

Découvrez un ensemble de documents, scientifiques ou techniques,
dans la base Archimer : <http://www.ifremer.fr/docelec/>



ifremer

Cécile OLICARD

Rapport d'activité n°3 - troisième semestre
Mars 2002

**Etude des mécanismes antiviraux
développés par les huîtres lors
d'infections à virus de type herpès**

SOMMAIRE

Contexte scientifique	1
Matériel et Méthode	8
1. Préparation des échantillons	8
<i>1.1. Organe, hémolymphe et hémocytes</i>	
2. Extraction et purification de molécules	11
<i>2.1. Extraction à partir de l'hémolymphe et hémocytes</i>	
<i>2.2. Extraction à partir des tissus d'huître</i>	
3. Dosage en protéines	12
4. Culture cellulaire	13
<i>4.1. Les cellules Vero</i>	
<i>4.2. Les cellules Hémocytaires</i>	
<i>4.3. Virologie</i>	
5. Evaluation des activités biologiques	19
<i>5.1. antiherpétique de référence</i>	
<i>5.2. Evaluation de l'activité cytotoxique selon deux méthodes</i>	
<i>5.2. Evaluation de l'activité antivirale (anti HSV-1)</i>	
<i>5.3. Evaluation des activités cellulaires</i>	
Résultats et Discussion	24
1. Rendement en protéines des différentes fractions	24
2. Activité cytotoxique et antivirale des extraits	25
<i>2.1. Cytotoxicité par cytométrie en flux</i>	
<i>2.2. Cytotoxicité et évaluation de l'activité antivirale par viabilité cellulaire</i>	
3. Evaluation de l'activité cellulaire	30
Conclusion et Perspectives	32
Bibliographie	33

Contexte scientifique

Le domaine de l'aquaculture, sans cesse en expansion, a vu son taux de production de l'année 1990 passer de 13% à 22% en 1996. Même si l'élevage de coquillages concerne un nombre limité d'espèces dont la plupart sont des mollusques bivalves, la conchyliculture représente à l'échelle mondiale et en France une activité dont les enjeux économiques sont importants. En France, la conchyliculture produit dans son ensemble 200 000 tonnes de coquillages représentant 0.65 milliards d'euro, soit 4.3 milliards de francs. Ainsi en 1997, les coques, les palourdes, les coquilles Saint-Jacques, les moules et les huîtres représentaient 20,6% du tonnage de la production mondiale de coquillages et 16,1% du chiffre d'affaire (CA) de l'aquaculture mondiale (FAO, 1999). En France, l'activité ostréicole concerne principalement deux espèces d'huître : l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et l'huître plate, *Ostrea edulis*. En 1996, La FAO (Food and Agriculture Organisation) indique que ces deux espèces représentent 68% du tonnage des coquillages d'intérêt économique produit en France. Le bassin de Marennes-Oléron est le premier bassin producteur d'huîtres avec 60% de la production nationale dont 45% d'huîtres creuse. Elle présente donc un grand intérêt économique sur le Littoral Charentais. Pour ces raisons, l'ostréiculture est considérée par les autorités privées et publiques comme une activité à soutenir en terme de recherche fondamentale et appliquée.

Durant les dernières décennies, les progrès zootechniques considérables ont été réalisés, notamment grâce à une meilleure connaissance de la biologie des bivalves et de la physiologie liées à leur reproduction (Barnabé, 1986). Parallèlement à l'amélioration des méthodes d'élevage et pour pallier au caractère bien souvent aléatoire du captage naturel, l'aménagement progressif des bassins conchylicoles a conduit à une **augmentation significative des densités** de mollusques élevés. De plus, les professionnels de l'ostréiculture peuvent aujourd'hui avoir recours à des productions de larves et de naissains issus d'élevage intensifs et trouver ainsi une certaine indépendance quant aux pontes naturelles (captage naturel). Ainsi, le **confinement des populations et le transfert** d'animaux entre bassins et pays sont de plus en plus fréquents. Ces caractéristiques sont associées à des risques accrus d'infection.

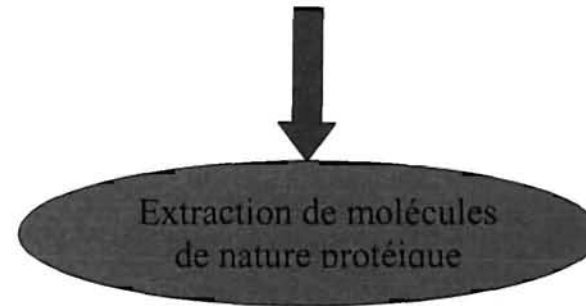
L'élevage intensif de *Crassostrea gigas* dans le Bassin de Marennes d'Oléron où le **renouvellement d'eau** est relativement limité et où la **présence de certains polluants** (cadmium (Cd), zinc (Zn), cuivre (Cu) provenant de la Gironde) est bien réelle, a contribué à l'émergence et la dissémination de maladies, à fragiliser les coquillages en réduisant leurs défenses immunitaires et à les rendre plus sensibles à certaines pathologies.

A la suite de plusieurs travaux montrant la sensibilité accrue des animaux en aquaculture, plusieurs maladies d'origine virales ont été détecté et ont sérieusement affecté l'industrie aquacole. Il a été notamment identifié des virus à morphologie similaire à celle des virus de la famille des *Herpesviridae* dans plusieurs espèces de bivalves marins (Nicolas et al., 1992 ; Hine et al., 1992 ; Renault T., 1998 ; Renault et al., 2000, Renault et al., 2001). L'identification du virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* a été décrite pour la première fois en 1972 dans les travaux Farley chez l'huître américaine *Crassostrea virginica*. Depuis 1991, de **fortes mortalités de larves et de juvéniles** ont été observées en France chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et l'huître plate, *Ostrea edulis* (Nicolas et al., 1992 ; Comps and Cochenec, 1993 ; Renault et al., 1994 et Renault et al., 2000). Ces mortalités ont été associées à la détection de particules virales de types herpès associées à des lésions cellulaires importantes en microscopie électronique à transmission (Nicolas et al., 1992 ; Comps and Cochenec, 1993 ; Renault et al., 1994 ; Le Deuff, 1995 et Renault et al., 2000). D'après la morphologie, la taille, la localisation intranucléaire et cytoplasmique du virus, il est possible d'envisager l'appartenance de ce virus à la famille des *Herpesviridae*. Aucune mortalité liée à la détection du virus n'a été rapportée chez les animaux adultes (Le Deuff, 1996). On suppose que les animaux adultes transmettent le virus à leur descendance mais sont capables de se défendre par divers mécanismes.

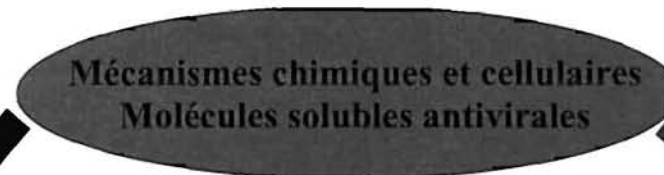
Si peu de travaux concernant l'étude des virus infectant les Bivalves sont disponibles aujourd'hui, ceux ayant pour objet l'étude des mécanismes développés par les coquillages pour se défendre vis-à-vis de ces agents infectieux de type viral sont pratiquement inexistantes. A l'exception des travaux de Lee et Maruyama (1998) portant sur la caractérisation de peptides isolés à partir d'un hydrolysât protéique de *Crassostrea gigas* inhibant *in vitro* une protéase HIV-1, la littérature scientifique ne mentionne pas l'existence de molécules spécifiques à *C. gigas* présentant des activités antivirales.

Crassostrea gigas

**Adultes
différents Organes
(Cœur, palpes labiaux, manteau, branchies)
Hémolymphe Sérum et hémocytes**



Fractions



Evaluation de la cytotoxicité
Sur cellules Véro et Hémocytes

Activités cellulaires hémocytaires
Par cytométrie en flux

Evaluation de l'activité antivirale
Modèle *herpes* HSV-1

Cependant, de façon moins précise, les travaux de Bachère *et al.* (1995) portant sur un extrait d'hémolymphe isolé de *C. gigas* présentant des activités contre des coliphages de type T3, ainsi que les travaux de Achour *et al.* (1997) portant sur des extraits de *C. gigas* contenant des éléments provoquant une stimulation des activités enzymatiques intervenant dans les mécanismes de défense sur des individus sains et sur des individus infectés par HIV, sont mentionnés dans la littérature. Les moules (*Mytilus galloprovincialis*) et les huîtres sont plus connues pour leurs activités antimicrobiennes et cytotoxiques (Hubert *et al.*, 1996 ; 1997 ; Mitta *et al.*, 1999ab).

Ces résultats suggèrent fortement que les mollusques bivalves possèdent des mécanismes de défense immunitaire qui, grâce à l'application de techniques de transformation génétique, pourront être d'une grande utilité pour le développement de l'aquaculture. Aucune mortalité associée à la détection de virus de type herpès n'a été rapportée au stade adulte au sein des cheptels français. Ces données laissent suspecter une moindre sensibilité des animaux adultes à ces infections virales. Il semble donc important de comprendre quel(s) mécanisme(s) de défense peut(vent) être mis en place chez l'adulte pour limiter et/ou contrôler l'infection virale. L'étude de ces mécanismes devrait contribuer ainsi à approfondir les connaissances sur l'immunité antiviral innée chez l'huître creuse, *C. gigas*, dans le but de développer de nouvelles approches pour contrôler l'impact de ces infections virales sur les productions conchylicoles en définissant la pathogénicité, la virulence et les interactions hôte-pathogène des virus impliqués.

