution des altérations, processus de cicatrisation. *Revue des Travaux de l'institut des pêches maritimes*, **34**(1) : 23-44.
- **Comps M., Bonani J.R. and Vago C.** (1976). La mise en évidence d'une infection virale chez l'huître portugaise à l'occasion de l'épizootie de 1970-1974. *CR de l'Académie des Sciences Paris*, **282** : 1991-1993.
- **Comps M. and Bonami J.R.** (1977). Infection virale associée à des mortalités chez l'huître *Crassostrea angulata*. *CR de l'Académie des Sciences Paris*, **285** : 1139-1140.
- **Comps M. and Cochenec N.** (1993). A Herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **62** : 201-203.
- **Davison A.J.** (2002). Evolution of the herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, **86** : 69-88.
- **Davison A.J., Trus B.L., Cheng N., Steven A.C., Watson M.S., Cunningham C., Le Deuff R.M. and Renault T.** (2005). A novel class of herpesvirus with bivalves hosts. *J. Gen. Virol.*, **86** : 41-53.
- **Dégremont L.** (2003). Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat de l'Université de Caen/Basse-Normandie : 334 p.
- **Deniau S.** (2000). Essais de propagation in vitro de virus de type herpès infectant les mollusques bivalves marins et contribution à l'étude des interactions hôte-virus. *Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'école pratique des Hautes Etudes, Science de la Vie et de la Terre*, pp. 189.
- **Du Pasquier L.** (2001). The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **129** : 1-15.
- **Elston R.A.** (1997). Special topic review: bivalve mollusc viruses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **13** : 393-403.
- **Environmental Protection Agency, EPA.** (1991). R.E.D. FACTS, 738-F-90-100.
- **Environmental Protection Agency, EPA.** (1995). R.E.D. FACTS, EPA-738-F-95-006A.
- **Environmental Protection Agency, EPA.** (1998). R.E.D. FACTS, EPA-738-F-98-018.
- **Farley C.A.** (1978). Virus and viruslike lesion in marine molluscs. *Marine Fisheries Review*, **40** (10) : 18-20.
- **Farley C.A., Banfield W.G., Kasnic J.R.G. and Foster W.S.** (1972). Oyster herpes-type virus. *Science*, **178** : 759-760.
- **Foster J.S., Apicella M.A. and McFall-Agai.** (2000). *Vibrio fischeri* lipopolysaccharide induces developmental apoptosis, but not complete morphogenesis, of the euprymna scolopes symbiotic light organ. *Developmental Biology*, **226** : 242-254.
- **Francki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.L. and Brown F.** (1991). Classification and nomenclature of viruses. *Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses*, 103-110.
- **Furlong D., Swift H. and Roizman B.** (1972). Arrangement of herpesvirus desoxyribonucleic acid in the core. *Journal of Virology*, **10** : 1071-1074.
- **Gagnaire B., Renault T., Bouilly K., Lapègue S. and Thomas-Guyon H.** (2003). Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Curr. Pharm. Des.*, **9** : 193-199.
- **Gagnaire B., Thomas-Guyon H. and Renault T.** (2004). Study of in vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, **16** : 501-512.
- **Galloway T.S. and Delpledge M.H.** (2001). Immunotoxicity in invertebrates : measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology*, **10** : 5-31.
- **Garrett R.H. and Grisham C.M.** (2000). Biochimie. *édition De Boeck Université, Bruxelles*, 2ème édition, pp. 1254.
- **Gourdon I., Guerin M.C. and Toreilles J.** (1998). Mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse aux stress chez les bivalves marins. *CR de l'Académie des Sciences de Paris*, **192** : 749-774.
- **GRAP** (2002). Réseau régional de suivi de la qualité des eaux vis à vis des produits phytosanitaires. *Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles Poitou-Charentes*, 73 pp.

