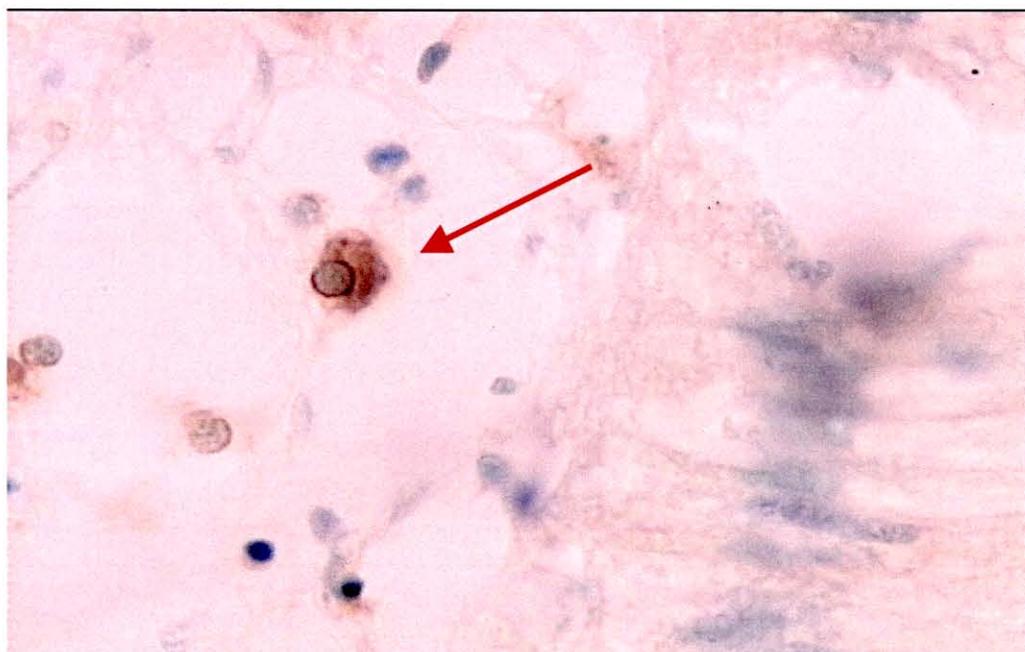


**Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006**  
**Convention 2002-RPC-A-180 "Pathologie"**  
**Programme 4 : Gestion des productions ostréicoles : les apports de la**  
**pathologie**

**Action 1 : Epidémiologie analytique et descriptive des agents pathogènes, étude de la diversité des virus de type herpes**  
**Action 2 : Etude des relations hôtes/agents pathogènes, pathogénèse des infections à virus de type herpesvirus**

**T. Renault, F. le Roux, F. Berthe, I. Arzul, L. Miossec,  
M. Robert & B. Chollet**



Marquage d'OsHV-1

**IFREMER**  
**Laboratoire de Génétique et Pathologie**

**Ronce-Les-Bains**  
**17390 La Tremblade**  
**Tél. 05 46 36 98 36**  
**Fax. 05 46 36 37 51**

*Photo en couverture* : marquage obtenu avec un anticorps monoclonal spécifique d'une glycoprotéine d'OsHV-1 dans le tissu conjonctif de la glande digestive d'une huître creuse, *Crassostrea gigas*. Les cellules marquées apparaissent colorées en marron (flèche).

## **Action 1 : Epidémiologie analytique et descriptive des agents pathogènes**

### **Projet 2 : Mortalité de l'huître creuse: étude de la diversité des virus de type herpès infectant les bivalves d'intérêt économique**

#### **A/ La coquille St-Jacques : un nouvel hôte pour l'herpèsvirus de l'huître, OsHV-1**

Nous disposons aujourd'hui d'outils diagnostiques sensibles et spécifiques (PCR, HIS...) et d'un protocole de transmission de l'infection qui permettent d'assurer un suivi des productions larvaires en éclosérie de bivalves pour les espèces considérées comme sensibles aux infections à herpèsvirus, mais également pour de nouvelles espèces. En effet, des mortalités massives (100 %) ont été rapportées dans une éclosérie de coquille St-Jacques en Bretagne et ont pu être associées à la détection de OsHV-1. Les résultats obtenus concernant cette espèce, *Pecten maximus*, complètent et reflètent l'ensemble des travaux réalisés.

La pectiniculture a été développée en Bretagne pour restocker les gisements naturels français. En effet, ces derniers présentent depuis les années 1980 une déplétion sérieuse suite à un effort de pêche trop important et à des conditions météorologiques défavorables au recrutement des juvéniles de *Pecten maximus*. L'élevage intensif des larves et post-larves favorise le développement de maladies telles que les infections à *Vibrios*. Jusqu'à présent aucune pathologie virale n'a été associée à des mortalités chez la coquille St-Jacques, *P. maximus*. Cependant, récemment des mortalités ont été rapportées dans une éclosérie bretonne affectant des larves âgées de 7 à 10 jours et atteignent 100 % 10 jours après la ponte.

Des essais de reproduction des mortalités ont été entrepris afin de déterminer l'étiologie de ces dernières. Trois élevages, en eau de mer filtrée à 0.22 µm additionnée en chloramphénicol, de larves de coquille St-Jacques âgées de 7 jours reçoivent, dans un cas, des suspensions filtrées à 0.22 µm de larves moribondes provenant de l'éclosérie, et, dans un autre cas, les mêmes suspensions de larves non filtrées. Des élevages témoins reçoivent une quantité équivalente d'eau de mer filtrée à 0.22 µm. La filtration de la suspension de larves a pour but d'éliminer les contaminants bactériens potentiellement présents. Cinq jours après inoculation de la suspension de larves moribondes, les élevages des essais 1 et 2 présentent 100 % de mortalités alors que les élevages témoins présentent 6 % de mortalités. Ces résultats laissent suspecter la présence d'un agent pathogène ultrafiltrable dans les larves moribondes.

Des analyses en microscopie électronique à transmission ont alors été réalisées sur les larves moribondes provenant de l'éclosérie ainsi que sur les larves des essais de reproduction des mortalités. Des particules virales de type herpès sont détectées dans le noyau et le cytoplasme de cellules du tissu conjonctif des larves moribondes provenant de l'éclosérie bretonne. Les cellules infectées présentent un noyau hypertrophié et une marginalisation de la chromatine. Des particules virales enveloppées sont également visibles en position extracellulaire. Ces observations permettent, non seulement, d'associer les mortalités larvaires rapportées dans l'éclosérie à la détection d'un virus de type herpès, mais également de démontrer le pouvoir pathogène de cet agent chez les larves de coquilles St-Jacques. En effet, les essais expérimentaux ont permis de reproduire les mortalités observées dans l'éclosérie et de détecter des particules virales en répllication chez des larves initialement saines.

➤ Un virus de type herpès est donc responsable des mortalités observées en éclosion, cependant, s'agit-il du virus OsHV-1 habituellement rencontré chez les bivalves ? Afin de répondre à cette question, des analyses en PCR ont été réalisées sur quatre lots de larves moribondes provenant de l'éclosion. Différents couples d'amorces ont été utilisés : le couple Gp3-Gp4 amplifiant un fragment d'un gène codant une glycoprotéine putative ; le couple B3-B4 amplifiant un fragment d'un gène codant un inhibiteur d'apoptose et le couple C2-C4 amplifiant un fragment de la région répétée inversée de part et d'autre du segment U<sub>L</sub> codant deux protéines de fonction inconnue. Les deux premiers couples d'amorces permettent d'obtenir des produits de PCR de taille attendue, identique à l'ADN de référence OsHV-1. En revanche, le couple C2-C4 permet d'obtenir pour ces quatre échantillons des produits de PCR environ 200 pb plus courts que l'ADN référence. Ces résultats montrent donc que le virus de type herpès détecté chez la coquille St-Jacques est identique à OsHV-1. Cependant, la région C du génome viral semble présenter un polymorphisme déjà décrit chez des larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas* et des larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* ayant présenté des mortalités concomitantes.

Afin de déterminer si le polymorphisme détecté au niveau de la région C est identique à celui précédemment décrit, des produits de PCR Gp3-Gp4 et C2-C4 ont été clonés et séquencés pour deux échantillons de larves moribondes. Les séquences des fragments Gp3-Gp4 des deux lots de larves sont identiques entre elles et présentent 99 % d'homologie avec l'ADN référence OsHV-1. Les différences nucléotidiques se traduisent par 7 substitutions en acides aminés, la séquence peptidique présentant alors 97 % d'identité avec celle d'OsHV-1. Les séquences des fragments C2-C4 des deux lots de larves sont également identiques entre elles et au variant OsHV-1 var. Les différences entre OsHV-1 et OsHV-1 var incluent des substitutions, insertions et délétions de nucléotides, mais surtout une délétion d'environ 200 pb et un insert de 27 pb.