Les travaux réalisés au cours de la première année ont concernés tout d'abord une importante recherche bibliographique afin de bien cerner les enjeux de la problématique. Nous avons alors porté nos premières actions sur la recherche de substances non induites par le virus type herpès. Cette étape du programme a consisté à préparer différents types d'échantillons (broyats de larves d'huître, organes, hémolymphe et hémocytes d'animaux adultes). Quatre lots ont été préparé : un lot HIVER nourri, HIVER à-jeun, un lot ETE nourri et un lot ETE à-jeun. Parallèlement, il nous a fallu mettre au point chaque d'extraction. Enfin les techniques de culture cellulaire et de cytométrie en flux nous ont permis d'étudier le système immunitaire par l'intermédiaire d'une lignée cellulaire mammalienne et par des hémocytes d'huître sur des critères de taille, de complexité et des critères permettant d'explorer leur fonctions. Différents tests ont été réalisés sur les cellules afin de détecter des paramètres tels que la phagocytose, l'apoptose, la production de radicaux libre et d'enzymes.

L'objectif de cette deuxième année de doctorat est d'approfondir l'étude des activités cellulaires des extraits mis en évidence en cytométrie en flux et d'évaluer leurs activités anti-herpétiques. Cependant, une des difficultés de l'étude du virus de type herpes chez l'huître réside dans l'impossibilité actuelle de pouvoir le cultiver *in vitro*. C'est pourquoi le modèle utilisé lors de cette étude est celui de l'*Herpes simplex* virus humain de type 1 (HSV-1), bien connu dont la culture *in vitro* est bien maîtrisée. Le virus herpes de l'huître et celui de l'herpes humain appartiennent tous deux à la famille des *Herpesviridae*. Ils sont morphologiquement proche, cependant leur génome est assez éloigné l'un de l'autre. Tous deux ont la caractéristique de posséder une phase de latence. Parallèlement, la purification des extraits ayant une activité cellulaire et/ou antivirale a débuté par chromatographie en High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une des thématiques affichées par le Laboratoire de Biologie et Environnement Marins (LBEM) de l'université de La Rochelle. Il s'effectue en étroite collaboration avec le Dr. Tristan Renault du Laboratoire de Génétique et de Pathologie (LGP) de la station de l'IFREMER de La Tremblade.

BILAN DU PROJET DE RECHERCHE

Année	Objectifs	Résultats
1^{ère} année (2000/2001)	<ul style="list-style-type: none">- Recherche bibliographique - Constitution du stock de matériel biologique- Mise au point des protocoles d'extractions- Premières évaluations des activités cellulaires des extraits en cytométrie en flux	<ul style="list-style-type: none">- Peu de travaux sur des virus infectants des bivalves. Aucun travaux sur la mortalité associée à la détection de virus de type herpes rapporté au stade adulte des cheptels français. - Protocoles reproductibles- Premiers résultats mis en évidence.
2^{ème} année (2001/2002)	<ul style="list-style-type: none">- Approfondir l'évaluation des activités des différents extraits- Evaluation des activités antivirales anti HSV-1- Purification	

PREPARATION DES ECHANTILLONS

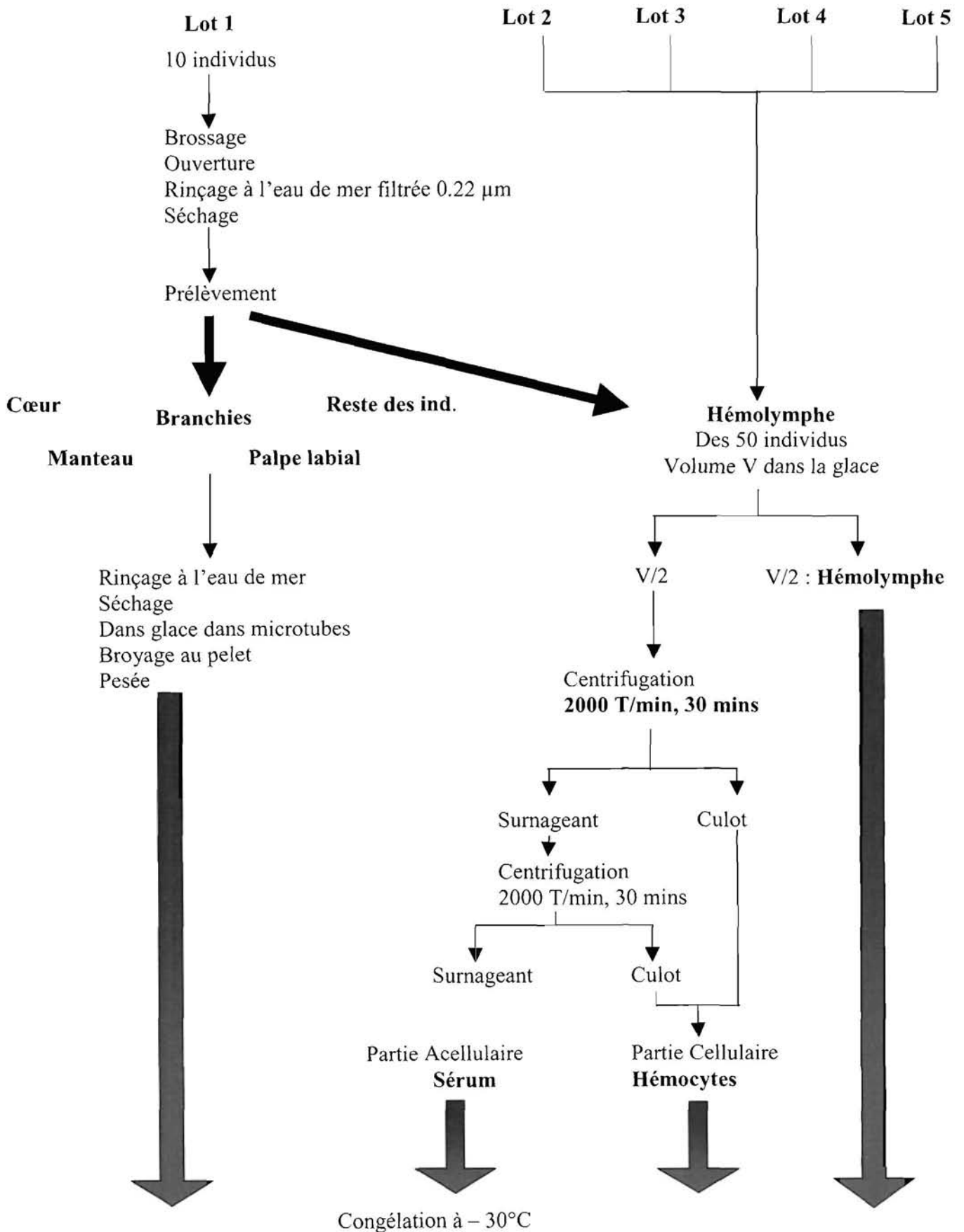


Figure 2 : Préparation des échantillons

Matériel et Méthodes

1. Préparation des échantillons (Figure 2, page 7)

1.1 Organes, hémolymphe et hémocytes

La préparation des échantillons (figure 2, page 7) a été effectuée à partir d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, adultes de calibre M3 (âgées de 3 ans). Les animaux ont été récoltés de novembre 2000 à janvier 2001. Chaque semaine, 200 individus ont été disséqués : 100 individus traités immédiatement après leur sortie d'eau (N) et 100 autres traités après une semaine de jeûne (AJ). Les animaux sont mis à jeûner dans des bacs d'eau de mer de 40 L en maintenant un bullage continu et une température de 10°C. Différents organes (cœur, palpes labiaux, branchies, manteau), hémolymphe, hémocytes, sérum et des adultes entiers ont été prélevés, pesés et congelés. 700 individus ont été traités au cours de l'hiver 2000 et constitue donc le lot HIVER-00. La même expérimentation a été réalisée au cours de l'été 2001 et constitue le lot ETE-01.

