



IUT La Rochelle
Dpt Génie Biologique
15, rue François de Vaux de Foletier
17026 La Rochelle

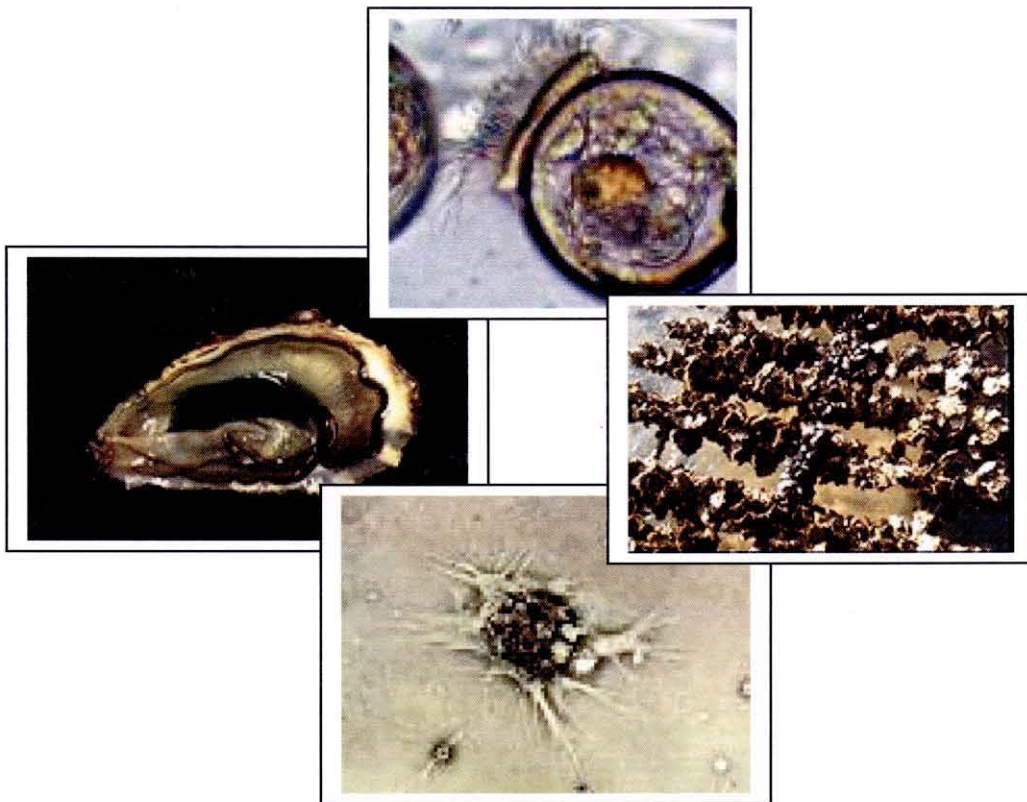


IFREMER, Laboratoire de
Génétique et Pathologie (LGP)
17390 La Tremblade

67101
EG20.COL.E

COLLAS Lucile

Institut Universitaire de Technologie de La Rochelle
Département Génie Biologique, 2^{ème} année
Option Analyses Biologiques et Biochimiques
Stage réalisé du 11 avril 2005 au 18 juin 2005



Essais de reproduction d'infection expérimentale à OsHV-1 (Oyster Herpesvirus 1) chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Responsable pédagogique

Mr Vincent Ridoux

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 02681

Année Universitaire 2004-2005

SOMMAIRE

I. Introduction	1
II. Rappels bibliographiques	3
<i>II.1 L'huître creuse, <u>Crassostrea gigas</u></i>	3
II.1.1 <u>Classification</u>	3
II.1.2 <u>Biologie</u>	3
II.1.3 <u>Mécanismes de défense chez les bivalves</u>	4
II.1.3.1 système circulatoire	4
II.1.3.2 Hémocytes	5
II.1.3.3 Mécanismes cellulaires de défense	5
II.1.3.4 Molécules à activité de défense	6
<i>II.2 Infections virales</i>	7
II.2.1 <u>Généralités</u>	7
II.2.2 <u>Pathologies virales rencontrées chez les bivalves marins</u>	7
II.2.3 <u>La famille des Herpèsvirus</u>	8
II.2.4 <u>OsHV-1 : un herpèsvirus infectant les bivalves</u>	9
III. Matériel et méthodes	10
<i>III.1 Animaux</i>	10
<i>III.2 Traitement des animaux, effet de la température, de l'anesthésie et de l'injection</i>	10
<i>III.3 Prélèvement des hémocytes</i>	10
<i>III.4 Préparation d'un broyat de naissain infecté (source de virus)</i>	11

