

Expression de gènes viraux de l'herpès virus OsHV-1 sous sa forme μ Var chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Segarra A.¹, Faury N.¹, Haffner P.¹, Pépin J.F.¹, Tourbiez D.¹, Trancart S.¹, Travers A.¹, & Renault T.¹

¹Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer), Laboratoire de Génétique et Pathologie, 17390 La Tremblade, France

Introduction

Depuis 2008, des épisodes de mortalité massive ont été rapportés dans différentes régions de production d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, en France, en Irlande et au Royaume Uni. Les données disponibles suggèrent que le virus OsHV-1 est une cause prépondérante avec la détection d'un génotype viral particulier, appelé μ Var, à partir de 2008 (Segarra et al. 2010).

Les moyens de lutte reposent essentiellement sur (1) la surveillance des stocks et des transferts afin de limiter la propagation des agents infectieux, (2) sur l'amélioration génétique pour l'obtention d'animaux présentant de meilleurs taux de survie et (3) la mise en œuvre de techniques d'élevage adaptées. Ces différentes approches nécessitent des outils de diagnostic adaptés, une bonne connaissance du cycle viral et plus particulièrement des interactions entre l'hôte, le virus et l'environnement. Dans ce contexte, il apparaît indispensable de définir l'expression des gènes viraux au cours de l'infection chez l'huître creuse, *C. gigas*.

Matériel et Méthodes

Deux familles d'huîtres creuses, *C. gigas*, ont été produites dans le cadre du projet européen Bivalife (FP 7, 2011-2014) : la famille A dite «résistante» et la famille B dite «sensible» à une infection à OsHV-1 en conditions expérimentales (Schikorski et al., 2011). Les animaux utilisés étaient des animaux âgés de de moins d'un an. Une extraction d'ADN totaux (mini kit, Qiagen) et une extraction ARN totaux (Trizol®) ont été réalisés par individu à partir du manteau (12 individus par temps et par condition).

La quantité d'ADN viral et la détection ADNc ont été réalisées par PCR en temps réelle en utilisant le couple d'amorces C9/C10.

Afin de détecter l'ADNc (transcrits viraux), 39 couples d'amorces ont été dessinés ciblant 39 des 124 ORFs viraux et standardisés par PCR en temps réelle (Figure 1).

Plan d'expérimentation

Cent soixante huîtres de chaque famille ont été injectées expérimentalement et placées à 22°C. Quarante huîtres ont été injectées avec 100 μ L d'eau de mer filtrée et autoclavée et 80 autres ont été injectées avec 100 μ L de suspension virale ajustée à 1,2.10³ copies d'ADN viral/ μ L.

Pour chaque condition, des triplicats de bacs contenant 20 huîtres servant à faire les prélèvements ont été réalisés et un bac supplémentaire contenant 20 huîtres à été mis en place pour la suivie des mortalités.

Les temps de prélèvements post injection ont été : 0h, 4h, 8h, 12h et 26h.

Résultats

1. Cinétique de la mortalité au cours d'une infection expérimentale à OsHV-1 chez deux familles d'huîtres creuses

Le suivi de la mortalité au cours de l'infection à OsHV-1 a permis de mettre en évidence une différence de mortalité entre les deux familles testées : 100% de mortalité pour la famille B contre 10% pour la famille A (Figure 2). Ces résultats confirment que la famille A est plus «résistante» à l'infection à OsHV-1 que la famille B.

2. Estimation de la charge virale par PCR en temps réelle

La quantité d'ADN viral au cours de l'infection indique que le nombre de copies d'ADN viral augmente au cours du temps chez la famille B. En effet, la quantité d'ADN viral varie entre 0 à 10⁴ copies d'ADN viral/ng d'ADN total au temps 8h alors qu'elle atteint presque 10⁷ copies d'ADN viral/ng d'ADN total à 26h post-infection (Figure 3). Cependant, les résultats obtenus pour la Famille B montrent une différence de cinétique de détection d'ADN viral. En effet, la quantité d'ADN viral varie de 0 copie d'ADN viral/ng d'ADN total à 8h à 10⁴ copies d'ADN viral/ng d'ADN total à 26h post infection (données non montrées).

Répartition des 39 ORFs d'OsHV-1 par catégories

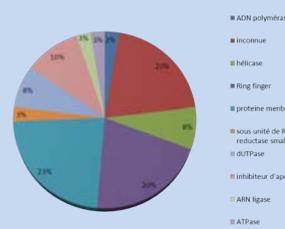


Figure 1: Distribution des 39 ORFs d'OsHV-1 par fonction.