Afin de compléter les données concernant la transmission interspécifique d'OsHV-1, nous avons procédé à des essais d'infection de larves axéniques d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, à partir d'une suspension virale provenant des larves moribondes de coquille St-Jacques. Ces essais ont été réalisés en appliquant le protocole présenté dans l'article 5. Les larves *C. gigas* ont été récoltées trois jours après inoculation de la suspension virale OsHV-1 var. Les analyses en PCR ont été réalisées avec le couple C2-C6 qui permet, de la même façon que C2-C4, de détecter OsHV-1 var. Les prélèvements réalisés sur les ballons témoins apparaissent tous négatifs alors que les prélèvements des deux premiers rinçages et les larves des ballons tests présentent des produits de PCR de taille identique à celle d'OsHV-1 var. Ces essais démontrent donc que le virus OsHV-1 var est capable, comme OsHV-1, d'infecter différentes espèces de bivalve. Enfin, dix géniteurs asymptomatiques appartenant au même lot que les parents des larves moribondes ont pu être obtenus et analysés en hybridation *in situ*. Sept individus (soit 70 %) présentent des réactions positives. En effet, un marquage violet est visible au niveau de cellules du tissu conjonctif des branchies, de la gonade, du manteau et du muscle adducteur, mais également au niveau de cellules endothéliales de sinus hémolymphatiques. Les cellules infectées présentent un marquage nucléaire et/ou cytoplasmique. Pour certains animaux, des réactions positives sont également détectées au niveau de l'épithélium des branchies. OsHV-1 semble donc pouvoir persister chez les coquilles St-Jacques adultes comme chez les huîtres creuses adultes sans induire de symptômes ou de mortalités.

Ces travaux mettent donc en évidence une nouvelle espèce hôte pour OsHV-1 ou plus exactement OsHV-1 var. Cet agent est bien responsable des mortalités larvaires de coquilles St-Jacques rapportées dans l'écloserie bretonne et peut être transmis expérimentalement à des larves axéniques d'huître creuse. Dans la mesure où une seule espèce est élevée dans l'écloserie, l'origine du virus reste inconnue. La détection d'OsHV-1 chez des géniteurs asymptomatiques de l'espèce *Pecten maximus* laisse penser que les adultes ont pu s'infecter au contact d'autres bivalves dans le milieu naturel, jouant alors un rôle de réservoir du virus avant de transmettre l'infection à leur descendance.

## **B/ Variations sur un même thème : OsHV-1**

Dans un premier temps, des essais d'amplification reposant sur l'utilisation d'amorces consensus de gènes codant l'ADN polymérase des herpesvirus ont été réalisés en l'absence de donnée concernant la séquence du génome viral. L'objectif de ces essais était de déterminer si un polymorphisme pouvait être détecté au niveau de ce gène.

Puis, la détection de OsHV-1 var dans une nouvelle espèce de bivalve, *Pecten maximus*, a motivé une étude plus approfondie de la région C du génome viral. Par ailleurs, des séquences cibles ont été sélectionnées parmi les gènes identifiés dans le génome viral afin d'estimer le degré de diversité du virus. Le choix de ces séquences a porté sur un gène Gp, codant une glycoprotéine membranaire putative, ainsi que sur un gène IA, codant un inhibiteur d'apoptose. En effet, comme nous l'avons mis en évidence en première partie II-B-1-a, les glycoprotéines membranaires, situées au niveau de l'enveloppe du virus jouent des rôles déterminants dans les interactions hôte-pathogène et sont directement soumises à la pression de sélection. Elles sont donc supposées présenter davantage de variations que des gènes codant des enzymes telles que l'ADN polymérase. Parmi les gènes exprimés pendant la latence de certains herpesvirus de vertébrés, quelques-uns codent des protéines inhibitrices de l'apoptose (LNA, EBNA...). Ces gènes sont le siège de polymorphisme, qui, dans certains cas, sont à la base de techniques de génotypage.

L'objectif de ce travail est donc, d'une part, de déterminer s'il est possible de mettre en évidence un polymorphisme au niveau des gènes IA et Gp, et, d'autre part, de déterminer si le polymorphisme détecté au niveau de la région C est présent dans un plus large échantillonnage. Par ailleurs, des analyses complémentaires ont été réalisées afin de caractériser la délétion détectée sur la région C.

### B. 1. - Gène codant l'ADN polymérase : une première approche

Avant même de disposer d'informations sur la séquence du génome OsHV-1, un essai de PCR nichée a été réalisé en utilisant des amorces consensus (DFA, ILK et KG1 pour la première réaction d'amplification ; TGV et IYG pour la deuxième réaction d'amplification) ayant pour cible des séquences codant des motifs d'acides aminés hautement conservés parmi les ADN polymérases d'herpesvirus. Cette méthode de PCR nichée a été mise au point afin de détecter et d'identifier partiellement des herpesvirus présents dans des échantillons de tissu ou des cultures de cellules, même lorsque la séquence totale du génome viral est inconnue. Cette méthode a été appliquée à 22 espèces d'herpesvirus dont huit humains et 14 animaux. Des produits de PCR ont pu être obtenus pour 21 virus sur les 22 testés. Le séquençage de ces produits a permis de déterminer partiellement des séquences codant l'ADN polymérase de 14 herpesvirus (2 humains, 12 animaux) pour lesquels aucune donnée de séquence de ce gène

n'était rapportée. De plus, ces séquences ont permis la construction d'un arbre phylogénétique des herpesvirus, mettant une nouvelle fois en évidence le regroupement de ces virus en trois sous-familles :  $\gamma$ -,  $\beta$ - et  $\alpha$ - *herpesvirinae*. Le seul herpesvirus n'ayant pas permis l'obtention de produits de PCR est l'herpesvirus du poisson chat (CCV) qui ne présente pas les motifs d'acides aminés hautement conservés dont les séquences ont été utilisées comme cibles des amorces consensus.

Des essais d'amplification d'ADN viral d'herpesvirus d'huître ont été réalisés selon cette méthode. Des ADN d'herpesvirus humains (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, HCMV, et HHV-6) et de poissons (OMV) ont été testés afin de constituer des contrôles. Des produits de PCR ont pu être obtenus pour tous les herpesvirus humains testés ainsi que pour l'herpesvirus de poissons. En revanche, aucun produit n'a été obtenu pour les quatre échantillons d'ADN d'herpesvirus d'huître analysés. L'absence de produit de PCR pour l'herpesvirus d'huître laisse penser que ce virus ne présente pas les domaines d'acides aminés hautement conservés parmi les ADN polymérases d'herpesvirus et conforte donc aujourd'hui la position éloignée de OsHV-1 par rapport aux autres herpesvirus connus. Des travaux de séquençage ultérieurs (AJ Davison, communication personnelle) ont permis d'identifier au sein du génome viral un gène codant une ADN polymérase. Cependant, celui-ci ne présente pas d'homologie avec les gènes codant les ADN polymérases des autres herpesvirus (AJ Davison, communication personnelle).

## B. 2. - Etude d'un gène codant un inhibiteur d'apoptose (IA)

L'étude du gène IA repose sur l'analyse de 34 échantillons en PCR et PCR-RFLP. Les 34 échantillons sont connus comme étant infectés par OsHV-1 et correspondent à des larves des espèces *Crassostrea gigas* pour 21 échantillons, *Ostrea edulis* pour 6 échantillons, *Ruditapes philippinarum* pour trois échantillons et *R. decussatus* pour 4 échantillons. Le gène IA compte 2 000 nucléotides et comporte deux régions : une région non codante de 604 pb et une région codante de 1 396 pb. Deux couples d'amorces ont été dessinés de façon à amplifier chacune de ces régions. Le couple IA1-IA2 amplifie l'ensemble de la région non codante et le couple IA3-IA6 amplifie un fragment de 424 pb de la région codante (Figure 1).