<i>III.5 Essais d'infections d'animaux <u>in vivo</u></i>	11
<i>III.6 Essais d'infection d'hémocytes <u>in vitro</u></i>	11
<i>III.7 Analyses moléculaires</i>	12
III.7.1 <u>Extraction d'ARN à partir d'hémocytes</u>	12
III.7.2 <u>Recherche d'ADN viral par PCR</u>	12
III.7.3 <u>Recherche d'ARN viraux par RT-PCR</u>	12
III.7.4 <u>Analyse électrophorétique</u>	13
IV. Résultats	14
<i>IV.1 Recherche d'ADN et d'ARN viraux dans différents échantillons d'hémocytes</i>	14
IV.1.1 <u>Quantification et contrôle des ARN</u>	14
IV.1.2 <u>Recherche d'ADN viral par PCR</u>	14
IV.1.3 <u>Recherche d'ARN viral par RT-PCR</u>	14
<i>IV.2 Effets de la température, de l'anesthésie et de l'injection d'eau de mer sur les huîtres</i>	16
IV.2.1 <u>Température</u>	16
IV.2.2 <u>Anesthésie et Injection d'eau de mer</u>	16
<i>IV.3 Contrôle de la présence de virus dans le broyat de naissain infecté préparé</i>	17
<i>IV.4 Essai d'infection d'animaux <u>in vivo</u></i>	17
IV.4.1 <u>Quantification et contrôle des ARN</u>	17
IV.4.2 <u>Recherche d'ADN viral par PCR</u>	19
IV.4.3 <u>Recherche d'ARN viral par RT-PCR</u>	20
<i>IV.5 Essai d'infection d'hémocytes <u>in vitro</u></i>	21

IV.5.1 <u>Quantification et contrôle des ARN</u>	21
IV.5.2 <u>Recherche d'ADN viral par analyse PCR</u>	22
IV.5.3 <u>Recherche d'ARN viral par RT-PCR</u>	23
V. Discussion	24
BIBLIOGRAPHIE	26
ANNEXES	32

I. Introduction

La conchyliculture représente à l'échelle mondiale et en France une activité dont les enjeux économiques sont majeurs. Les données émanant d'organisations internationales impliquées dans le développement de l'aquaculture mondiale telles que l'Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture (Food and Agriculture Organisation, FAO), l'Union européenne (UE) ou encore le Comité International pour l'Exploration de la Mer (CIEM) révèlent en particulier le rôle primordial occupé par la conchyliculture. Selon le Comité National de la Conchyliculture (CNC), la filière conchylicole française est notamment l'une des plus importantes au niveau mondial avec une production en 1999 de 200 000 tonnes, elle se place ainsi au cinquième rang mondial, après la Chine, les USA, le Japon et la Corée. La France est également le principal producteur d'huîtres en Europe avec un tonnage représentant 65,5% des coquillages produits.

Les espèces cultivées sont essentiellement représentées par des bivalves. L'ostréiculture française est caractérisée par la culture de deux espèces, l'huître plate, *Ostrea edulis*, et l'huître creuse ou huître japonaise, *Crassostrea gigas*. Cette dernière espèce représente 98% de la production ostréicole française, soit plus de 150000 tonnes par an (FAO, 2003 ; Gouletquer et Le Moine, 2003). Pour ces raisons, l'ostréiculture est considérée en France par les autorités privées et publiques comme une activité à soutenir en favorisant des travaux de recherche fondamentale et appliquée.