EXTRACTION ALCOOLIQUE DES TISSUS

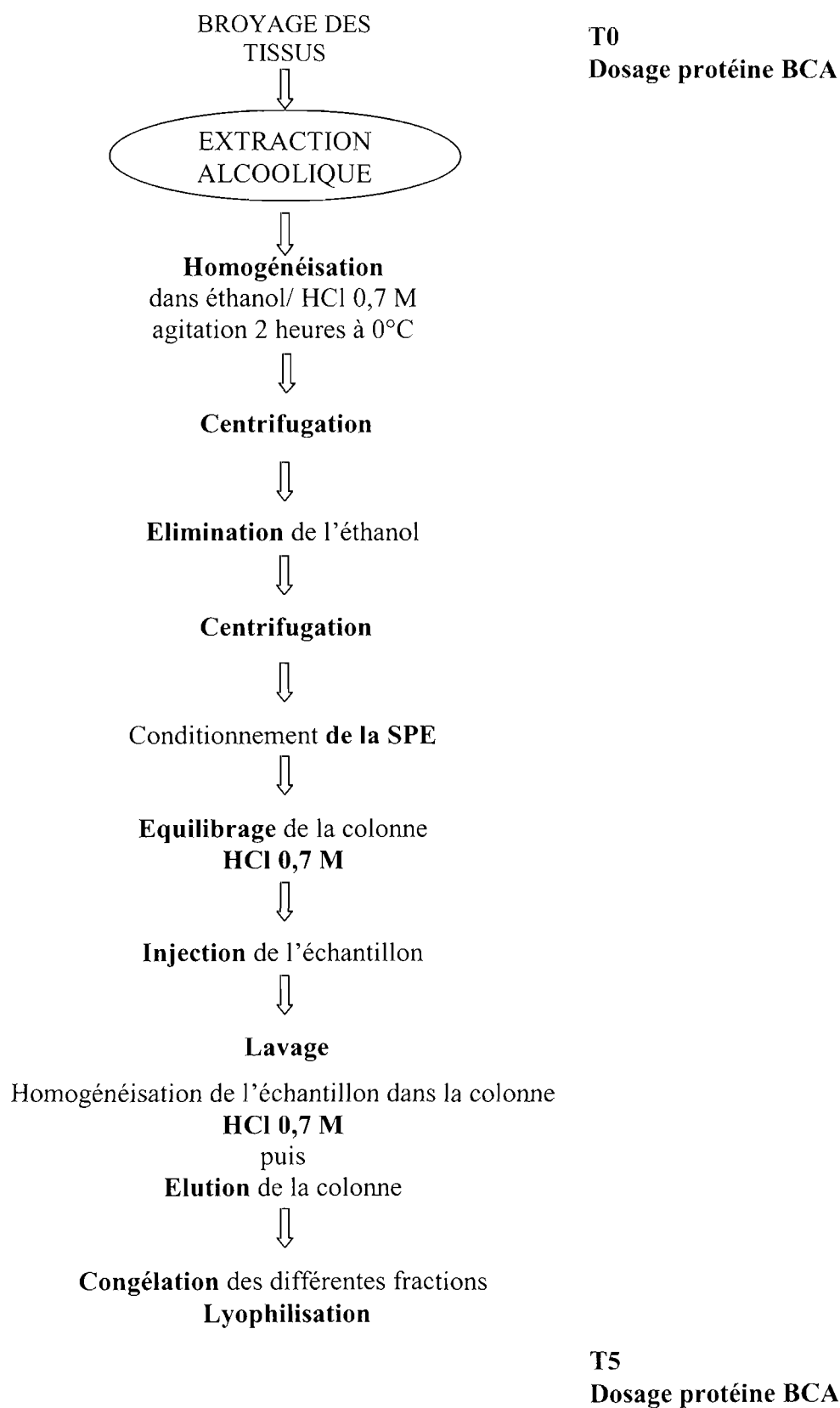


Figure 3 : Extraction alcoolique des tissus

EXTRACTION A PARTIR DE L'HEMOLYMPHE ET HEMOCYTES

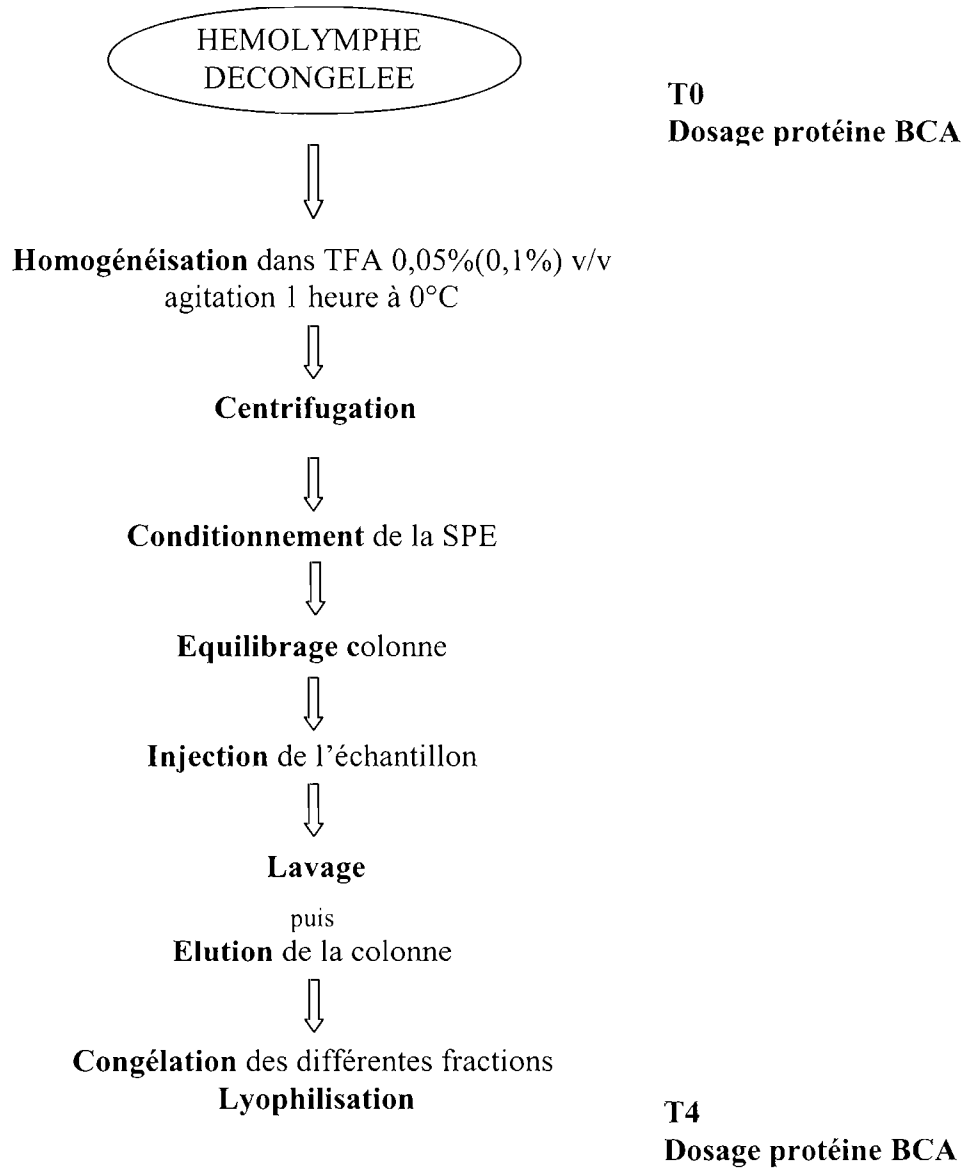


Figure 4 : Extraction à partir de l'hémolymphe et des hémocytes

2. Extraction et purification de molécules (Figures 3 et 4)

Différents protocoles d'extraction ont été menés : extraction alcoolique des différents tissus (Figure 3, pages 9) d'après Matutte *et al.* (2000) et une extraction réalisée à partir de l'hémolymphe et des hémocytes (Figure 4, page 10) d'après Roch *et al.* (1996) et Fleury *et al.* (1998).

2.1. Extraction à partir de l'hémolymphe et hémocytes (figure 4, page 10)

Les extractions sont réalisées sur colonne de chromatographie C18 de type Solid Phase Extraction (SPE, Macherey-Nalgene, 1000mg, 6 mL).

L'échantillon congelé est homogénéisé dans l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1% (v/v) sous agitation pendant une heure à 0°C. Centrifugé à 4000 rpm pendant 60 minutes à 4°C (JOUAN MR22i), le surnageant est récupéré.

Conditionnement de la colonne

Le conditionnement de l'adsorbant est effectué avec quatre volumes de colonne d'un solvant miscible à l'eau, l'acétonitrile (CH₃CN) pur. Puis la colonne est ensuite équilibrée par un volume colonne de TFA 0,1%.

Dépôt et homogénéisation de l'échantillon (adsorption)

Le dépôt de l'échantillon est fait avec un débit de 3 mL/min. Puis l'échantillon est équilibré dans la colonne par un volume colonne de TFA 0,1%.

Elution de l'échantillon

L'élution de l'échantillon dans la colonne est effectuée en introduisant un volume de solvant correspondant au volume de l'extrait introduit. Le solvant utilisé est l'acétonitrile à 10%, 50% et 80%. Les trois fractions obtenues sont lyophilisées afin d'éliminer les solvants et l'acidité contenus dans les extraits. Ils sont ensuite conservés au congélateur à - 20°C.

2.2. Extraction des tissus alcoolique (figure 3, page 13)

L'homogénéisation des tissus congelés se fait dans trois volumes d'éthanol 100% et un volume d'acide chlorhydrique (HCl) 0,7 M (3V/1V ; 10 mL/g), sous agitation à 0°C pendant deux heures. Après centrifugation (4000 rpm, 60 min, 4°C, JOUAN MR22i), le surnageant est récupéré. L'élimination de l'éthanol par évaporation est suivi d'une centrifugation (4000 rpm, 60 min, 4°C, JOUAN MR22i). Le surnageant est récupéré.

Conditionnement de la colonne

La SPE est conditionnée par quatre volumes colonne d'un mélange CH₃CN/eau/TFA dans les proportions respectives suivantes 80 :20 :0,1. La colonne est équilibrée par un volume colonne d'HCl 0,7 M.

Dépôt et homogénéisation de l'échantillon (adsorption)

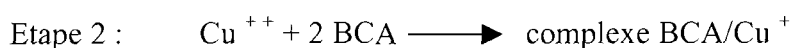
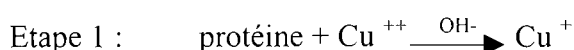
Après l'injection de l'échantillon, un volume colonne, d'HCl à 0,7 M permettra d'homogénéiser celui ci dans la colonne.