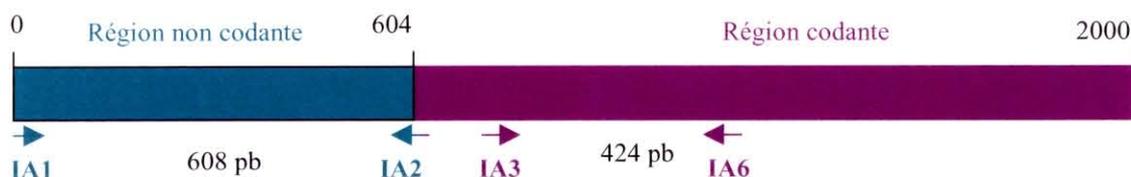
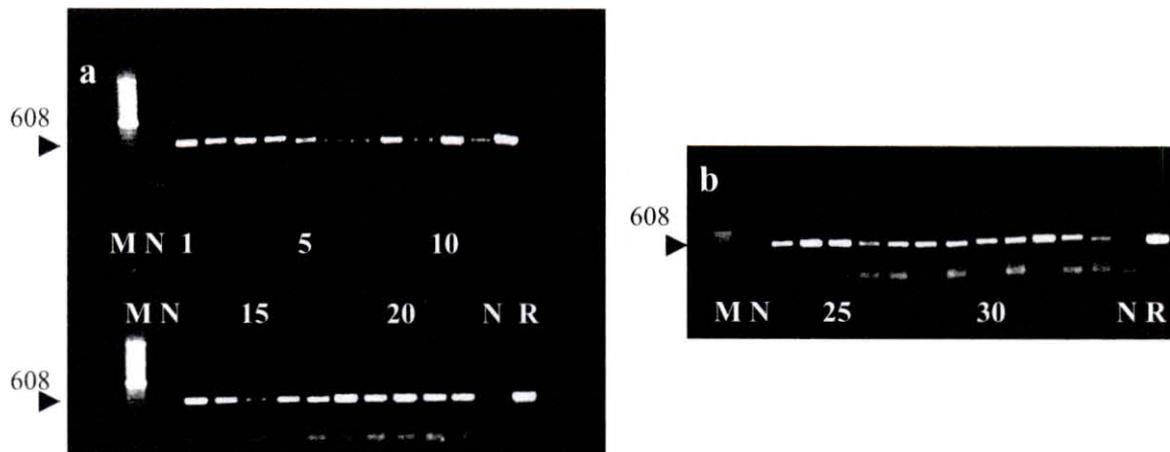


Figure 1 - Positions relatives des amorces utilisées pour l'étude du gène IA

Quel que soit le couple d'amorces utilisé, l'ensemble des échantillons présente des produits de PCR de taille identique à celle du fragment correspondant de OsHV-1 (Figures 2 a et b, Figures 3 a et b).



Figures 2 a et b - Résultats des analyses en PCR en utilisant le couple d'amorces IA1-IA2 pour 34 échantillons (a : échantillons 1 à 22 ; b : échantillons 23 à 34). M : marqueur de poids moléculaire 100 pb. N : témoins négatifs. R : ADN de référence. ▶ : taille des produits de PCR en pb

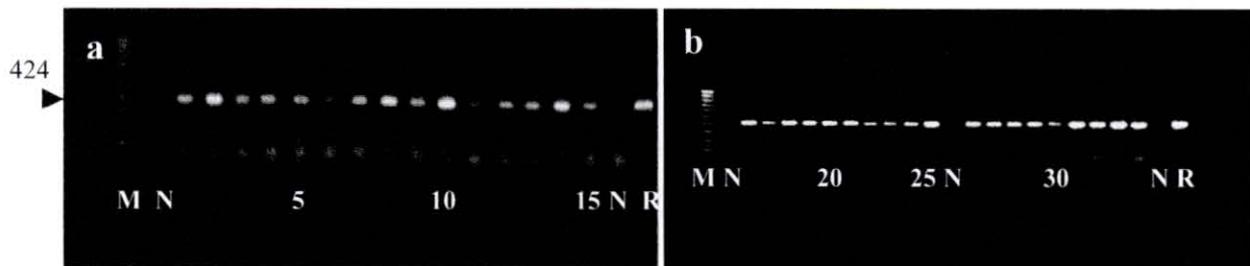


Figure 3 a et b - Résultats des analyses en PCR en utilisant le couple d'amorces IA3-IA6 pour 34 échantillons (a : échantillons 1 à 15 ; b : échantillons 16 à 34). M : marqueur de poids moléculaire 100 pb. N : témoins négatifs. R : ADN de référence. ▶ : taille des produits de PCR en pb

Aucune différence n'a donc pu être notée en PCR entre les 34 échantillons analysés. Des analyses complémentaires ont été réalisées en digérant les produits de PCR obtenus par des enzymes de restriction. Les produits IA1-IA2 ont été digérés par les enzymes *MspI* et *TaqI* et les produits IA3-IA6 ont été digérés par *TaqI* et *MvaI* (Figure 4).

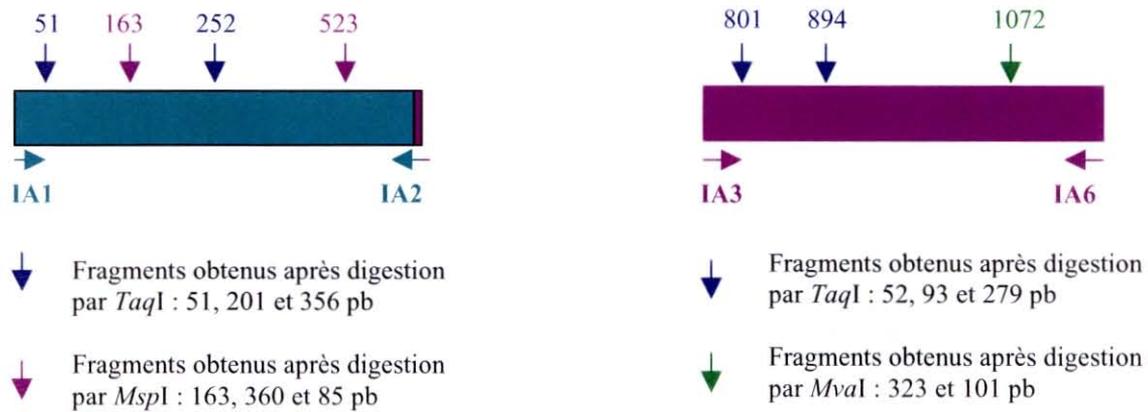
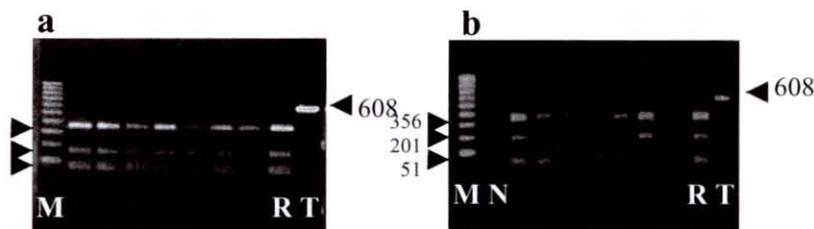
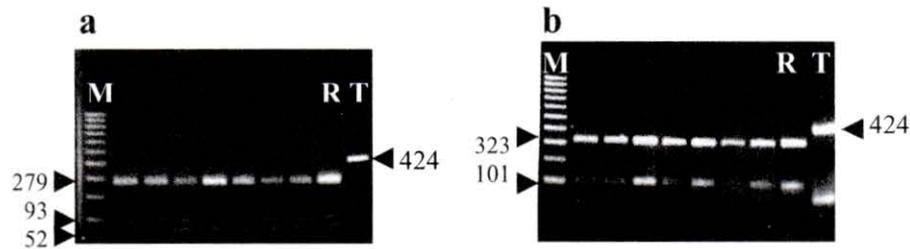


Figure 4 - Positions (en pb) des enzymes de restriction utilisées pour l'analyse du gène IA et profils de restriction correspondants

Les profils de restriction obtenus sont tous identiques à ceux de l'ADN référence quelle que soit l'enzyme utilisée (Figures 5 a et b, Figures 6 a et b). Il n'est donc pas possible de différencier les produits de PCR IA1-IA2 et IA3-IA6 par digestion. Cependant, comme nous l'avons mentionné, les enzymes permettent de détecter des mutations uniquement au niveau des sites de restriction ainsi que des délétions ou insertions de nucléotides à condition qu'elles soient importantes.



Figures 5 a et b - Profils de restriction obtenus après digestion des produits de PCR IA1-IA2 par *MspI* (a) et *TaqI* (b) pour sept échantillons. M : marqueur de poids moléculaire 100 pb. N : témoin négatifs. R : ADN de référence. T : produits de PCR avant digestion. ▶ : taille des fragments en pb. Les 34 échantillons présentent des profils identiques



Figures 6 a et b - Profils de restriction obtenus après digestion des produits de PCR IA3-IA6 par *TaqI* (a) et *MvaI* (b) pour sept échantillons. M : marqueur de poids moléculaire 100 pb. R : ADN de référence. T : produits de PCR avant digestion. ▶ : taille des fragments en pb. Les 34 échantillons présentent des profils identiques