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

Les coquillages d'élevage sont sujets à différentes pathologies selon leur stade de développement et leur âge. Ainsi recense-t-on une forte proportion de maladies associées à des protozoaires chez les animaux adultes, contrairement aux larves et juvéniles qui sont principalement sujets aux infections d'origine virale ou bactérienne. En France, des mortalités massives rapportées à partir de 1967, dans le bassin de Marennes-Oléron (Charente Maritime) chez l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, ont été associées à des virus apparentés à la famille des *Iridoviridae* (Comps *et al.*, 1976). Ces mortalités ont entraîné la disparition de l'espèce le long du littoral français en 1973. Des virus présentant une morphologie similaire à celle des virus de la famille des *Herpesviridae* ont été mis en évidence, pour la première fois en 1972, chez l'huître américaine, *C. virginica* (Farley *et al.*, 1972). Ce type de virus a été par la suite décrit chez plusieurs espèces de bivalves marins dans le monde (Hine *et al.*, 1992 ; Nicolas *et al.*, 1992 ; Renault *et al.*, 1994 ; Renault, 1998 ; Renault *et al.*, 2000 ; Renault *et al.*, 2001). Ainsi depuis 1991, de fortes mortalités de larves et de juvéniles ont été observées en France chez plusieurs espèces d'huître, *C. gigas* et *Ostrea edulis* (Nicolas *et al.*, 1992 ; Comps et Cochenec, 1993 ; Renault *et al.*, 1994 ; Renault *et al.*, 2000) et en Nouvelle Zélande chez *Tiostrea chilensis* (Hine *et al.*, 1998). Ces mortalités ont été associées à la détection en microscopie électronique à transmission, de particules virales de type herpès et de lésions cellulaires importantes (Le Deuff, 1995 ; Renault *et al.*, 2000). La caractérisation du génome virale, la morphologie, la taille, la localisation intranucléaire et cytoplasmique, mais également la répllication virale et la structure de la nucléocapside du virus infectant les larves de *C. gigas* confirment l'appartenance de ce virus à la famille des *Herpesviridae* (Arzul et Renault, 2002). Le virus infectant les larves de *C. gigas* a été associé à cette famille en tant

que nouveau membre et a été nommé Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) (Minson *et al.*, 2000 ; Arzul et Renault, 2002 ; Davison *et al.*, 2005).

Bien que l'impact des pathologies virales en aquaculture soit important, les moyens de lutte restent limités. De plus, les connaissances sur l'immunité des invertébrés marins face aux infections virales sont peu nombreuses (Renault, 1998 ; Arzul *et al.*, 2001 ; Renault *et al.*, 2001). L'immunité non spécifique, constituant la première barrière de défense chez les vertébrés (Du Pasquier, 2001), représente la seule composante de l'immunité décrite à ce jour chez les bivalves marins (Salzet, 2001). Récemment, plusieurs études ont conduit à la caractérisation de peptides impliquées dans la réponse immunitaire des invertébrés (Mitta *et al.*, 1999 ; Amiche *et al.*, 2000 ; Isaacson *et al.*, 2002 ; Olicard, 2005) et à l'identification de gènes cellulaires viro-induits lors d'une infection virale (Renault, communication personnelle). En effet, chez l'huître creuse, dix gènes cellulaires ont été identifiés comme surexprimés en réponse à l'infection par OsHV-1 (Brunetière, 2004 ; Moreau, 2004). Ces gènes, s'ils ne peuvent être considérés comme des gènes de défense *sensu stricto*, apparaissent néanmoins comme impliqués dans les réponses de l'organisme vis à vis d'une infection virale. Dans le cadre d'un projet de recherche financé par l'Union Européenne (AVINSI), des travaux, basés sur la technique d'Hybridation Suppressive Soustractive (SSH), ont permis de mettre en évidence des gènes cellulaires viro-induits lors de l'infection par OsHV-1, chez l'huître creuse, *C.gigas*. Des hémocytes ont été mis en contact avec du matériel infecté, c'est à dire un broyat de larves infectées par le virus OsHV-1 et d'autres hémocytes avec un broyat de larves saines. Les ARN extraits de ces deux types d'hémocyte ont été analysés par SSH. Les hémocytes ont été choisis pour ces travaux, car ce sont des cellules faciles à prélever. Elles sont ponctionnées dans la cavité péricardique ou dans le sinus hémolympatique du muscle adducteur de l'huître. De plus, la très rare détection du virus dans ces cellules, en microscopie électronique, a permis de considérer ce type cellulaire comme non permissif à l'infection virale par OsHV-1. L'intérêt d'utiliser des cellules non permissives dans une approche basée sur la SSH était d'éviter d'identifier préférentiellement des gènes viraux. Cependant, des analyses préliminaires réalisées en PCR (Polymerase Chain Reaction) et en RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) réalisées au laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP, station IFREMER de La Tremblade, Charente Maritime) ont permis de détecter de l'ADN et de l'ARN viral dans les hémocytes. Ces résultats remettaient donc en cause l'hypothèse considérant les hémocytes d'huître creuse comme non permissifs à l'infection par OsHV-1.