Elution de l'échantillon

L'échantillon est élué par une solution CH₃CN/eau/TFA (80 :20 :0,1) correspondant à un même volume de l'échantillon introduit. La fraction soutirée sera lyophilisée puis congelée à -20°C. L'extrait sera repris dans de l'eau distillée.

3. Dosage en protéines

La concentration en protéines totales contenue dans les différents échantillons est déterminée à l'aide d'un Kit BCA (BCA protein assay kit, Pierce) en début et en fin d'extraction. Le principe est basé sur l'interaction entre deux molécules d'acide bicinchoninique (BCA) avec l'ion Cu⁺⁺ se traduisant par une réaction colorée pourpre, le produit obtenu étant soluble dans l'eau. Cette réaction peut être quantifiée par une lecture de la densité optique à 562 nm. La gamme étalon est obtenue avec le sérum albumine bovine (BSA).



4. Culture cellulaire

4.1. Les cellules Vero

Les cellules mammaliennes utilisées au cours de cette étude sont des cellules Vero. La lignée cellulaire correspond à des cellules fibroblastiques de rein de singe vert (*Cercopithecus aethiops*), en culture continue (n°ATCC: CCL 81). Il s'agit d'une lignée adhérente, garantie bactériologiquement stérile. Cette lignée cellulaire est recommandées dans les tests d'activité antivirale et de cytotoxicité. Elle présente les caractéristiques suivantes :

- La lignée est adhérente,
- Les cellules peuvent être subcultivées indéfiniment,
- Elles possèdent un nombre de chromosomes et/ou une morphologie anormale,
- Elles présentent des propriétés spécifiques les différenciant des cellules normales, en particulier, un haut potentiel multiplicatif.

Ces caractéristiques sont à associer aux phénomènes de transformations cellulaires spontanées ou induites. De telles particularités offrent à ce type de lignée un grand nombre d'applications qu'il s'agisse de la recherche (virologie, cancérologie, recherche pharmaceutique) ou encore de diagnostique en médecine humaine et vétérinaire. Le taux de croissance des cellules Vero est de 1 :20 en sept jours si les cellules ont été ensemencées à raison de 3×10^5 cellules/mL. Ces cellules sont sensibles à de nombreux virus dont le virus Herpes simplex de type 1 (HSV-1). Nous les utilisons pour les tests jusqu'au 40^{ème} passage.

4.1.1. Milieu de culture des cellules Vero

Le milieu de culture utilisé pour l'entretien et la croissance des cellules est le milieu MEM "Minimal Essential Medium" de Eagle modifié avec sels de Earle et des acides aminés non essentiels (Eurobio). Ce milieu est tamponné par du bicarbonate de sodium à 7,5% (Sigma) à pH de 6.90 ± 0.1 sous CO_2 . A ce milieu MEM est additionné 8% de sérum de veau foetal (MEM 8% SVF) stérile, inactivé 40 minutes au bain-marie à 56°C (Eurobio). Stérilisé et filtré, le milieu est alors réparti en flacons de 500 mL, conservés d'abord à 37°C pendant 24 heures, à température ambiante pendant 48 heures afin de contrôler sa stérilité, et enfin stockés à 4°C. Quand les cellules sont mises en culture en présence du milieu MEM, le déclenchement de la division cellulaire n'est possible qu'en présence d'un certain nombre de facteurs mitogènes souvent fournis par le sérum. Au moment de l'utilisation du milieu, il est complété par 1% de glutamine dont la présence est nécessaire pour une culture satisfaisante

de presque toutes les cellules de mammifères. On ajoute également des antibiotiques (1%) pour réduire la contamination par les bactéries et les champignons: de la pénicilline (deux flacons d'un million d'unités); de la colimycine (cinq flacons d'un million d'unités) et de la streptomycine (1g). Les solutions d'antibiotiques ont été préalablement préparées dans 200 mL de solution phosphatée et réparties en aliquotes de 5 mL. La solution phosphatée est, elle, préparée à partir de chlorure de sodium (40g); de chlorure de potassium (1g); de phosphate disodique (14,5g); de phosphate monopotassique (1g) et d'eau distillée (5L) distillée. Les solutions sont stérilisées 20 minutes à 120°C et conservées au froid (4°C) (Froget and Adolphe, 1988 ; Payment and Trudel, 1989 and Simoes, 1993).

4.1.2. Entretien des cellules Vero

Les cellules sont cultivées dans 30 mL de milieu nutritif, puis incubées à 37°C en atmosphère contenant 5% de CO₂, en monocouche cellulaire, dans des flacons de 80 cm².

Le CO₂ n'intervient pas seulement au niveau du pH mais également sur la prolifération cellulaire. L'atmosphère doit être saturée en vapeur d'eau afin de prévenir l'évaporation et l'augmentation de l'osmolarité du milieu. Les cellules sont multipliées deux fois par semaine lorsque le tapis est confluent et distribuées dans deux flacons de 80 cm² contenant en moyenne 350.000 cellules/mL.

4.1.3. Trypsination des cellules

Le milieu de culture est jeté et le tapis cellulaire est lavé au tampon phosphaté. Deux ml de trypsine (Eurobio, Trypsine/EDTA 0,05/0,02%) sont ajoutés et laissés en contact avec le tapis cellulaire pendant environ une minute à température ambiante. Puis après avoir enlevé l'excès de la solution, le flacon est placé cinq à dix minutes à 37°C jusqu'à complète dissociation du tapis cellulaire. Les cellules agglomérées sont séparées par aspirations et rejets de 4 mL de milieu MEM 8% SVF. Les cellules décollées sont reprises dans 6 mL de milieu MEM 8% SVF etensemencées à raison de 2 mL de suspension cellulaire dans 30 mL de milieu.

4.2. Les cellules hémocytaires

Les cellules hémocytaires de *Crassostrea gigas* sont des cellules circulantes de l'hémolymphe des huîtres. Elles sont capables de phagocyter les particules étrangères et interviennent dans l'activité de défense vis-à-vis d'agents infectieux. Les hémocytes sont

véhiculés au sein de l'organisme et dans les tissus, dans un système circulatoire semi-ouvert, caractéristique des bivalves (Renault, 2000).

4.2.1. Ponction des cellules hémocytaires

Les huîtres sont brossées sous l'eau courante, en prenant soin de nettoyer correctement la jointure des deux valves. Puis, les animaux sont désinfectés pendant 30 secondes dans un bain d'éthanol 70° et placés sous hotte à flux laminaire pour séchage. L'ouverture des huîtres est réalisée à l'aide d'une lame désinfectée flambée. Les animaux sont ensuite rincés avec de l'eau de mer filtrée à 0,22 µm et autoclavée, puis essorées verticalement sur papier absorbant. Les animaux sont ensuite rincés avec de l'eau de mer ultrafiltrée et autoclavée, contenant 0,1% de Tween de type 20 (Tween 20, Sigma), puis de nouveau avec de l'eau de mer autoclavée.

La ponction de l'hémolymphe est réalisée à travers la membrane péricardique, dans la cavité péricardique, à l'aide d'une seringue de 1ml et d'une aiguille stérile (23G, n°16), au diamètre suffisamment large pour ne pas léser les hémocytes. La seringue est remplie au préalable de 0,5 mL d'une solution anti-agrégante filtrée à 0.22 µm et additionnée d'antibiotiques. Il est nécessaire de changer régulièrement de seringue et d'aiguille, pour limiter tout risque de contamination bactérienne.

L'hémolymphe est récupérée dans un tube à centrifugation (50 mL), placé dans la glace, de manière à conserver au mieux les hémocytes, mais aussi à éviter la prolifération bactérienne et le phénomène d'agrégation cellulaire. La quantité d'hémolymphe prélevée est comprise entre 0,5 et 1 mL par individu. L'hémolymphe prélevée doit présenter un aspect translucide. Deux à trois rinçages successifs sont réalisés par centrifugation (250 g, 10 minutes, 4°C) de manière à éliminer le plus grand nombre de bactéries. Après chaque centrifugation, le surnageant est éliminé et les hémocytes sont repris dans 1 mL de solution d'Alsever (complémentée en antibiotiques), puis comptés sur une cellule de Malassez (Deniau, 2000).

4.3. Virologie

4.3.1. La souche virale

La souche 17 sauvage ACS^s et PFA^s a été fourni par le professeur BILLAUDEL, du laboratoire de virologie de Nantes.

4.3.2. Préparation du stock viral

Un flacon de 80 cm² de cellules Vero (350.000 cellules/mL) est trypsiné et repris par 5 mL de milieu MEM 8%SVF contenant 500 µL de suspension virale. Le flacon est incubé à 37°C sous 5% de CO₂ pendant deux heures de contact. Ce temps de contact permet au virus de pouvoir pénétrer dans les cellules. Le milieu est ensuite éliminé et remplacé par 30 mL de milieu MEM 2%SVF. Après trois à quatre cycles de multiplication viral (trois jours), le flacon subit alors deux cycles successifs de congélation et décongélation pour compléter l'éclatement des cellules et ainsi libérer les virions intracellulaires. Le surnageant prélevé, subit une clarification du virus par centrifugation (2500 rpm ; 10 mn). La suspension virale stock est alors répartie dans des cryotubes en aliquotes de 2 mL et congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

4.3.3. Titration du virus stock

Le Titrage est évalué par deux méthodes :

Reed and Muench (1938)

Viabilité cellulaire par coloration au rouge neutre

➤ **Le principe**

Le principe du titrage virale est de dénombrer par unité de volume les particules virales capables d'infecter des cellules permissives. Le titrage est réalisé sur plaque à microtitration de 96 puits. Une suspension de 100µl de cellules Vero à 350.000 cellules/mL est déposé dans chaque puits puis 50 µL de milieu MEM 8%SVF y est. Deux colonnes témoins cellulaires sont préparées à partir de 100 µL de suspension cellulaire et 100 µL de milieu MEM 8%SVF. A partir du stock viral une série de dilutions de raison dix est distribué dans chaque puits (10 répliqués par dilution, 50 µL par puits). Après inoculation du virus les microplaques sont incubées 72 heures à 37°C sous 5% de CO₂, permettant quatre à cinq cycles de multiplication du virus *Herpes*. La dose infectieuse 50% est la dilution produisant un effet cytopathique total dans 50% des essais.