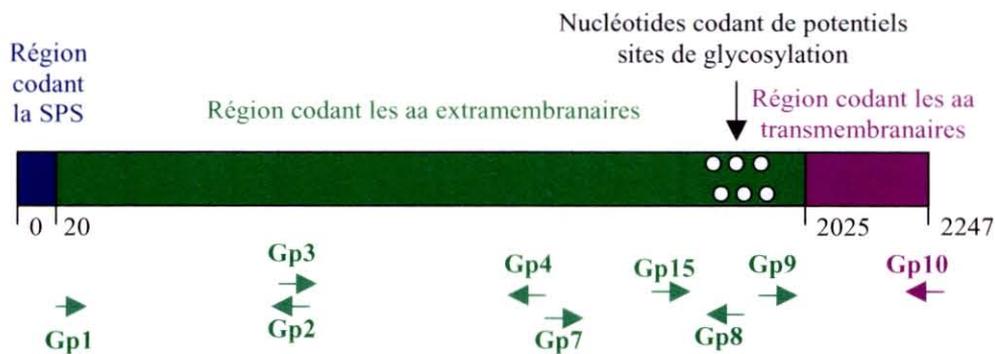
Ces analyses, bien que non exhaustives, suggèrent une certaine homogénéité et conservation du gène IA entre les différents échantillons analysés. Une étude préliminaire de séquençage des produits IA1-IA2 et IA3-IA6 obtenus pour deux échantillons a été réalisée afin d'orienter notre choix pour une étude plus large de séquençage. Des produits de PCR IA1-IA2 et IA3-IA6 ont été clonés et séquencés pour un échantillon P, de larves de palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* et un échantillon G de larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ayant présenté des mortalités concomitantes en juin 1997 dans une éclosion normande et connus comme étant infectés par le variant OsHV-1 var. Nous souhaitons ainsi obtenir des séquences pour des échantillons d'espèce différente, provenant d'une éclosion différente de notre référence, OsHV-1 (ADN de virus purifié à partir de larves *C. gigas* infectées provenant d'une éclosion vendéenne) et présentant déjà un polymorphisme sur le génome viral.

Les séquences IA1-IA2 des échantillons P et G sont identiques entre elles et présentent une addition de nucléotide par rapport à la séquence IA1-IA2 de OsHV-1. Cette région étant non codante, nous n'avons pas procédé à des comparaisons des séquences en acides aminés. Les séquences IA3-IA6 des échantillons P et G sont identiques entre elles à un nucléotide près et présentent deux substitutions de nucléotides par rapport à la séquence IA3-IA6 de OsHV-1, la séquence de l'échantillon P présentant une substitution supplémentaire. Les substitutions nucléotidiques se traduisent par deux substitutions en acides aminés. Une méthionine au niveau de la référence est substituée par une isoleucine dans G et P. Une lysine dans G et la référence est substituée par un acide glutamique dans P.

Nous n'avons pas retenu le gène IA pour une étude de séquençage plus large dans la mesure où les séquences des produits de PCR IA1-IA2 et IA3-IA6 obtenues pour les échantillons G et P présentent peu de variations par rapport à l'ADN de référence OsHV-1.

### B. 3. - Etude d'un gène codant une glycoprotéine putative (Gp)

Le gène Gp retenu comporte 2247 nucléotides et code une glycoprotéine putative de 748 acides aminés. L'analyse de la séquence peptidique (Psort II : <http://psort.nibb.ac.jp/cgi-bin/runpsort.pl>) met en évidence la présence d'une séquence peptide signal d'une vingtaine d'acides aminés hydrophobes en partie NH<sub>2</sub> terminale. Cette séquence guiderait la protéine vers la membrane cellulaire. Une fois la protéine intégrée dans la membrane plasmique, la séquence peptide signal est clivée. Par ailleurs, la protéine possède un domaine transmembranaire hydrophobe d'environ 16 acides aminés, une queue intracytoplasmique de 4 à 5 acides aminés et présente plusieurs sites potentiels de glycosylation. Il semblerait également que la protéine Gp soit liée à des résidus de glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) qui interviennent dans l'ancrage de la protéine au niveau de la membrane plasmique. Afin d'étudier le gène Gp, des couples d'amorces ont été dessinés de façon à couvrir l'ensemble du gène (Figure 7).



**Figure 7 - Positions relatives des amorces utilisées pour l'étude du gène Gp. SPS : séquence peptide signal. : sites potentiels de glycosylation. Gp1-Gp2 : 500 pb ; Gp3-Gp4 : 698 pb ; Gp7-Gp8 : 699 pb ; Gp9-Gp10 : 401 pb ; Gp15-10 : 878 pb**

Une étude préliminaire a consisté à analyser quatre échantillons différents en PCR en utilisant les couples Gp1-Gp2, Gp3-Gp4, Gp7-Gp8 et Gp9-Gp10. Les échantillons correspondent aux échantillons G et P présentés ci-dessus, mais également, à un échantillon de larves d'huître creuse (1), *Crassostrea gigas*, et à un échantillon de larves d'huître plate (2), *Ostrea edulis*. L'ensemble de ces échantillons provient de la même éclosionerie située en Normandie. Des produits de PCR de taille identique à celle de l'ADN référence sont obtenus pour les quatre échantillons avec les couples Gp1-Gp2, Gp3-Gp4 et Gp9-Gp10 (Figure 8). En revanche le couple Gp7-Gp8 permet d'obtenir des produits de PCR de deux tailles différentes, 300 pb et 700 pb, pour l'ADN référence (uniquement à la dilution 10 ng) et un échantillon (G) (Figure 8). L'échantillon 2 ne présente qu'une taille de produits de PCR et les échantillons 1 et P ne présentent aucun produit d'amplification (Figure 8).

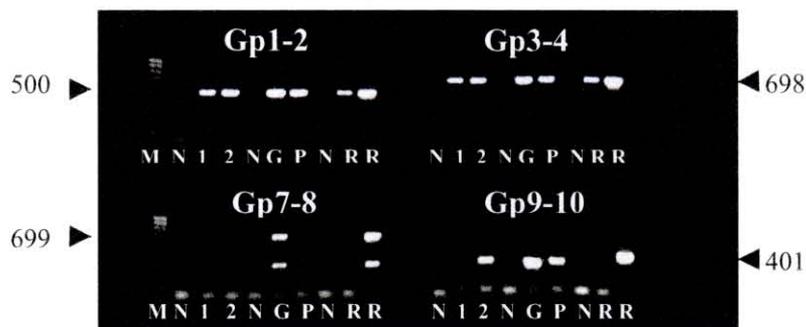


Figure 8 - Résultats des analyses en PCR en utilisant les couples d'amorces Gp1-2, Gp3-4, Gp7-8 et Gp9-10 pour quatre échantillons : 1 (*Crassostrea gigas*), 2 (*Ostrea edulis*), G (*C. gigas*) et P (*Ruditapes philippinarum*). M : marqueur de poids moléculaire 100 pb. N : témoins négatifs. R : ADN de référence (deux dilutions différentes : 0.5 pg et 10 ng). ▶ : taille des produits de PCR attendus en pb

Des travaux de séquençage ont été réalisés sur les produits de PCR Gp3-Gp4 des échantillons G et P. Le couple Gp15-Gp10 a été utilisé pour englober les fragments Gp7-Gp8 et Gp9-Gp10. Cependant, en raison de la difficulté à obtenir des produits de PCR en quantité suffisante avec le couple Gp15-Gp10, seule la séquence correspondant à l'échantillon P a pu être obtenue. Les séquences Gp3-Gp4 des échantillons G et P sont identiques entre elles et présentent cinq variations nucléotidiques qui se traduisent par cinq substitutions d'acides aminés par rapport aux séquences de référence. La séquence Gp15-Gp10 obtenue pour l'échantillon P présente trois substitutions de nucléotides qui se traduisent par trois substitutions en acides aminés. Au vu de ces premiers résultats, le fragment Gp3-Gp4 a été retenu pour une étude plus large de séquençage portant sur 16 échantillons. Ce choix est justifié, d'une part, en raison des difficultés à obtenir des produits de PCR pour ces échantillons avec les amorces Gp15-Gp10 et, d'autre part, du fait que le fragment Gp3-4, plus court, semble présenter davantage de variations.

Des séquences du fragment Gp3-Gp4 ont été obtenues pour 16 échantillons. Neuf des échantillons correspondent à des larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, provenant de Vendée (échantillons 1 et 2), de Charente Maritime (échantillons 3 et 4) et de Normandie (6, 7, 8, 9 et 11). Les autres échantillons correspondent à des larves d'huître plate, *Ostrea edulis*, (échantillons 5 et 10 provenant respectivement de Charente Maritime et de Normandie), à des larves de palourde européenne, *Ruditapes decussatus* (échantillons 13 et 14 provenant de Normandie), à des larves de palourde japonaise, *R. philippinarum* (échantillon 12 provenant de Normandie) et enfin à des larves de coquille St-Jacques, *Pecten maximus*, (échantillons 15 et 16 provenant de Bretagne). Un alignement multiple a pu être réalisé d'après l'algorithme de Higgins et Sharp (CLUSTAL, 1988) sur 16 séquences de 584 pb et 194 aa (Annexe 4, II-A). Des dendogrammes ont été construits à l'aide du logiciel DNasis V2.5 selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, Sneath et Sokal, 1973) et permettent de résumer les différences observées entre séquences nucléotidiques et peptidiques.