Dans ce contexte, les objectifs du stage réalisé, ont été :

- de rechercher, dans un premier temps, par PCR et RT-PCR la présence de virus OsHV-1 dans les hémocytes d'huître creuse adultes provenant de différentes origines ;
- d'essayer d'infecter des hémocytes *in vitro* et de contrôler la présence de virus par des analyses en PCR et RT-PCR ;
- enfin de tenter d'infecter des animaux adultes, de prélever les hémocytes et de rechercher le virus également par PCR et RT-PCR.

II. Rappels bibliographiques

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

II.1.1 Classification

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est un mollusque bivalve. La classification de l'embranchement des mollusques s'est longtemps appuyée sur des critères morphologiques (charnière, coquille, structure palléale, etc.). Plus récemment, des études moléculaires principalement focalisées sur la relation de l'embranchement des mollusques avec d'autres phyla (Adamkewicz et al., 1997) ont conduit à repartir les espèces de cet embranchement en huit classes dont celle des bivalves. La classe des bivalves est constituée de six sous-classes : *Palaeotaxodonta*, *Cryptodonta*, *Pteriomorphia*, *Palaeoheterodonta*, *Heterodonta* et *Anomalodesmata*. Les huîtres appartiennent à la sous-classe des *Pteriomorphia* (Tableau 1).

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

Tableau 1: Taxonomie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

II.1.2 Biologie

L'huître est pourvue d'un muscle adducteur qui lui permet d'ouvrir ou de fermer ses deux valves. L'animal peut ainsi se protéger des prédateurs et maintenir sa coquille fermée hors de l'eau. Elle adhère au support par la valve gauche (ou valve concave). Le tissu conjonctif recouvrant le corps de l'huître est appelé le manteau. Celui-ci est constitué de deux lobes (droit et gauche), eux-mêmes bordés de trois feuillets. Le premier secrète le carbonate de calcium dont est faite la coquille. Le deuxième est un palpeur sensoriel, le troisième ménage une cavité palléale que les branchies séparent en une chambre inhalante et une chambre exhalante (Figure 1).