➤ **Protocole**

Afin de déterminer le titre du virus une série de dilutions de raison dix est réalisé à partir du stock de virus et distribuée dans chaque puit. L'effet cytopathique (ECP) des virus herpétiques s'exprime par un agrandissement et un arrondissement des noyaux des cellules qui prennent un aspect globuleux et une organisation des cellules en chapelet. Le titrage est réalisé sur plaque à microtitration de 96 puits, sur les cellules Vero, à raison de dix cupules par dilution (figure 5).

10^{-1}										TC	TC
10^{-2}										TC	TC
10^{-3}										TC	TC
10^{-4}										TC	TC
10^{-5}										TC	TC
10^{-6}										TC	TC
10^{-7}										TC	TC
10^{-8}										TC	TC

Figure 5 : Organisation de la microplaque pour le titrage du virus

Une ligne par dilution :
 100 µL de suspension cellulaire
 50 µL de milieu MEM 8%SVF
 50 µL de suspension virale stock.

Les deux colonnes témoin cellulaires :
 100 µL de suspension cellulaire
 100 µL de milieu MEM 8%SVF

➤ **Titrage selon la méthode de Reed and Muench**

Par cette méthode des dilutions limites, le calcul d point d'infection 50% est réalisé. Comme le nombre d'essais est en pratique limité, Reed and Muench préconisent d'augmenter artificiellement le nombre d'essais par dilution en utilisant le procédé des totaux cumulatifs :

- Si un effet positif est obtenu à une dilution, la réponse sera également positive pour les dilutions inférieures
- Inversement, si un effet est négatif à une dilution, il sera semblable aux dilutions supérieures.

Les pourcentages de mortalité sont calculés pour chaque dilution. Si le point 50% ne correspond pas exactement à l'une des dilutions, sa distance proportionnelle à la dilution immédiatement inférieure est calculée selon la formule :

$$\text{Distance proportionnelle } e = (A - 50) / (A - B)$$

A pourcentage de mortalité à la dilution immédiatement supérieure

B pourcentage de mortalité à la dilution immédiatement inférieure

Le logarithme du titre infectieux est le logarithme de la dilution qui donne un pourcentage d'effet positif immédiatement supérieur à 50% avec la distance proportionnelle multipliée par le log du facteur de dilution.

$$\text{Soit } \log \text{ ID}_{50} = \log (\text{dilution}) + (e \times \log 10) = Y$$

Le titre infectieux pour 50 μL est de 10^Y ID_{50}

Pour 1000 μL est de $2 \times 10^{(1+Y)} \text{ ID}_{50}$

A partir de la valeur du titre infectieux de la suspension virale, il est possible de déterminer la multiplicité d'infection MOI (Multiplicity Of Infection). Elle correspond au titre infectieux divisé par le nombre de cellules par millilitre et intervient dans l'évaluation de l'activité antivirale.

$$\text{MOI} = \text{ID}_{50}/\text{mL} / (\text{nombre de cellules} / \text{mL})$$

Le titre infectieux utilisé lors de ces travaux est de $2 \times 10^{6,2} \text{ ID}_{50}/\text{mL}$

➤ Titrage par mesure de la viabilité cellulaire par coloration au rouge neutre

Le principe repose sur la coloration des cellules par un colorant vital, extrait ensuite par un tampon. Le colorant va diffuser de façon homogène dans le solvant et la densité optique de la plaque sera lue au spectrophotomètre (SpectraCount™, microplate photometer, Packard) à la longueur d'onde de 540 nm (Langlois et al., 1996).

Coloration : La solution, conservée au froid et à l'abri de la lumière, est préparée à partir de 0,15g de rouge neutre (Fluka Chemika) dans 100 mL de sérum physiologique (pH 5,5). Après 72 heures d'incubation de la plaque, 50 μL de rouge neutre sont introduit dans chaque puits. Les plaques sont placées 45 minutes à 37°C.

Lavage : Après incubation, les plaques sont vidées et 100µl de PBS sont ajoutés dans chaque puits afin de laver le rouge neutre sur les parois des cupules.

Extraction : le colorant vital est élué par extraction au tampon citrate-éthanol. Ce tampon est préparé à partir d'un volume d'éthanol absolu et volume de tapon Sorensen.

Lecture des résultats : Après homogénéisation des cellules dans chaque puits, les plaques sont lues au spectrophotomètre. Les moyennes des densités optiques obtenues sont déterminées pur chaque série d'évaluation.

5. Evaluation des activités biologiques

5.1. Antiherpétique de référence

Trois drogues de référence sont utilisées contre le virus herpes HSV-1.

L'**acyclovir**, testé de 5 à 0,1 µg/mL, est un dérivé nucléosidique possédant une base guanine (9(2 hydroxyethoxyméthylalphanine)) et où le sucre est remplacé par une chaîne hydrocarbonée acyclique.

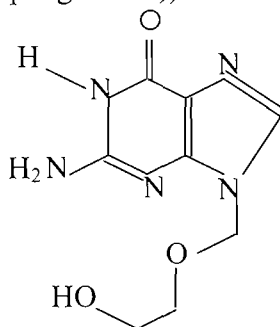


Figure 6 : molécule d'Acyclovir

La **Melittin** est un peptide de référence issue de venin d'abeille (Sigma). Les concentrations étudiées vont de 1 à 10 µg/mL. L'**Indolicidin**, issue de neutrophiles bovin (Sigma) a aussi été testé de la concentration 1 à 10 µg/mL. Ils sont reçu lyophilisés et sont remis en suspension dans de l'eau bidistillée avec passage aux UV. Ils sont connus pour leur activité antivirale et notamment vis à vis de HSV-1 (Yasin et *al.*, 2000).

5.2. L'évaluation de l'activité cytotoxique selon deux méthodes

5.2.1. Evaluation de la cytotoxicité par viabilité cellulaire (RN) :

➤ Principe

La Concentration Cytotoxique à 50% de destruction cellulaire (CC₅₀) est évaluée après coloration par le rouge neutre de chaque cupule de la microplaque et lecture au spectrophotomètre à 540nm de la même manière que pour le titrage du virus. Les résultats sont exprimés en pourcentage de destruction cellulaire.

➤ Protocole

Une suspension cellulaire de 350 000 cellules/mL est distribuée dans les 96 cupules d'une microplaque (100 µL par cupule) (nunc). Dans chaque puits, 50 µL d'extrait testé à différentes concentrations (de 500 à 5µg/mL) sont ajoutés. Une drogue de référence est associée à chaque plaque (50 µL par cupule à différentes concentrations). 50 µL de milieu MEM 8%SVF sont ajoutés à chaque puits. Deux colonnes témoin cellules sont composés de 100 µL de cellules à 350.000 cellules/mL et de 100 µL de milieu MEM 8%SVF. Chaque plaque est incubée pendant 72 heures à 37°C en atmosphère 5% CO₂ pour ensuite être lu au spectrophotomètre à 540 nm de longueur d'onde.

5.2.2. Evaluation de la cytotoxicité par cytométrie en flux

➤ Généralité et principe

La cytométrie en flux a pour principe d'étudier les caractéristiques physiques et chimiques de particules (cellules) entraînées dans un flux liquide. Les cellules sont excitées par un laser et émettent en réponse un rayonnement qui permet d'obtenir des informations multiples les concernant soit directement par auto fluorescence soit indirectement par l'intermédiaire de fluorochromes. Cette technique nous permet d'obtenir une information complémentaire via un cytogramme quant à la taille (FSC value) et la complexité (SSC value) des cellules étudiées en présence des différents extraits. L'enregistrement de la fluorescence n'est pas la même pour toutes les activités cellulaires étudiées : les enzymes et la phagocytose sont mesurés par FL1 et la mortalité par FL3 (Qing-Gang Xue et *al.*, 2001).

➤ **Protocole**

L'activité cytotoxique des différents extraits est testée en cytométrie en flux (Coulter EPICS XL 4), à 4 heures et à 72 heures de contact entre les cellules et les substances. Pour chaque échantillon de cellules Vero, 5000 événements sont comptés. Afin d'obtenir des informations concernant la viabilité de nos cellules, une incubation de trente minutes avec 5µl d'un fluorochrome (iodure de propidium (IP), Interchim ; 1mg/l) est nécessaire. L'IP va pénétrer dans les cellules dont la membrane est lésée et se fixe à l'ADN et à l'ARN en le colorant. Les cellules marquées sont celles dont la membrane n'est plus intègre, ce sont les cellules mortes. Les résultats sont exprimés en % de mort cellulaire (Qing-Gang Xue et *al.*, 2001 ; Deniau, 2000 and Rosenthal et *al.*, 1986).