Dix nucléotides présentent des variations qui se traduisent par neuf substitutions d'acides aminés. On observe quatre groupes d'échantillons bien distincts, A, B, C et D. Le premier groupe (A) comporte trois échantillons (1, 2 et 3) ne présentant aucune variation par rapport à la séquence de référence. Le deuxième groupe (B) ne comporte qu'un échantillon (10) présentant trois substitutions d'acides aminés (une histidine au lieu d'une tyrosine ; une cystéine au lieu d'une tyrosine ; une valine au lieu d'une méthionine). Le troisième groupe (C) comporte cinq échantillons (4, 8, 9, 13 et 14) ne présentant qu'une seule substitution d'acide aminé (une lysine au lieu d'un acide glutamique). Enfin le dernier groupe (D) comporte sept échantillons (5, 6, 7, 11, 12, 15 et 16) présentant cinq substitutions d'acides aminés (une glycine au lieu d'une sérine ; une sérine au lieu d'une thréonine ; un groupe asparagine-arginine au lieu de lysine-acide glutamique ; et une leucine au lieu d'une proline). Le fragment Gp3-Gp4 ne présente donc pas de variations importantes ni en nucléotides, ni en acides aminés. De ce fait, les dendogrammes obtenus ne permettent pas d'apprécier la position phylogénique des isolats de virus entre eux, mais permettent seulement de les comparer. Le groupe A, présentant des séquences nucléotidiques et peptidiques identiques aux séquences de référence OsHV-1, est constitué de trois échantillons d'huître creuse, deux provenant de Vendée et un provenant de Charente-Maritime (Tableau I). Le groupe B, constitué d'un échantillon de larves de l'espèce *Ostrea edulis*, présente des substitutions d'acides aminés qui lui sont propres (Tableau I). Les groupes C et D rassemblent des échantillons de diverses espèces et de différentes origines géographiques (Tableau I). Les variations observées ne sont donc fonction ni de l'espèce hôte, ni de l'écloserie d'origine, ni de la date de prélèvement.

N°	Espèce	Écloserie	Groupe	Substitutions en aa
1	<i>C. gigas</i>	F2	A	
2	<i>C. gigas</i>	F2	A	
3	<i>C. gigas</i>	F3	A	
4	<i>C. gigas</i>	F3	C	Lys/Glu
5	<i>O. edulis</i>	F3	D	Gly/Ser ; Ser/Thr ; Asn/Lys ; Arg/Gln ; Leu/Pro
6	<i>C. gigas</i>	F1	D	Gly/Ser ; Ser/Thr ; Asn/Lys ; Arg/Gln ; Leu/Pro
7	<i>C. gigas</i>	F1	D	Gly/Ser ; Ser/Thr ; Asn/Lys ; Arg/Gln ; Leu/Pro
8	<i>C. gigas</i>	F1	C	Lys/Glu
9	<i>C. gigas</i>	F1	C	Lys/Glu
10	<i>O. edulis</i>	F1	B	His/Tyr ; Cys/Tyr ; Val/Met
11	<i>C. gigas</i>	F1	D	Gly/Ser ; Ser/Thr ; Asn/Lys ; Arg/Gln ; Leu/Pro
12	<i>R. philippinarum</i>	F1	D	Gly/Ser ; Ser/Thr ; Asn/Lys ; Arg/Gln ; Leu/Pro
13	<i>R. decussatus</i>	F1	C	Lys/Glu
14	<i>R. decussatus</i>	F1	C	Lys/Glu
15	<i>P. maximus</i>	F4	D	Gly/Ser ; Ser/Thr ; Asn/Lys ; Arg/Gln ; Leu/Pro
16	<i>P. maximus</i>	F4	D	Gly/Ser ; Ser/Thr ; Asn/Lys ; Arg/Gln ; Leu/Pro

**Tableau I - Analyse des séquences peptidiques du fragment Gp3-Gp4 pour 16 échantillons. F1 : écloserie normande ; F2 : écloserie vendéenne ; F3 : écloserie charentaise ; F4 : écloserie bretonne**

### C/ Etude de la région répétée aux extrémités du segment unique long (C)

La région C est répétée et inversée de part et d'autre du segment unique long ( $U_L$ ). Elle comporte 7000 nucléotides codant deux protéines de fonction inconnue. Un polymorphisme a déjà été décrit au niveau de cette région pour des échantillons de larves d'huître creuse, de palourde japonaise et de coquille St-Jacques. La détection du variant OsHV-1 var, caractérisé par une délétion au niveau de la région C, a motivé une étude de séquençage du fragment C2-C4 sur un nombre d'échantillons plus important. D'autre part, des travaux ont été réalisés afin de caractériser au mieux ce polymorphisme.

Cette étude a été réalisée sur les 16 échantillons ayant servi de support à l'étude du gène Gp. Parmi ces 16 échantillons, nous disposons déjà des séquences des fragments C2-C4 pour quatre échantillons (11, 12, 15 et 16). Les 12 autres échantillons ont été analysés en PCR en utilisant le couple d'amorces C2-C4. Neuf échantillons présentent des produits d'amplification de taille identique à la référence OsHV-1 tandis que trois échantillons (5, 6 et 7) présentent des produits de PCR environ 200 pb plus courts que la référence OsHV-1 et de taille identique aux produits de échantillons, 11, 12, 15 et 16 (Figure 9).

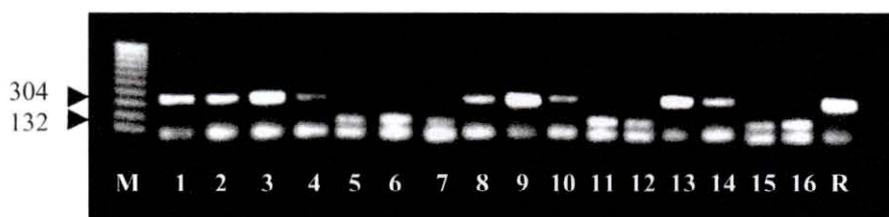


Figure 9 - Résultats des analyses en PCR en utilisant le couple d'amorces C2-C4 pour 16 échantillons (pour séquençage). M : marqueur de poids moléculaire 100 pb. R : ADN de référence.  $\blacktriangleright$  : taille des produits de PCR en pb

Les séquences des produits de PCR C2-C4 de la même taille que OsHV-1 sont toutes identiques entre elles et à la référence (Annexe 4, II-B). En revanche, les séquences des produits de taille inférieure à OsHV-1 (échantillons 5, 6, et 7) apparaissent identiques entre elles et identiques aux séquences C2-C4 des échantillons 11, 12, 15 et 16 à un nucléotide près (Annexe 4, II-B). En effet, les séquences des échantillons 11 et 12 présentent un nucléotide supplémentaire. De la même façon que pour le fragment Gp3-4, un alignement multiple a pu être réalisé d'après l'algorithme de Higgins et Sharp (CLUSTAL) sur 16 séquences de 304, 132 ou 133 pb (Annexe 4, II-B). Un dendrogramme a été construit selon la méthode UPGMA (Sneath et Sokai, 1973) et permet de résumer les différences observées entre les séquences nucléotidiques. Cependant, ce dendrogramme ne permet en aucun cas d'apprécier la position phylogénétique des groupes de séquences obtenus. On observe donc deux groupes d'échantillons : un premier groupe présentant des séquences C2-C4 de 304 pb identiques entre elles et à OsHV-1 ; un deuxième groupe présentant des séquences C2-C4 de 132 ou 133 pb identiques entre elles et à OsHV-1 var à une insertion de nucléotide près. On peut constater que le deuxième groupe présenté dans cette partie rassemble les mêmes échantillons que le groupe D de l'étude du gène Gp. Les variations observées ne semblent à nouveau fonction ni de l'espèce hôte, ni de l'écloserie d'origine, ni de la date de prélèvement.



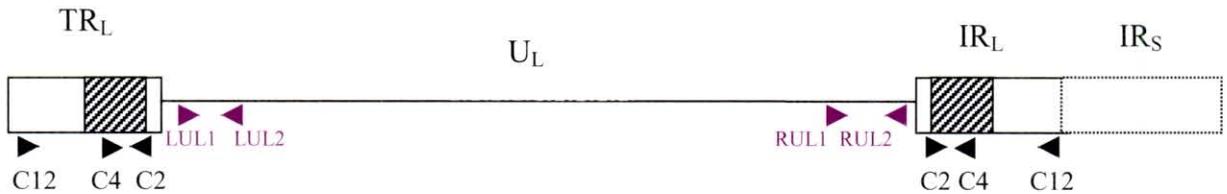


Figure 12 - Positions relatives des amorces dessinées aux extrémités de  $U_L$  et représentation hypothétique des régions  $TR_L$  et  $IR_L$  du variant OsHV-1 var. : délétion de 2.8 kpb

Les échantillons 11, 12, 15 et 16 ont permis d'obtenir des produits de PCR d'environ 200 pb, taille identique au fragment correspondant de OsHV-1, avec les deux couples d'amorces LUL1-LUL2 et RUL1-RUL2 (Figure 13). Ces résultats laissent penser que OsHV-1 var ne présente pas de variation aux extrémités du segment unique long, notamment au niveau des sites d'hybridation des amorces LUL1, LUL2, RUL1 et RUL2.