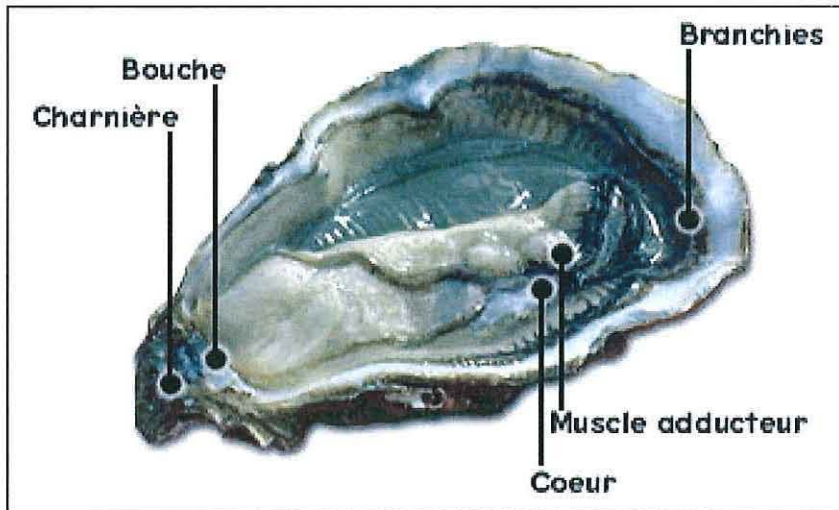


Figure 1 : Anatomie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

Le volume d'eau qui traverse l'animal permet d'assurer l'apport de nourriture, les échanges gazeux respiratoires et l'expulsion des déchets. La bouche est encadrée par quatre palpes labiaux foliacés et ciliés, qui sont situés sous la charnière antérieure (Beaumont et Cassier, 1990). Les bivalves sont des mollusques aquatiques microphages. L'huître pompe l'eau de mer pour capter les particules nécessaires à son alimentation (phytoplancton, bactéries, etc...), et l'oxygène nécessaire à sa respiration, elle filtre en moyenne 10 à 15 litres d'eau par heure.

II.1.3 Mécanismes de défense chez les bivalves

II.1.3.1 Système circulatoire

Les mollusques bivalves possèdent un système circulatoire de type semi-ouvert, comprenant un cœur, des vaisseaux et des sinus où circule l'hémolymphe (Cheng, 1981)

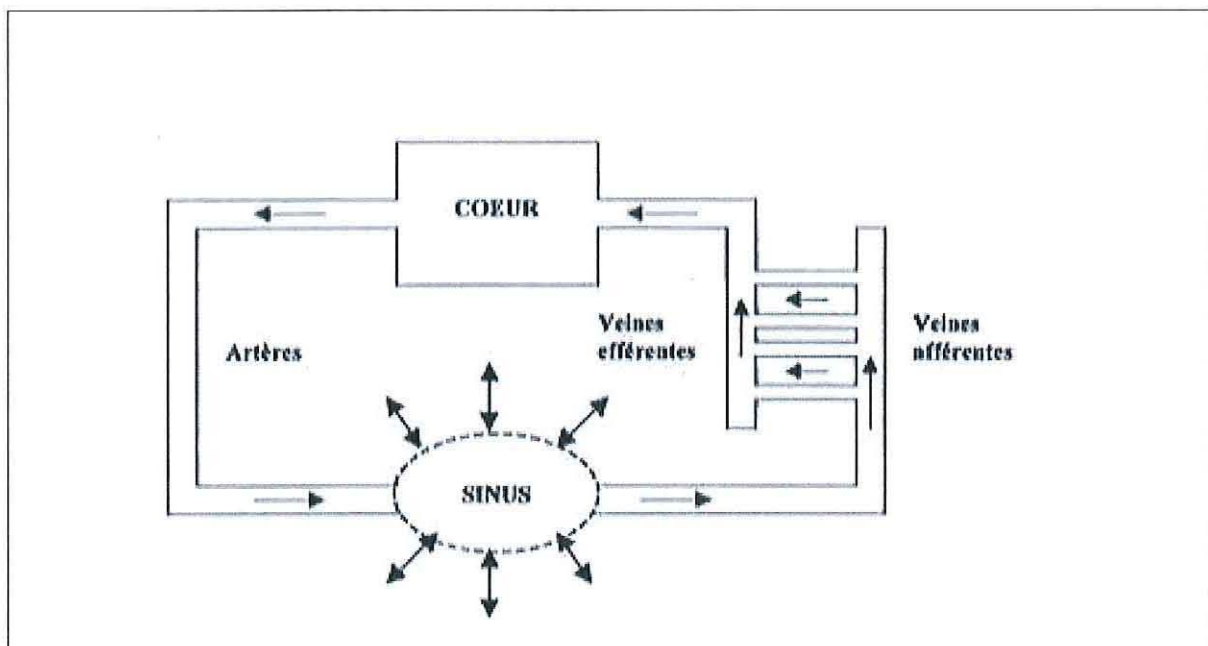


Figure 2 : Diagramme schématique représentant le système circulatoire de mollusques bivalves (modifié par Cheng, 1981).