5.3. Evaluation de l'activité antivirale (anti HSV-1)

Afin de mettre en évidence et d'évaluer l'activité antivirale des différents extraits une suspension virale est préparé avec une multiplicité d'infection (MOI) de 0,01 ID₅₀/cellules, et un titre viral de 2x10^{6,2} ID₅₀/mL pour 350.000 cellules/ml.

➤ **Protocole**

La suspension cellulaire de 350.000 cellules/ml est distribuée dans chaque cupule d'une microplaque de 96 puits (100 µL). 50µl de différentes concentrations(500-5µl/mL) d'extrait ou 50µl de drogue de référence à différentes concentrations sont ajouté aux cellules. La microplaque est divisée en deux pour évaluer l'activité antivirale par la mesure de la concentration effective à 50% (EC₅₀), d'une part et pour évaluer la cytotoxicité par la mesure de la concentration cytotoxique à 50% (CC₅₀). Dans les cupules correspondant à l'évaluation de la CC₅₀ sont ajouté 50 µL de MEM 8%SVF. Dans les cupules correspondant à l'évaluation de l'activité antivirale sont ajouté 50 µL de suspension virale à la MOI de 0,01 ID₅₀/cellules. Une colonne témoin cellules est composée de 100µl de suspension cellulaire et de 100µl de milieu MEM 8%SVF. Une colonne témoin virus à la MOI de 0,01 ID₅₀/cellules est composée de 100µl de suspension cellulaire, 50µl de suspension virale et 50µl de milieu MEM 8%SVF (figure 7). Après 72 heures, correspondant à 3-4 cycles de multiplication virale, les tests sont arrêtés.

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	D1	D2	D3	D4	TV	TC
EC ₅₀	E1	E2	E3	E4	E5	E6	D1	D2	D3	D4	TV	TC
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	D1	D2	D3	D4	TV	TC
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	D1	D2	D3	D4	TV	TC
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	D1	D2	D3	D4	TV	TC
CC ₅₀	E1	E2	E3	E4	E5	E6	D1	D2	D3	D4	TV	TC
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	D1	D2	D3	D4	TV	TC
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	D1	D2	D3	D4	TV	TC

Figure 7 : Organisation de la microplaque pour les tests d'activité antivirale

E : Extrait testé à différentes concentrations ; D : Drogue de référence testée à différentes concentrations ; TV : Témoin virus ; TC : Témoin cellules.

➤ Lecture des résultats

Les tests d'activité anti-herpétique sont arrêtés et lus après coloration au rouge neutre selon la même méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité cytotoxique. Le pourcentage de destruction cellulaire due au virus peut être calculé :

$$\frac{(DO_{\text{témoin cellules}} - DO_{\text{cellules+virus}})}{DO_{\text{témoin cellules}}} \times 100$$

5.4. Evaluation des activités cellulaires

L'influence des substances sur l'activité cellulaire hémocytaire et vero est réalisée en cyotométrie en flux. La production d'enzymes hydrolytiques (aminopeptidase, estérase, production de radicaux libres), ainsi que les phénomènes de phagocytose, cycle cellulaire et d'apoptose ont été étudiée à la Station IFREMER de La Tremblade.

L'**activité estérase** a été testée en ajoutant un substrat de l'enzyme estérase aux cellules Véro en présence d'extrait. 10µl de substrat kit « cell probe fluoresceine diacetate (FDA).esterase » est ajouté à 200µl de cellules. Les échantillons sont placés dix minutes au noir puis les réactions sont arrêtées en plaçant les échantillons dans la glace. Le substrat liposoluble pénètre dans les cellules. Si les cellules possèdent l'enzyme estérase alors le complexe substrat plus enzyme émet une fluorescence. Ce complexe n'étant pas liposoluble, il reste emprisonné dans la cellule. La quantité d'enzyme présente dans les cellules peut alors

être mesurée par l'intensité de fluorescence émise. L'activité estérase des cellules est dite estérase plus.

L'**activité peroxydase** est déterminée de la même manière que l'activité estérase. Le kit « cell probe dichlorofluorescein diacetate, phorbol myristate acetate. Oxidative burst » est utilisé pour le dosage des peroxydases. La mesure de la fluorescence permet d'indiquer la production de H₂O₂ et donc la présence des peroxydases.

Afin de déterminer l'activité de **phagocytose**, 10µl de billes (fluorospheres carboxylate-modified yellow-green fluorescent, 2% solid, Interchim) sont introduits dans 500µl de cellules Véro en présence d'extrait. Les cellules émettent une fluorescence lorsque les billes sont phagocytées. Cette fluorescence correspond à l'isothiocyanate de fluoréscéine (FITC) porté par les billes. On obtient alors un pourcentage de billes phagocytées.

Résultats et Discussion

1. Rendement en protéines des différentes fractions

Le rendement en protéine a été calculé par poids sec de tissus (g) sur la concentration en protéines (g/ml) (Tableau 1).

Tableau 1 : Rendement en protéines (%)

Epoque	Pl.	Br	M	C	Ae
HIV.N	75,60	33,89	38,48	36,27	49,83
HIV.AJ	57,97	35,98	33,39	73,30	39,28
ETE.N	213,81	63,77	57,17	—	48,94
ETE.AJ	57,33	48,76	46,75	—	51,96

Afin de faciliter la lecture des différentes figures, tableaux et graphiques, des abréviations aux différents échantillons ont été affectées : Cœur (C) ; Manteau (M) ; Branchies (Br) ; Palpes labiaux (Pl) ; Animal entier (Ae) ; Hémolymphe (Hm) ; Nourri (N) ; A jeun (AJ).

_ Non mesuré

Un rendement constant est observé entre chaque extrait et d'une saison à l'autre à l'exception du lot ETE nourri, où l'on observe un rendement un peu plus élevé.

A part trois extraits, les extraits nourris ont un rendement plus élevé. Ces résultats semblent cohérents puisque ces animaux n'ont pas subi de jeun.

Les rendements sont reproductibles.

2. Activité cytotoxique des extraits

2.1. Cytotoxicité par cytométrie en flux

L'activité cytotoxique des différents extraits a été testée à 4 heures et à 72 heures de contact entre les cellules Vero et les substances issues des lots HIVER nourri, à-jeun, ETE nourri et à jeun.

L'analyse en cytométrie en flux nous donne une valeur de mortalité des cellules Vero témoin supérieur à 0%. En effet, le pourcentage de mortalité des cellules Vero marquée à l'IP est de 39% pour le lot à-jeun (AJ) après 4h de contact, 53% pour AJ après 72h de contact et de 29% pour le lot nourri (N) après 4h de contact (Tableau 2).

L'analyse en cytométrie en flux montre que pour les extraits de tissus d'huîtres adultes saines (manteau, branchies, palpes labiaux et cœur) issus des lots AJ et N, un effet positif sur les cellules Vero après 4 heures de contact. Le pourcentage de la mortalité des cellules Vero en présence des extraits est moins important que celui du témoin cellules. Deux hypothèses sont alors émises : il peut y avoir réduction de la mortalité cellulaire des cellules Vero en présence des extraits ou bien ces mêmes extraits favorisent la survie des cellules Vero et leur prolifération (Tableau 2). L'analyse du cycle cellulaire des hémocytes et des cellules Vero en présence d'extrait devrait nous permettre d'affiner et de comprendre davantage ces résultats.

Tableau 2 : Test en cytométrie en flux. Pourcentage de mortalité cellulaire face aux différents extraits d'huître, *Crassostrea gigas*, du lot HIVER-00

Extraits (concentration)	AJ 4h	AJ 72h	N 4h	N72h
<i>Cœur</i> (200µg/ml)	23%	—	8%	—
<i>Branchie</i> (400µg/ml)	21%	50%	11%	—
<i>Manteau</i> (200µg/ml)	26%	47%	—	—
<i>Palpe labial</i> (200µg/ml)	26%	54%	5%	—
<i>Témoin cellules</i>	39%	53%	29%	—
<i>Témoin positif (DMSO)</i>	95%	97%	89%	—

— : Non Mesuré

De plus, un effet dose-réponse est nettement observé après 72 heures de contact entre les cellules véro et trois extraits issus du manteau (figure 8), des branchies (figure 9) et du reste de l'animal entier (figure 10). Les tissus Branchies et Animal Entier montrent qu'à forte concentration le pourcentage de mortalité est nettement inférieur à celui du témoin cellules. Cependant l'extrait issu du manteau, possède un faible pourcentage de mortalité.