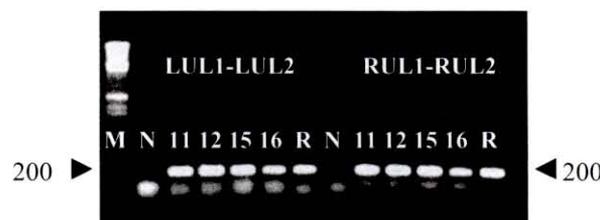


Figure 13 - Résultats des analyses en PCR en utilisant les couples d'amorces LUL1-LUL2 et RUL1-RUL2 pour les échantillons 11 (*Crassostrea gigas*, F1), 12 (*Ruditapes philippinarum*, F1), 15 et 16 (*Pecten maximus*, F4). M : marqueur de poids moléculaire M2. N : témoins négatifs. R : ADN de référence. : taille des produits de PCR attendus en pb

Les mêmes échantillons ont été analysés en combinant les amorces C4-LUL2 et C4-RUL1. Le couple C4-LUL2 permet d'obtenir des produits de PCR de 280 pb environ pour les échantillons 15 et 16, aucun produit d'amplification pour les échantillons 11 et 12 et des produits de trois tailles différentes (250, 300 et un fragment beaucoup plus lourd) pour l'ADN de référence OsHV-1 (Figure 52). Le couple d'amorces C4-RUL1 permet d'obtenir un produit d'amplification d'environ 400 pb pour les échantillons 11 (de faible intensité), 15 et 16 (Figure 52). Aucun produit d'amplification n'est obtenu avec ce couple d'amorces pour l'échantillon 12 et pour l'ADN de référence.

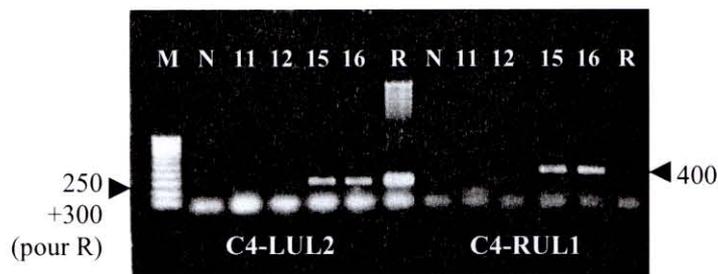


Figure 14- Résultats des analyses en PCR en utilisant les couples d'amorces C4-LUL2 et C4-RUL1 pour les échantillons 11 (*Crassostrea gigas*, F1), 12 (*Ruditapes philippinarum*, F1), 15 et 16 (*Pecten maximus*, F4). M : marqueur de poids moléculaire 100 pb. N : témoins négatifs. R : ADN de référence. ▶ : taille des produits de PCR obtenus en pb

La difficulté observée pour amplifier des produits de PCR à partir de l'échantillon 12 résulte probablement du fait que cet échantillon ait souffert des congélations et décongélations répétées, contribuant à la dégradation de l'ADN présent. Par ailleurs, l'absence de produit d'amplification de taille attendue pour l'ADN de référence peut s'expliquer par la taille trop importante (environ 4000 pb) des fragments cibles C4-LUL2 et C4-RUL1.

Les différents produits de PCR obtenus pour l'échantillon 16 et l'ADN de référence ont été séquencés. Les séquences du produit C4-LUL2 obtenu pour l'échantillon 16 et du plus petit produit obtenu pour l'ADN de référence sont identiques et présentent une taille de 286 pb. L'analyse de ces séquences met en évidence que ces fragments sont les produits d'un accrochage non spécifique des amorces LUL2 et C4 au niveau d'une autre région du génome (ORF73). La séquence du produit de PCR d'environ 300 pb obtenu pour l'ADN de référence met en évidence qu'il s'agit du produit d'un accrochage correct de l'amorce C4 et d'un accrochage non spécifique de LUL2. Le produit d'amplification plus lourd obtenu pour l'ADN de référence n'a pas été analysé. Enfin, la séquence du produit C4-RUL1 de l'échantillon 16 comporte 420 pb et est le résultat de l'accrochage spécifique de RUL1 et de l'accrochage non spécifique de C4. La comparaison de cette séquence avec la séquence de référence OsHV-1 met en évidence un décrochage de l'alignement, exactement au niveau de la jonction  $U_L/IR_L$ .

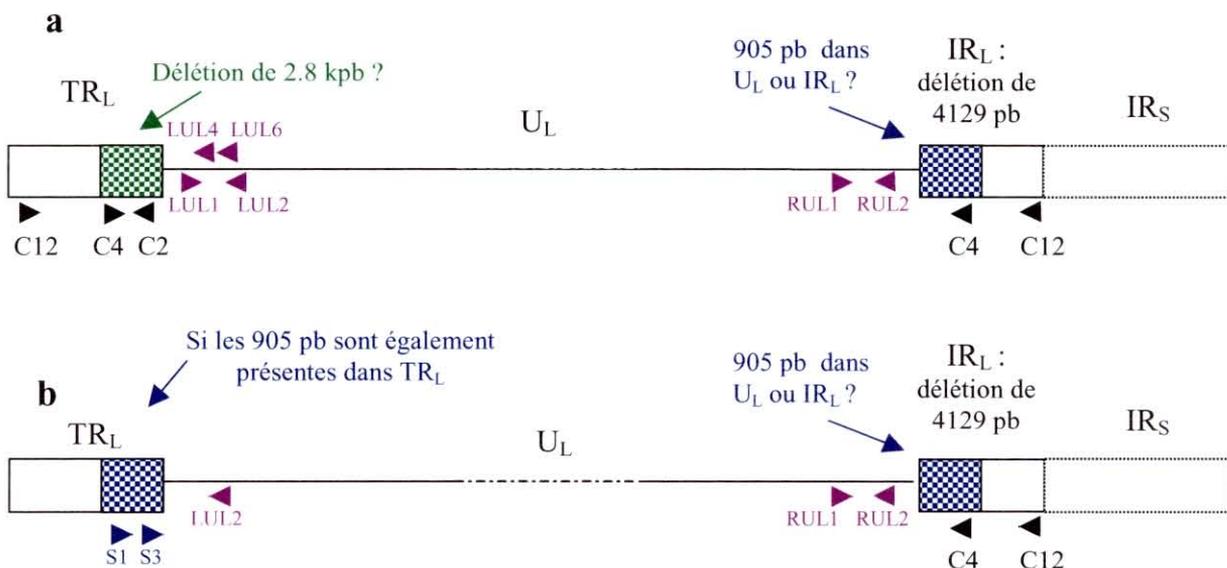
Ces résultats ne permettent donc pas de caractériser la délétion présente au niveau de la région C du variant OsHV-1 var. Cependant, l'analyse des séquences obtenues permet de conclure que les sites d'hybridation de LUL2 et RUL1 sont présents dans OsHV-1 var. De plus, les sites d'hybridation de LUL2 et C4 ne sont pas proches dans la mesure où aucun produit attendu n'a pu être obtenu. Pour la même raison, les sites d'hybridation de RUL1 et C4 doivent être éloignés. Le produit artificiel RUL1-C4 obtenu pour les échantillons 15 et 16 laisse penser que la région située entre ces amorces est probablement occupée par une large séquence non présente dans OsHV-1.

Des essais d'amplification ont alors été entrepris pour les échantillons 15 et 16 en utilisant les couples d'amorces C12-LUL2 et C12-RUL1. Si le premier couple ne permet pas d'obtenir de produit d'amplification, ni pour les échantillons 15 et 16, ni pour l'ADN de référence, le couple C12-RUL1 permet d'amplifier des produits d'environ 2000 pb pour les échantillons 15 et 16 (Figure 15).



De plus, il s'avère que la séquence C12-RUL1 ne présente pas le site d'hybridation de l'amorce C2, ni l'insertion de 27 pb détectée au niveau du fragment C2-C4 (présentée dans l'article 4). Cette dernière observation suggère donc que la région  $TR_L$  soit différente de la région  $IR_L$  dans le variant OsHV-1 var (Figure 17). En effet, la séquence C2-C4 de 132 ou 133 pb obtenue pour l'ensemble des échantillons, 5, 6, 7, 11, 12, 15 et 16 serait située au niveau de  $TR_L$  tandis que  $IR_L$  présente une délétion de 4129 pb remplacée par 905 pb. Cependant, la position des 905 pb reste incertaine : cette séquence est-elle située dans le fragment unique long ou dans  $IR_L$  ? De plus l'hypothèse de la délétion d'environ 2.8 kpb au niveau de  $TR_L$  reste à éclaircir.