II.1.3.2 Hémocytes

L'hémolymphe contient des cellules appelées hémocytes qui sont les supports de l'immunité chez les mollusques bivalves. Plusieurs populations hémocytaires ont été identifiées. Leur description varie suivant les auteurs, mais il semblerait qu'il existe deux types principaux d'hémocytes qui sont les hémocytes granuleux (Figure 4) (comprenant différents types de granulocytes) et les hémocytes agranuleux (Figure 5) (appelés « macrophages-like », hyalinocytes ou « monocytes-like »), (Auffret, 1985).

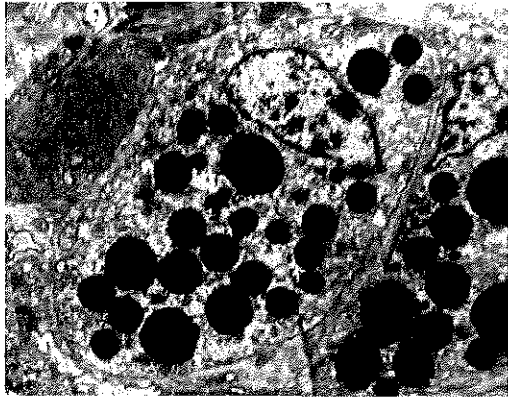


Figure 3 : Huître creuse, *Crassostrea gigas*, hémocyte granuleux, cliché de microscopie électronique.

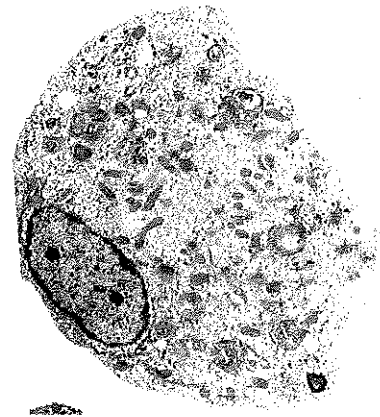


Figure 4 : Huître creuse, *Crassostrea gigas*, hémocyte agranuleux, cliché de microscopie électronique.

Les fonctions des différentes sous-populations hémocytaires sont encore mal connues, mais l'observation cellulaire des hémocytes montrent des différences structurales nettes laissant suspecter des fonctions différentes. Par exemple, les hyalinocytes présentent les caractéristiques de cellules peu différenciées. Les granulocytes possèdent des granules riches en enzymes. Toutes ces cellules présentent un équipement lysosomal (Auffret, 1985). Les hémocytes circulants ne semblent pas se multiplier dans l'hémolymphe, l'existence d'un ou de plusieurs sites d'hématopoïèse semble possible. Certains auteurs supposent l'existence d'un organe hématopoïétique particulier, d'autres considèrent que le tractus digestif pourrait intervenir comme centre d'hématopoïèse (Lorteau *et al.*, 1995 ; Xue, 1998). Aucune de ces hypothèses n'a été vérifiée à ce jour.

II.1.3.3 Mécanismes cellulaires de défense

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

d'hémolymphes et la pénétration de germes (Cheng, 1988a). Ils interviennent également dans le transport et la digestion des nutriments.

Par ailleurs, les hémocytes des mollusques bivalves peuvent phagocyter de nombreux micro-organismes et particules (parasites protozoaires, bactéries, levures, virus, globules rouges, protéines) (Auffret, 1985). Une fois phagocytées, les particules sont dégradées et les produits de dégradation peuvent être accumulés dans les vacuoles sous forme de pigments, comme la mélanine. La phagocytose peut être divisée en quatre étapes : attraction, adhérence, internalisation et destruction (Cheng et Rodrick, 1975 ; Cheng, 1983). Les trois premières phases reposent sur des capacités de locomotion, transformation et communication hémocytable. La quatrième phase est celle de la destruction.