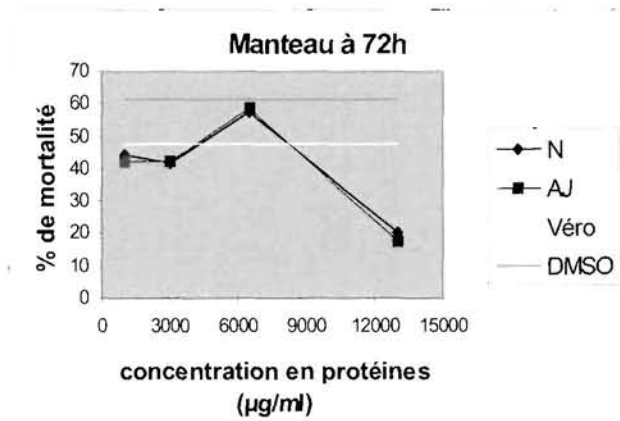


figure 8 : cytotoxicité du manteau

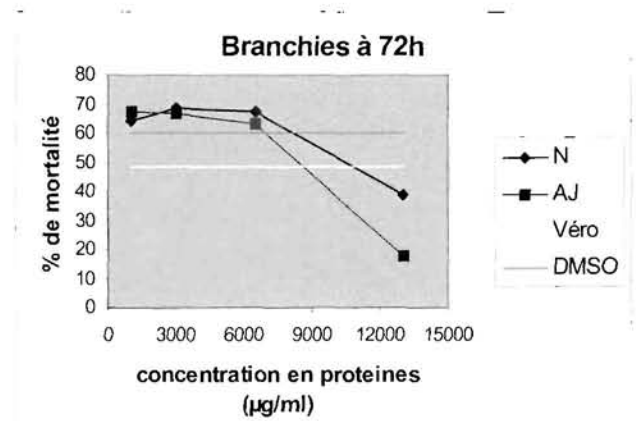


figure 9 : cytotoxicité des branchies

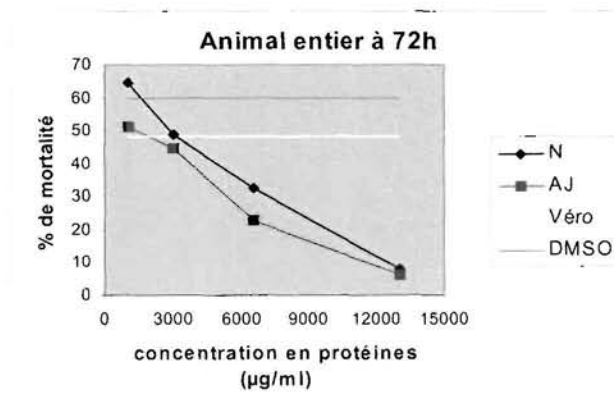


figure 10 : cytotoxicité de l'animal entier

2.2. Cytotoxicité et évaluation de l'activité antivirale par viabilité cellulaire au rouge neutre (RN)

L'évaluation de la cytotoxicité des extraits par viabilité cellulaire au bout de 72 heures de contact des cellules Vero a été menée sur les lots HIVER à-jeun (tableau 3, page 28), ETE à jeun (tableau 5, page 29) et nourri (tableau 4, page 29), en présence de virus HSV-1 avec une MOI de 0,01 ID₅₀/cellules et 2x10^{6,2} ID₅₀/mL.

Tableau 3 : Etude de la cytotoxicité et de l'activité antivirale de l'extrait animal entier

Concentrations	Animal entier					
	HIVER AJ		ETE AJ		ETE N	
	%D	%P	%D	%P	%D	%P
500	72	457	79	95	63	49
250	57	200	41	27	23	73
125	42	126	23	23	0	48
100	84	94	6	11	8	8
50	34	24	21	14	13	13
25	15	28	9	0	12	3
5	15	0	0	0	1	4

%D : % de destruction cellulaire. %P : % de protection vis à vis du virus HSV-1

Cet extrait, à forte concentration et pour les trois lots, est toxique, cependant, il semble stimuler le développement des cellules Vero. La concentration cytotoxique à 50% (CC₅₀) est observée à la concentration de 70 µg/mL de protéines pour le lot HIVER AJ. Alors que pour les deux lots ETE la CC₅₀ est de 300µg/mL. Le même diagnostic est observé pour l'activité antivirale à 50% (EC₅₀). En effet, pour 100µg/mL de protéines du lot HIVER AJ une protection maximale de 94% est notée avec une EC₅₀ de 75 µg/mL. Alors que pour les lots ETE le pourcentage de protection maximale est observé pour une valeur de 500 µg/mL avec une EC₅₀ de 300 µg/mL.

Tableau 4 : Etude de la cytotoxicité et de l'activité antivirale de l'extrait Branchie

Branchie						
Concentrations	HIVER AJ		ETE AJ		ETE N	
	%D	%P	%D	%P	%D	%P
500	100	8	75	213	79	143
250	41	32	55	40	26	68
125	9	18	14	12	13	72
100	3	22	18	5	0	15
50	12	0	2	9	0	6
25	6	4	7	0	0	0
5	16	45	1	0	0	24

%D : % de destruction cellulaire. %P : % de protection vis à vis du virus HSV-1

Pour les trois étudiés, cet extrait présente une CC₅₀ de 300 à 350 µg/mL. Cet extrait peu toxique, présente un pourcentage de protection maximale pour les deux lots ETE pour une concentration de 300 µg/mL.

Tableau 5 : Etude de la cytotoxicité et de l'activité antivirale de l'extrait Manteau

Manteau						
Concentrations	HIVER AJ		ETE AJ		ETE N	
	%D	%P	%D	%P	%D	%P
500	56	0	26	20	2	52
250	19	0	17	0	1	0
125	9	0	15	0	8	6
100	0	3	12	0	0	0
50	0	9	5	0	0	0
25	0	60	7	0	0	0
5	0	50	8	0	0	9

%D : % de destruction cellulaire. %P : % de protection vis à vis du virus HSV-1

La toxicité de cet extrait est faible et possède une CC₅₀ supérieure à 500µg/mL pour les trois lots. Cependant, les lots ETE ne présente aucune activité antivirale. Seules aux valeurs de 5 et 25 µg/mL pour le lot HIVER une protection maximale est observée. L'EC₅₀ est de 5 µg/mL.

Tableau 6 : Etude de la cytotoxicité et de l'activité antivirale de l'extrait Palpes Labiaux

Palpes Labiaux						
Concentrations	HIVER AJ		ETE AJ		ETE N	
	%D	%P	%D	%P	%D	%P
500	59	0	70	208	71	0
250	68	257	80	120	39	41
125	24	0	38	32	42	32
100	16	11	20	39	6	8
50	5	0	16	8	0	0
25	0	0	12	9	1	0
5	3	0	6	0	10	9

%D : % de destruction cellulaire. %P : % de protection vis à vis du virus HSV-1

La CC50 observée pour les trois lots est de 150 µg/mL. Cet extrait est donc peu toxique. De plus la protection maximale est observé pour une concentration de 250 µg/mL. L'EC50 est de 250 µg/mL ce qui est peu actif vis à vis du virus pour une faible concentration.

3. Evaluation de l'activité cellulaire

L'activité estérasiqye des cellules vero en présence d'extraits issus des lots HIVER N et AJ a été évalué à 4 heures et 72 heures de contact. Cette évaluation est effectuée en cytométrie en flux (figures 11, 12, 13 et 14)