Des amorces (LUL4 et LUL6) ont été dessinées à l'intérieur du fragment LUL1-LUL2 de façon à les combiner avec C4 (Figure 17 a). Aucun produit d'amplification n'a pu être obtenu pour les échantillons 5, 6, 7, 11, 12, 15 et 16, ce qui confirme les résultats précédents : le site d'hybridation de C4 est éloigné de celui de LUL2 et des amorces voisines. Ces observations laissent penser que s'il existe une délétion importante dans le génome OsHV-1 var, celle-ci est compensée par une insertion. D'autre part, des amorces (S1 et S3) ont été dessinées à l'intérieur des 905 pb mises en évidence dans le fragment C12-RUL1. S1 et S3 ont été combinées avec LUL2 de façon à vérifier si la séquence des 905 pb est répétée au niveau de  $TR_L$  (Figure 17 b).



Figures 17 a et b - Représentations hypothétiques des régions  $TR_L$  et  $IR_L$  du variant OsHV-1 var. a : dans l'hypothèse où  $TR_L$  et  $IR_L$  sont différents. b : dans l'hypothèse où  $TR_L$  et  $IR_L$  sont identiques. Positions relatives des amorces dessinées à l'intérieur du fragment LUL1-LUL2 (Figure 55 a) et à l'intérieur des 905 pb identifiées à l'extrémité droite du segment  $U_L$  (Figure 55 b)

Les échantillons 5, 6, 7, 11, 12, 15 et 16 ont été analysés en PCR avec les couples S1-LUL2 et S3-LUL2. Des produits d'amplification d'environ 200 pb ont été obtenus avec S1-LUL2 pour les échantillons, mais pas pour l'ADN de référence OsHV-1 (Figure 18). Le couple S3-LUL2 ne permet pas d'obtenir de produit d'amplification.



**Figure 18 - Résultats des analyses en PCR en utilisant le couple d'amorces S1-LUL2 pour les échantillons présentant des produits de PCR C2-C4 plus courts (5, 6, 7, 11, 12, 15 et 16). M : marqueur de poids moléculaire 100 pb. N : témoin négatif. R : ADN de référence. ? : taille des produits de PCR obtenus en pb**

Si les 905 pb sont bien présentes dans  $TR_L$ , les produits d'amplification S1-LUL2 attendus devraient présenter une taille de 725 pb. Il semble donc que les produits obtenus pour les échantillons 5, 6, 7, 11, 12, 15 et 16 résultent de l'accrochage non spécifique d'au moins une des deux amorces, S1 ou LUL2. Les résultats de la combinaison des amorces S1 et S3 avec l'amorce LUL2 suggèrent que les 905pb ne sont pas présentes dans  $TR_L$ .

L'ensemble de ces travaux (Tableau II) met en évidence que le variant OsHV-1 var présente des régions répétées  $TR_L$  et  $IR_L$  différentes entre elles et différentes des régions correspondantes du virus OsHV-1. La région  $IR_L$  du variant a pu être caractérisée. Celle-ci présente une délétion de 4129 pb remplacée par une séquence de 905 pb. De plus, cette séquence de 905 pb code deux nouveaux ORFs X et Y, laissant donc supposer que le variant présente des propriétés différentes de OsHV-1. Concernant la région  $TR_L$ , il a été possible de montrer qu'elle présente, elle aussi, une délétion, d'au moins de 2.8 kpb, et une insertion, probablement large.

### Conclusions préliminaires

Les infections à herpèsvirus chez les bivalves marins semblent être dues à un seul et même virus : OsHV-1. En effet, les études réalisées sur les gènes IA et Gp ne mettent pas en évidence des variations importantes au niveau des séquences analysées. En revanche, un variant OsHV-1 var, déterminé sur la base de la séquence C2-C4, est détecté dans différents échantillons de différentes espèces de bivalves provenant de différentes éclosions. Cependant, OsHV-1 var est proche de OsHV-1. Ils diffèrent principalement par un important événement d'insertion/délétion (perte de 4129 pb, 905 pb insérées) dans la région  $U_L$ - $IR_L$  et probablement au niveau de la région  $TR_L$ - $IR_L$ . Les données disponibles indiquent que le variant possède une séquence codante supplémentaire à l'extrémité droite de  $U_L$  ainsi que des régions  $TR_L$  et  $IR_L$  plus courtes que celles de OsHV-1. Par ailleurs, OsHV-1 var et OsHV-1 présentent environ 1 % de variation en nucléotides, suggérant qu'il existe une divergence en plus de l'événement d'insertion/délétion. Ces résultats laissent penser que OsHV-1 var et OsHV-1 ont évolué à partir d'un même ancêtre. L'époque à laquelle ils auraient divergé est inconnue. Les différences observées paraissent trop importantes pour s'être produites récemment. Dans le cas des herpèsvirus humains, une divergence de 1 % en séquence nucléotidique semble indiquer une séparation de l'ordre de 100 000 années.

L'évolution des herpesvirus de bivalves, notamment l'apparition de variants, remonte probablement à des époques où l'homme n'avait pas encore commencé l'aquaculture, influencée alors par des changements environnementaux tels que les périodes glacières. Cependant, l'activité humaine a du influencer et doit encore influencer l'évolution des herpesvirus de bivalve en sélectionnant des variants virulents ou en favorisant leur capacité à se répliquer chez différents hôtes.

De plus, OsHV-1 possède plusieurs gènes qui apparaissent fragmentés et ainsi non-fonctionnels. Cette situation rappelle celle de certains orthopoxvirus, tels que les smallpoxvirus. En effet, ceux-ci présentent des séquences nucléotidiques très proches mais diffèrent par une fragmentation de gènes, pouvant éventuellement conduire à des délétions de ces gènes. Il semble que cette évolution se soit accompagnée par un franchissement des barrières d'espèces depuis les rongeurs jusqu'à l'homme et d'autres mammifères. Les herpesvirus de bivalves pourraient avoir évolué de la même manière que les orthopoxvirus. Même si ce parallèle n'est que pure spéculation, un certain nombre de questions reste en suspens : L'ancêtre génétiquement intact de OsHV-1 (et OsHV-1 var) existe-il encore aujourd'hui ? Quel est l'hôte naturel initial de OsHV-1 ? Les outils développés et les connaissances acquises aujourd'hui sont autant d'atouts pour tenter de trouver des réponses à ces questions. Il serait notamment intéressant de définir la situation de la région TR<sub>L</sub>-U<sub>L</sub> dans OsHV-1 var et de déterminer les gènes de OsHV-1 var qui apparaissent fragmentés dans OsHV-1.

Couple d'amorces	Résultat de PCR (OsHV-1 var)	Produits attendus (en pb)	Résultat du séquençage (OsHV-1 var)	Interprétation des résultats de PCR et/ou de séquençage pour OsHV-1 var
C1-C6	-	896		Un ou deux site(s) d'hybridation des amorces absent(s)
C1-C4	-	539		Un ou deux site(s) d'hybridation des amorces absent(s)
C2-C6	<	710	Délétion de ? 200 pb + insertion de 27 pb	Site d'hybridation de C1 absent et délétion au niveau de la région C
C2-C4	<	353	Délétion de ? 200 pb + insertion de 27 pb	Site d'hybridation de C1 absent et délétion de la région C
C9-C10	-	197		Délétion au niveau de la région C au minimum de ? 1800 pb
C7-C8	-	191		Délétion au niveau de la région C au minimum de ? 2800 pb
C11-C12	+	500		Sites d'hybridation de C12 et C11 présents : région C intacte en amont de C6
LUL1-LUL2	+	200		Sites d'hybridation de LUL1 et LUL2 présents
RUL1-RUL2	+	200		Sites d'hybridation de RUL1 et RUL2 présents
C4-LUL2	<	3214	Hybridation non spécifique des amorces sur ORF 73	Sites d'hybridation de C4 et LUL2 probablement très éloignés
C4-RUL1	<	3214	Hybridation non spécifique de C4. 200 pb homologues à U <sub>L</sub> de OsHV-1 et insertion de 200 pb	Sites d'hybridation de C4 et LUL2 probablement éloignés par une large séquence propre au virus variant qui débute dès la jonction U <sub>L</sub> - IR <sub>L</sub>
C12-LUL2	-	5365		Sites d'hybridation de C12 et LUL2 probablement très éloignés
C12-RUL1	<	5365	Délétion de 4129 pb. Le site d'hybridation de C2 est absent	Dans le virus variant, TR <sub>L</sub> doit être remplacée par 905 pb. Le différent de IR <sub>L</sub> . IR <sub>L</sub> du variant est 4129 pb plus court que dans OsHV-1. Insertion de 905 pb présentes dans U <sub>L</sub> ou IR <sub>L</sub>
C4-LUL4	-	3112		Sites d'hybridation de C4 et LUL4 probablement très éloignés
C4-LUL6	-	3084		Sites d'hybridation de C4 et LUL6 probablement très éloignés
S1-LUL2	<	725		Hybridation non spécifique de l'une ou des deux amorces
S3-LUL2	-	518		Absence du site d'hybridation de S3, les 905 pb ne sont pas présentes dans TR <sub>L</sub> .