- **Greene J.C., Whitworth A.J., Kuo I., Andrews L.A., Feany M.B. and Pallanck L.J.** (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** (7) : 4078-4083.
- **Hamann M.T., Otto C.S. and Scheuer P.J.** (1996). Kahalalides: bioactive peptides from a marine mollusk *Elysia rufescens* and its algal diet *Bryopsis* sp.. *J. Org. Chem.*, **61** : 6594-6600.
- **Héral M.** (1989). L'ostréiculture française traditionnelle. *Aquaculture*, Vol 1, Ed. G. Barnabé, Lavoisier, Paris : 346-397.
- **Hine P.M., Wesney B. and Hay B.E.** (1992). Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **12** (2) : 135-142.
- **Hine P.M., Wesney B. and Besant P.** (1998). Replication of a Herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. *Dis. Aquat. Org.*, **32** : 161-171.
- **Isaacson T., Soto A.M., Iwamuro S., Knoop F.C. and Conlon J.M.** (2002). Antimicrobial peptides with atypical structural features from the skin of the Japanese brown frog *Rana japonica*. *Peptides*, **23** : 419-425.
- **Ishikawa H., Ikeda M., Yanagimoto K., Alves C.A., Katou Y., Lavina-Caoili B.A. and Kobayashi M.** (2003). Induction of apoptosis in an insect cell line, IPLB-Ld652Y, infected with nucleopolyhedroviruses. *J. Gen. Virol.*, **84** : 705-714.
- **Kieff E. and Shenk T.** (1998). Modulation of Apoptosis by Herpes viruses. *Seminars in Virology*, **8** : 471-480.
- **Kobayashi J., Harbour G.C., Gilmore J. and Rinehart K.L. Jr.** (1984). *J. Am. Chem. Soc.*, **106** : 1526.
- **Lacoste A., Cuffe A. and Poulet S.A.** (2002). P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate beta-adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells. *Journal of Cell Science*, **115** : 761-768.
- **Le Deuff R.M.** (1995). Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux *Iridoviridae* et aux *Herpesviridae*. Thèse de Doctorat d'Etat de Sciences Biologiques et Médicales, Université de Bordeaux II, pp. 234.
- **Le Deuff R.M., Nicolas J.L., Renault T. and Cochenne N.** (1994). Experimental transmission of a Herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **14**(2) : 69-72.
- **Le Deuff R.M., Renault T. and Gérard A.** (1996). Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Disease of Aquatic Organisms*, **24** : 149-157.
- **Lee T.G. and Maruyama S.** (1998). Isolation of HIV-1 protease-inhibiting peptides from thermolysin hydrolysate of oyster proteins. *Biochemical and Biophysical research communications*, **253** : 604-608.
- **Lorteau C., Auffret M. and Le Bris H.** (1995). Le système d'immunité des Mollusques bivalves. I. Structure et fonctionnement, II. Effets modulateurs des facteurs environnementaux. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, **171** (6/7) : 415-429.
- **Luna-Gonzales A., Maeda-Martinez A.N., Vargas-Albores F., Ascencio-Valle F. and Robles-Mungaray M.** (2003). Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology*, **15** : 275-282.
- **Maier M.S., Roccatagliata A.J., Kuriss A., Chludil H., Seldes A.M., Pujol C.A. and Damonte E.B.** (2001). Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber *Straurocucumis liouvillei*. *J. Nat. Prod.*, **64** (6) : 732-736.
- **Matthews** (1982). Classification and nomenclature of viruses. The families and groups. *Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses Intervirology*, **17** (1-3) : 41-178.
- **Micic M., Bihari N., Labura Z., Muller W.E. and Batel R.** (2001). Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride. *Aquatic Toxicology*, **55** : 61-73.
- **Micic M., Bihari N., Jaksic Z., Muller W.E. and Batel R.** (2002). DNA damage and apoptosis in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.*, **53** (3) : 243-262.
- **Minson A.C., Davison A.J., Desrosier R.C., Fleckenstein B., McGeoch D.J., Pellett P.E., Roizman B. and Studdert M.J.** (2000). Herpesviridae : In *Virus Taxonomy, 7th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (edition M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner). *Academic Press*, 203-225.
- **Mitta G., Hubert F., Noël T. and Roch P.** (1999). Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.*, **265** : 71-78.
- **Mitta G., Vandembuckle F. and Roch P.** (2000). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters*, **486** (3) : 185-190.
- **Moraga D. and Tanguy A.** (2000). Genetic indicators of herbicide stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under experimental conditions. *Environ. Toxicol. Chem.*, **19** (3) : 706-711.
- **Nebeker A.V. and Schuytema G.S.** (1998). Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails. *Environmental Contamination and Toxicology*, **35** : 441-446.
- **Nicolas J.L., Comps M. and Cochenne N.** (1992). Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of European Associated Fish Pathologists*, **12** (1) : 11-13.