Suivi des mortalités Famille A et B

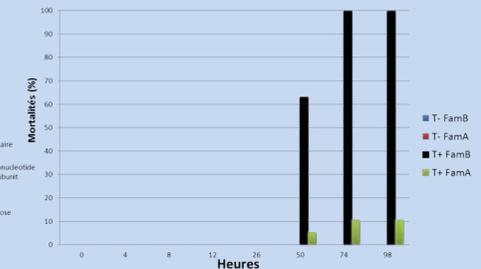


Figure 2: Cinétique des bacs de mortalités pour la Famille A et B post injection. T: témoin. n=20

Estimation de la charge virale

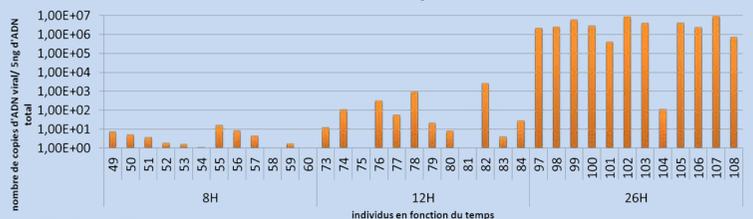


Figure 3: Estimation de la charge virale au cours de l'infection expérimentale chez la famille B

3. Etude de l'expression des ARN transcrits au cours de l'infection chez la famille B

Les résultats obtenus par PCR en temps réel montrent des différences d'expression des gènes viraux transcrits pour les 39 ORFs. Tous les résultats ont été exprimés en quantités d'ADNc viral à l'aide des courbes standards pour chaque ORF. Pour le temps 8h, aucun ADNc n'a été détecté. Les premières détections d'ARN transcrits sont obtenus à partir de 12h pour l'ensemble des ORFs à l'exception de l'ORF 38 (Ring Finger protein) (Figure 4.A). De plus, la différence de détection entre le temps 12h et le temps 26h est plus ou moins importante selon les ORFs. En effet, l'ORF 43 (fonction inconnue) présente une différence de 10⁴ copies d'ADNc viral/ng d'ADNc total alors que l'ORF64 (fonction inconnue) ne présente une différence que de 10² copies d'ADNc viral/ng d'ADNc total (Figures 4B et C). Enfin, l'ORF 100 (ADN polymérase) est très peu exprimé à 12h en comparaison aux 39 ORFs (Figure 4D).

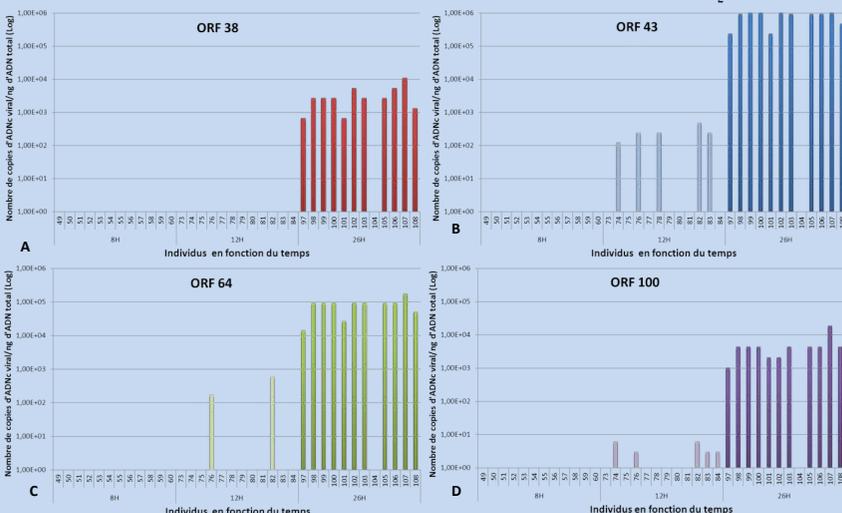


Figure 4: Histogrammes représentant la cinétique de l'expression de l'ORF 38 (A), 43 (B), 64 (C) et 100 (D) en individuel au cours d'une infection expérimentale chez la Famille B

Conclusion - Perspectives

Cette étude a permis de détecter pour la première fois la présence de différents ARN viraux transcrits durant une infection expérimentale à OsHV-1 chez le naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. De plus, cette étude montre une différence de cinétique d'expression pour les ORF considérés. Enfin, ceci confirme la réplication du virus au sein même de son hôte et par conséquent renseigne sur le cycle viral d'OsHV-1 (comparable à celui d'autres herpes virus).

La même analyse est en cours pour la famille A dite «résistante» afin de rechercher de possibles différences d'expression des gènes viraux durant l'infection chez *C. gigas* entre deux familles à comportement contrasté vis à vis de l'infection virale.