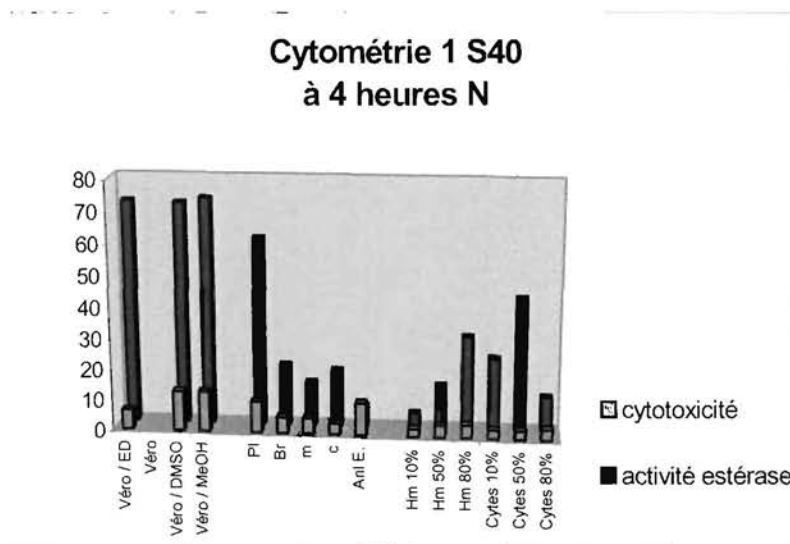


Figure 11 : activité estérasiqye à 4h sur le lot Hiver Nourri

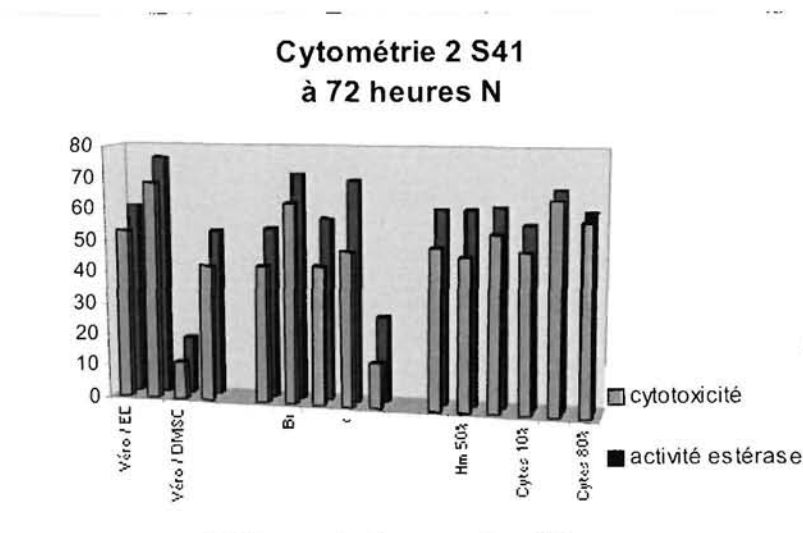


Figure 12 : activité estérasiqye à 72h sur le lot Hiver Nourri

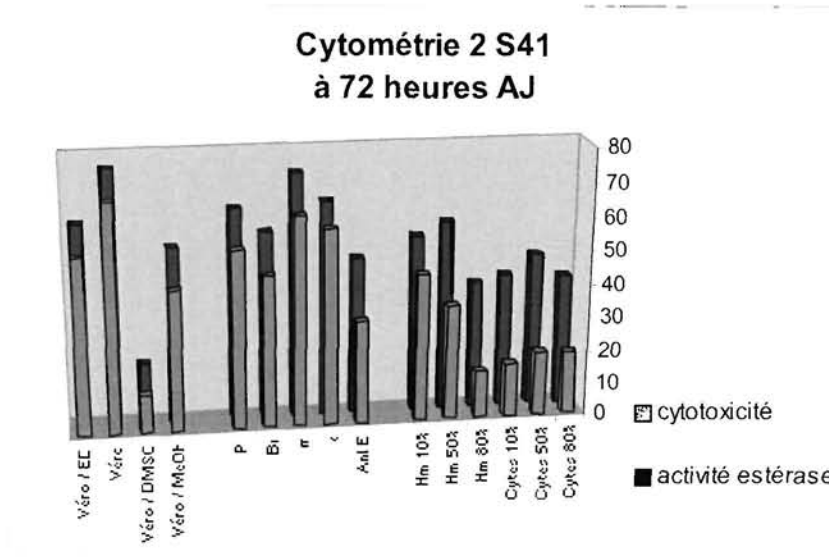


Figure 13 : activité estérasique à 72h sur le lot Hiver A Jeun

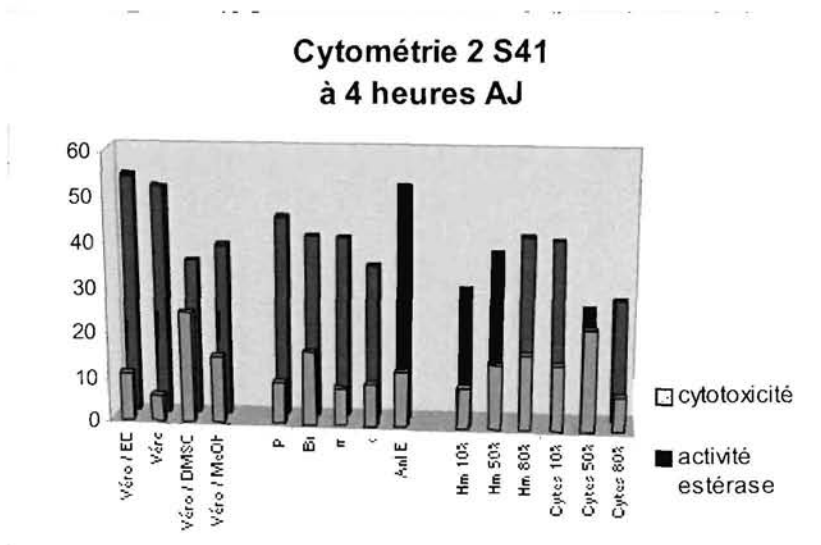


Figure 14 : activité estérasique à 4h sur le lot A Jeun

L'activité estérasique (en pourcentage) des cellules vero est toujours présente à 4 heures de contact avec les différents extraits. A 4 heures, les extraits sont peu cytotoxiques. A 72 heures la cytotoxicité est nettement plus élevée cependant l'activité estérasique des cellules vero est conservée avec les mêmes pourcentages.

Conclusion et perspectives

Les différentes techniques d'extractions ont été évaluées et les plus performantes ont été retenues pour le traitement de l'ensemble des échantillons.

Les résultats des tests de l'évaluation de l'activité antivirale vis à vis du virus *Herpes simplex de type* (HSV-1), mettent en évidence des fractions peptidiques présentant des activités cellulaires. L'activité antibactérienne des extraits issus de l'hémolymphe d'huître a été mis en évidence dans des travaux antérieurs, cependant nos extraits d'hémolymphe testé en cytométrie en flux montrent une cytotoxicité alors que les extraits issus de tissus peu cytotoxique semblent avoir une activité antivirale (anti HSV-1).

Ces résultats nous permettent d'être confiant quand au choix stratégique de recherche engagée. Cependant, il est important de confirmer et d'affiner ces premiers résultats. Ainsi, une étude de la cinétique de l'activité des extraits sélectionnés est en cours et parallèlement, la purification de ces extraits aussi.

Par la suite, une nouvelle étude en cytométrie en flux sur ces mêmes extraits purifiés est envisagée.

Ces premiers travaux seront présentés au congrès européen sur les biotechnologies marines les 12 et 13 mai 2002, à Nantes.

Bibliographie

Achour A., A. Lachgar, A. Astgen, V. Chams, B. Bizzini, H. Tapiero and D. Zagury. 1997. Potentialization of IL-2 effects on immune cells by oyster extract (JCOE) in normal and HIV-infected individuals. *Biomed and Pharmacother*, 51, 427-429.

Bachère E., D. Hervio, E. Mialhe and H. Grizel. Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. 1990. *Developmental and Comparative Immunology*, 14, 261-268.

Barnabé G.. *Aquaculture*. 1986. Lavoisier, 1 :1-424

Bourgougnon N.. Activité antivirale et antiprolifératrice *in vitro* du polysaccharide sulfaté de *Schizymenia dubyi* (Rhodophytes, Gigartinales). 1994. Mémoire de thèse de doctorat. Université de Nantes, Faculté de pharmacie.

Comps M. and N. Cochenec. 1993. A herpes-like virus from the european oyster *Ostrea edulis* L.. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62, 201-203.

Deniau S.. 2000. Essais de propagation *in vitro* de virus de type herpes infectant les mollusques bivalves marins et contribution à l'étude des interactions hôte-virus. Mémoire d'EPHE.

FAO. Statistiques de la production de l'aquaculture.1999. Circulaire sur les pêches N°815 révision 11 :3, 80-93.

Fleury Y., V. ouille, L. Béven, M. Amiche, H. Wroblewski, A. Delfour and P. Nicolas. Synthesis, antimicrobial activity and gene structure of a novel member of the dermaseptin B family. 1998. *Biochim. Biophys. Acta*, 1396 : 228-236.

Hu J.M. and G.D. Hsiung. Evaluation of new antiviral agents : I. *in vitro* perspectives. 1989. *Antiviral research*, 11, 217-232.

Hubert F., E.L. Cooper and P. Roch. Structure and differential target sensitivity of the dtimulable cytotoxic complex from hemolymph of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. 1997. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1361, 29-41.

Hubert F., W. Van Der Knaap, T. Noël and P. Roch. Cytotoxic and antibacterial properties of *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (bivalve molluscs) hemolymph. 1996. *Aquat. Living Resour.*, 9, 115-124.

Le Deuff R.M, J.L. Nicolas, T. Renault and N. Cochenec. Experimental transmission of a Herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. 1994. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 14(2), 69-72.

Le Deuff R.M. Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux *Iridoviridae* et aux *Herpesviridae*. 1995. Mémoire de thèse de doctorat. Université de Bordeaux II, U.F.R. de biochimie et de biologie cellulaire. Thèse N° 389.

Le Deuff R.M., T. Renault and N. Cochenec. Antibodies specific for channel catfish virus cross-react with pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Herpes-like virus. 1995. Vet. Res., 26, 526-529.

Le Deuff R.M., T. Renault and A. Gérard. 1996. Effect of temperature on Herpes-like virus detection among hatchery-reared larval pacific oyster *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Org., 24, 149-157.

Lee T.G. and S. Maruyama. Isolation of HIV-1 protease-inhibiting peptides from thermolysin hydrolysate of oyster proteins. 1998. Biochemical and Biophysical research communications, 253, 604-608.

Mattute B., K.B. Storey, F.C. Knoop and J.M. Conlon. Induction of synthesis of antimicrobial peptides in the skin of the freeze-tolerant frog, *Rana Sylvatica*, in response to environmental stimuli. 2000. Febs letters, 483 (2-3), 135-138.

Mitta G., F. Hubert, T. Noël and P. Roch. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. 1999. Eur. J. Biochem., 265, 71-78.

Nicolas J.L., M. Comps and N. Cochenec. Herpes-like virus infecting Pacific Oyster larvae, *Crassostrea gigas*. 1992. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12(1) : 11-13.

Quing-Gang-Xue, T. Renault and S. Chilmonczyk. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. 2001. Fish and shellfish immunology, 11, 557-567.

Renault T., R.M. Le Deuff, N. Cochenec and P. Maffart. Herpes-viruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France- Comparative study. 1994. Revue Med. Vét., 145(10), 735-742.

Renault T., R.M. Le Deuff, B. Chollet, N. Cochenec and A. Gérard. 2000. Concomitant Herpes-like virus infection in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Dis. Aquat. Org., 42, 173-183.

Roch P., F. Hubert, W. Van Der Knaap and T. Noël. Present knowledge on the molecular basis of cytotoxicity, antibacterial activity and stress response in marine bivalves. 1996. Italian Journal of Zoology, 63, 311-316.

Sharpe P.T.. Methods of cell counting and assaying cell viability. 1988. In laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Methods of cell separation. Burdon R.H. and Van Kuippenberg P.H. Amsterdam, elsevier, 18,7-17.

Streissle G., S. Ishizaka and G. Hewlett. Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infection. 1981. Adv. Cell. Cult., 1, 67-90.

Wilson A.P.. Cytotoxicity and viability assays. 1986. In animal cell culture : a practical approach. Freshney R.I. Oxford, IRL press, 183-216.