**Tableau II - Récapitulatif des analyses réalisées au niveau de la région C du variant OsHV-1 var. + : obtention de produits de PCR de taille attendue. - : absence de produit de PCR. < : Obtention de produits de PCR plus courts que ceux attendus**

## Action 2 : Etude des relations hôtes/agents pathogènes

### Projet 1 : Mortalité de l'huître creuse : étude de la pathogenèse des infections à virus de type herpesvirus

#### A/ Recherche d'une activité antivirale dans l'hémolymphe chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (collaboration avec l'Université de Vannes et l'Université de La Rochelle)

L'activité antivirale de l'hémolymphe fraîchement ponctionnée a été évaluée sur une suspension de 350 000 cellules Vero/ml avec une MOI de 0.001 ID<sub>50</sub>/cellules et un titre viral de  $2 \times 10^{5.9}$  ID<sub>50</sub>/ml. La lecture du test se fait après 48 heures d'incubation. Une estimation d'un effet dose réponse a été effectuée sur une moyenne de trois lots d'hémolymphe (Hm1, Hm2 et Hm3) d'une vingtaine d'individus chacun (Tableau III).

Hémolymphe (μl)	% Destruction	% Protection	EC <sub>50</sub> Zovirax (μg/ml)
100	81	96	0.26
50	40	100	0.26
35	32	25	0.26
20	30	6	0.26

Tableau III - Activité antivirale dans l'hémolymphe

Il semble que 50μl d'hémolymphe offrent une protection maximale aux cellules Vero vis à vis de HSV-1, puis ce pourcentage de protection diminue nettement lorsque la quantité d'hémolymphe est moins importante. Cependant le pourcentage de destruction reste relativement constant quelque soit le volume d'hémolymphe utilisé. On remarque qu'en présence de 100μl d'hémolymphe, le pourcentage de protection est maximal ainsi que le pourcentage de destruction. Au delà de 50 μl d'hémolymphe par puits de culture, l'osmolarité dans le puits doit être incompatible avec la physiologie des cellules Vero. Cela est donc associé à un fort pourcentage de toxicité. L'activité antivirale de 50μl d'hémolymphe a été confirmée pour les trois lots d'hémolymphe testés (Hm1, Hm2 et Hm3). On observe une reproductibilité du test (Tableau IV). Un dosage de protéines selon la méthode de Lowry indique une moyenne de 2134 μg de protéines par ml d'hémolymphe.

Hémolymphe (μl)	%Destruction	%Protection	EC <sub>50</sub> Zovirax
Hm 1	12	100	0.04
Hm 2	29	100	0.47
Hm 3	45	92	0.17

Tableau IV - Activité antivirale de 50μl d'hémolymphe

Une suspension cellulaire (350 000 cellules Vero/ml) est infectée aux deux MOI (0.01 et 0.001 ID<sub>50</sub>/cellules). Cette suspension cellulaire est mise en contact 24 heures avec les

drogues avant l'infection. Le tableau V représente la moyenne des résultats du test pour trois lots d'une vingtaine d'individu chacun.

Hémolymphe (50µl)	MOI 0.01 ID <sub>50</sub> /cellules			MOI 0.001 ID <sub>50</sub> /cellules		
	% D	% P	EC <sub>50</sub> Zov	% D	% P	EC <sub>50</sub> Zov
Hm moy	4	55	0.28	8.8	87	0.30

**Tableau V - Effet avant infection**

Pour une MOI de 0.001 ID<sub>50</sub>/cellules, le pourcentage de protection des cellules vis à vis de HSV-1 est de 87% avec un faible pourcentage de destruction cellulaire (8.8%). D'après ces résultats, il est possible de suspecter un effet protecteur de l'hémolymphe sur les cellules elles mêmes et non pas un effet contre le virus directement.

La suspension cellulaire (350 000 cellules Vero/ml) est infectée simultanément aux deux MOI (0.01 et 0.001 ID<sub>50</sub>/cellules). Puis les drogues sont ajoutées à différents temps (T0, T1, T2, T3 et T4). Ce test est effectué sur trois lots d'une vingtaine d'individus chacun et est arrêté après 48 heures d'infection. Le tableau VI représente la moyenne des résultats obtenus pour les lots. Seule la MOI de 0.001 ID<sub>50</sub>/cellules est représentée dans le tableau.

Temps d'addition Hm 50µl	MOI 0.01 ID <sub>50</sub> /cellules			MOI 0.001 ID <sub>50</sub> /cellules		
	% D	% P	EC <sub>50</sub> Zov(µg/ml)	% D	% P	EC <sub>50</sub> Zov(µg/ml)
T0	21	61	0.35	20	66	0.19
T1	26	60	0.34	20	68	0.19
T2	10	45	0.31	12	35	0.19
T3	12	27	0.60	18	0	0.19
T4	7	28	2.40	13	8	0.55

**Tableau VI - Temps d'addition de 50µl d'hémolymphe**

Ces résultats mettent en évidence que l'hémolymphe doit être présente et est plus efficace au moment de l'infection et une heure après. Trois microplaques contenant une suspension cellulaire infectée à deux multiplicité d'infection (0.01 et 0.001 ID<sub>50</sub>/cellules) (350 000 cellules Vero/ml) subissent chacune un traitement différent. Ce test permet de confirmer si l'action de la drogue se fait sur les cellules ou sur le virus (Tableau VII). Ce tableau regroupe les résultats de trois lots d'une vingtaine d'individus chacun.

Hm 50µl	MOI 0.01 ID <sub>50</sub> /cellules			MOI 0.001 ID <sub>50</sub> /cellules		
	% D	% P	EC <sub>50</sub> Zov (µg/ml)	% D	% P	EC <sub>50</sub> Zov
TA	0	21	0.53	12	0	0.29
TB	27	72	0.17	22	69	0.19
TC	17	84	0.21	14	48	0.13

**Tableau VII - Adsorption virale**

Aucune protection cellulaire par l'hémolymphe n'est observée pour les cellules ayant subi le traitement A. Cependant, pour les deux autres traitements B et C, l'hémolymphe est présente après la facilitation d'adsorption du virus à 4°C. L'hémolymphe apparaît bien comme un protecteur des cellules vis à vis de HSV-1 et non une drogue virucide.

Une approche mettant en contact le virus et la drogue pendant une heure avant l'infection des cellules a été également entreprise. Le test est arrêté après 48 heures d'infection (Tableau VIII).

Hm 50µl	MOI 0.01 ID <sub>50</sub> /cellules			MOI 0.001 ID <sub>50</sub> /cellules		
	% D	% P	EC <sub>50</sub> Zov(µg/ml)	% D	% P	EC <sub>50</sub> Zov
	11	64	0.25	14	50	0.9

**Tableau VIII - Effet virucide de l'hémolymphe**

La protection cellulaire de l'hémolymphe est nettement diminuée lorsque celle ci est au contact du virus avant le dépôt sur les cellules. Pour une MOI de 0.001 ID<sub>50</sub>/cellules, le pourcentage de protection cellulaire est de 100% pour un tests d'activité antivirale alors qu'il n'est que de 50% lors du test virucide. Ceci confirme bien l'hypothèse que l'hémolymphe agit sur les cellules et non sur le virus.

Pour l'hémolymphe, la cytotoxicité a été évaluée selon les deux méthodes, par culture cellulaire et par cytométrie en flux. Ces extraits sont peu toxiques.

L'hémolymphe fraîchement ponctionnée a été testée directement pour une recherche d'activité antivirale. Les résultats obtenus sont satisfaisants et reproductibles. En présence de 50 µl d'hémolymphe, les cellules sont protégées du virus HSV-1 à la MOI de 0.001 ID<sub>50</sub>/cellules et 0.01 ID<sub>50</sub>/cellules après 48 heures de contact. Nous avons donc cherché à évaluer le mécanisme d'action antivirale de l'hémolymphe. En effet, l'hémolymphe doit être présente au moment de l'infection des cellules par le virus ou dans l'heure qui suit. Elle présente un certain effet virucide de 50%, cependant elle semble être plus efficace sur les récepteurs cellulaires. Des travaux ont montré une activité virucide de la part de l'extrait issus de l'hémolymphe d'huître contre le phage T3. L'objectif est à présent de comprendre de qu'elle manière les principes actifs constituant l'hémolymphe agissent sur les cellules Vero et les protègent du virus (HSV-1).