- **Olicard C., Renault T., Torhy C., Benmansour A. and Bourgougnon N.** (2005). Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Res.*, **66** (2-3) : 147-152.
- **Olivier L.M., Fisher W.S., Volety A.K. and Maleb Z.** (2003). Greater hemocyte bacterial activity in oysters (*Crassostrea virginica*) from a relatively contaminated site in Pensacola Bay, Florida. *Aquatic Toxicology*, **64** : 363-373.
- **Oubella R. and Auffret M.** (1995). Immunomodulation dans des populations de mollusques bivalves de la Rade de Brest. *Acte de Rencontre Scientifique Internationale (Programme Rade de Brest)*, **1** : 307-319.
- **Pipe R.K.** (1990). Hydrolytic enzymes associated with the granular hemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem J.*, **22** : 595-603.
- **Pipe R.K., Coles J.A., Carissan F.M.M. and Ramanathan K.** (1999). Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, **46** : 43-54.
- **Razvi E.S. and Welsh R.M.** (1995). Apoptosis in viral infections. *Advances in Virus Research*, **45** : 1-60.
- **Renault T.** (1998). Infections herpétiques chez les invertébrés : détection de virus de type herpes chez les mollusques bivalves marins. *Virologie*, **2** (5) : 401-403.
- **Renault T., Le Deuff R.M., Cochenec N. and Maffart P.** (1994). Herpesvirus associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France. Comparative study. *Revue Médicale Vétérinaire*, **175** (10) : 735-742.
- **Renault T., Le Deuff R.M., Cochenec N., Chollet B. and Maffart P.** (1995). Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of disease in axenic larvae. *Vet. Res.*, **26** : 539-543.
- **Renault T., Le Deuff R.M., Lipart C., Chollet B. et Haffner P.** (1997). Programme herpesvirus : Synthèse des travaux réalisés au laboratoire IFREMER de La Tremblade. Mars 1996/février 1997. Note IFREMER.
- **Renault T., Le Deuff R.M., Chollet B., Cochenec N. and Gérard A.** (2000). Concomitant herpes-like virus infections among hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Disease of Aquatic Organisms*, **42** : 173-183.
- **Renault T., Lipart C. and Arzul I.** (2001a). A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *Journal of Fish Diseases*, **24** : 369-376.
- **Renault T., Lipart C. and Arzul I.** (2001b). A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species : virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **45** : 1-7.
- **Rinehart K.L., Gloer J.B., Hughes R.G., Renis H.E. McGovren J.P., Surynenberg E.B., Stringfellow D.A., Kwentzel S.L. and Li L.H.** (1981). Didemnins : antiviral and antitumor despeptides from caribbean tunicate. *Science*, **212** (4497) : 933-935.
- **RNO** (2002). Surveillance du milieu marin, travaux du Réseau National d'Observation (RNO) – Edition 2002, *Ifremer et Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement*, 44 pp.
- **Roizman B. and Furlong D.** (1974). The replication of herpesvirus. In: *Comprehensive Virology*, vol 3 (edition H Fraenkel-Conrat and RR Wagner), 29-403. Plenum Press, New York.
- **Roizman B. and Batterson W.** (1985). Herpesvirus and their replication. In: *Virology (edition BN Fields and al.)*, 497-526. Raven Press, New York.
- **Roizman B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C. and Studdert M.J.** (1992). *Archives of Virology*, **123** (3-4) : 425-449.
- **Salzet M.** (2001). Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends in Immunology*, **22** (6) : 285-288.
- **Sami S., Faisal M. and Hugget R.J.** (1993). Effects of laboratory exposure to sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons on the hemocytes of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.*, **35** : 131-135.
- **Schlenck D., Martinez P.G. and Livingstone D.R.** (1991). Studies on myeloperoxidase activity in the commun mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, part C, **99** (1/2) : 63-68.
- **Smith V.J. and Söderhall K.** (1991). A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Developmental and Comparative Immunology*, **15** (4) : 251-261.
- **Söderhall K.** (1992). Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Bollettina di zoologica*, **59**, 141-151.
- **Sunila I. and LaBanca J.** (2003). Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the easter oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Org.*, **56** (2) : 163-170.
- **Tamamura H., Kuroda M., Masuda M., Otaka A., Funakoshi S., Nakashima H., Yamamoto N., Waki M., Matsumoto A., Lancelin J.M., Kohda D., Tate S., Inagaki F. and Fujii N.** (1993). A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T22 ([Try 5,12, Lys 7]-polyphemusin II), determined by nuclear magnetic resonance. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1163** : 209-216.

- **Tanguy A., Boutet I., Laroche J. and Moraga D.** (2005). Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS*, **272** : 390-403.
- **Terahara K., Takahashi K.G. and Mori K.** (2003). Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, **27** : 521-528.
- **Toreilles J., Guerin M.C. and Roch P.** (1997). Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, **21** (3) : 267-275.
- **Toreilles J., Guerin M.C. and Roch P.** (1999). Modified Alsever's solution is not a good medium for rective oxygen metabolite study in bivalves. *Fish and Shellfish Immunology*, **8** : 65-69.
- **Wiens M., Krasko A., Perovic S. and Muller W.E.** (2003). Caspase-mediated apoptosis in sponges : cloning and function of the phylogenetic oldest apoptotic proteases from Metazoa. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1593** : 179-189.
- **Wooton E.C., Dyrinda E.A., Pipe R.K. and Ratcliffe N.A.** (2003). Comparaison of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquatic Toxicology*, **65** : 13-25.
- **Xia G., Chen J., Tiwari V., Ju W., Li J.P., Malmström A., Shukla D. and Liu J.** (2002). Heparan sulfate 3-O-Sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for Herpes Simplex Virus, type 1. *The Journal of Biological Chemistry*, **277** : 37912-37919.
- **Xue Q.** (1998). Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes chez l'huître plate, *Ostrea edulis*. Thèse de 3^{ème} cycle, Université de Bretagne Occidentale (Brest). 323 pp.
- **Xue Q. and Renault T.** (2000). Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology*, **76** : 155-163.
- **Yasin B., Pang M., Turner J.S., Cho Y., Dinh N-N., Waring A.J., Lehrer R.I. and Wagar E.A.** (2000). Evaluation of the inactivation of infectious *Herpes simplex* virus by host-defense peptides. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **19** : 187-194.

VII. WEBLIOGRAPHIE

- http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp
- <http://extoxnet.orst.edu/pips/carbaryl.htm>
- <http://extoxnet.orst.edu/pips/diuron.htm>
- <http://extoxnet.orst.edu/pips/glyphosate.htm>

ANNEXE

ANNEXE 1

EXTRACTION DES ARN A PARTIR D'HEMOCYTES EN SUSPENSION

Protocole de Gibco BRL

- Culotter les hémocytes par centrifugation (10 minutes à 4°C à 1500g)
- Retirer le surnageant
- Reprendre le culot d'hémocytes avec 1,5 mL de Trizol
- Récupérer le lysat dans un tube stérile (eppendorf 2 mL stérile)
- Laisser incubé 5 minutes à température ambiante
- Ajouter un mélange chloroforme alcool isoamylique : 1/5 du volume de Trizol
- Vortexer 15 secondes puis laisser reposer 2-3 minutes à température ambiante
- Centrifuger 15 minutes à 4°C à 12000 g
- Récupérer le surnageant dans un tube stérile
- Ajouter de l'isopropanol froid (4°C) : 1/2 du volume de Trizol (précipitation des ARN)
- Incuber 10 minutes à température ambiante
- Centrifuger 10 minutes à 4°C à 12000 g
- Rejeter le surnageant, laver le culot avec 1 mL d'éthanol à 75%
- Centrifuger 5 minutes à 4°C à 7500 g
- Rejeter le surnageant
- Eliminer les dernières gouttes d'éthanol et sécher sous la hotte
- Incuber pendant 10 minutes à 55°C
- Remettre en suspension dans 22 µL d'H₂O DEPC
- Réaliser une dilution au 1/250 pour la lecture au spectrophotomètre.