Face à une infection virale, l'apoptose est une des principales réponses de l'hôte. Ce mécanisme permet d'éviter la dissémination des virus dans l'organisme. Ce phénomène intervient également lorsque des cellules ont été produites en excès ou de façon anormale. L'arrondissement des cellules, la condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN cellulaire ou encore des transformations cellulaires (bourgeoisement au niveau des membranes cellulaires) sont des caractéristiques de l'apoptose (Terahara *et al.*, 2003). Certains virus arrivent à détourner ce mécanisme de défense en leur faveur. En effet, ils utilisent l'apoptose pour persister dans l'organisme en l'induisant ou en l'inhibant (Cohen, 1994). Le phénomène d'induction est observé chez les virus de la famille des *Herpesviridae*, ou chez le VIH. Certains herpèsvirus sont en effet capables d'empêcher le processus de mort cellulaire programmée afin de se développer dans les cellules cibles aboutissant à l'élimination des lymphocytes.

II.1.3.4 Molécules à activité de défense

L'hémolymphes et/ou les tissus peuvent contenir différentes molécules jouant un rôle dans l'immunité chez les bivalves, comme des hydrolases lysosomales (Cheng, 1981 ; Gourdon *et al.*, 1998 ; Renault ; Xue, 2000, 2001) des lectines (Arason 1996), des cytokines (Janeway et Travers, 1997), la phénoloxydase (Söderhall, 1992 ; Smith et Söderhall, 1991 ; Luna-Gonzales *et al.*, 2003), des protéines de stress (Tirard *et al.*, 1997 ; Lacoste *et al.*, 2001) et des oxyde nitrique synthétases (Ottaviani *et al.*, 1993 ; Gourdon *et al.*, 1998).

On retrouve des molécules à activité anti-microbiennes chez un grand nombre d'invertébrés marins. D'après les travaux de Mitta *et al.*, (1999) des peptides anti-microbiens chez la moule sont synthétisés dans les hémocytes et stockés dans des granules, puis sont libérés dans l'hémolymphes après un contact avec des bactéries. Ces peptides sont aussi bien dirigés contre les bactéries que les champignons ou encore les levures.

Depuis les années 1970 et jusqu'au début des années 1980, aucun travail concernant les activités antivirales chez les invertébrés marins n'ont été rapportés. La recherche d'activités antivirales chez des ascidies ont abouti à l'identification de Didemines et d'Eudistomines, molécules antibactériennes et antivirales, notamment contre HSV-1 (Rinehart *et al.*, 1981 ; Kobayashi *et al.*, 1984). Par la suite, Azumi *et al.* (1990) ont isolé une Halocyanine issue d'hémocytes d'ascidies inhibant la croissance d'un rhabdovirus (nécrose hématopoïétique infectieuse : NHI) et un birnavirus (nécrose pancréatique infectieuse : NPI). Cette activité a été mise en évidence *in vitro* sur des cellules d'ovaire de truite. Le peptide Kahalalide E, présentant une activité anti-HSV-2, a été isolé à partir du mollusque *Elysia rufescens*, par Hamann *et al.* (1996). Tamamura *et al.* (1993) démontrent l'effet de la Tachypleusine issue d'hémocytes de limule, *Tachypleus tridentatus*, sur le virus VIH-1. Parallèlement Yasin *et al.* (2000) démontrent l'activité anti HSV-1 et HSV-2 de cette même

molécule. Récemment, Maier *et al.* (2001) décrivent deux molécules, les Liouvillosides A et B, issues de concombres de mer, *Straurocucumis liouvillei*, de nature glycosidique et présentant des activités virucides contre HSV-1 à de faibles concentration. En 1990, Bachère *et al.* ont mis en évidence *in vitro* une substance issue de sérum d'hémolymphe d'huître creuse, *C. gigas*, capable de neutraliser l'activité de coliphage T3. Cette activité serait due à une sérine protéase. Plus tard, Lee et Maruyama (1998) isolent à leur tour, un peptide issu d'un hydrolysate protéique d'huître, *C. gigas*, intervenant en tant qu'inhibiteur de la protéase du VIH-1.

II.2 Infections virales

II.2.1 Généralités

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

II.2.2 Pathologies virales rencontrées chez les bivalves marins

Parmi les maladies infectieuses observées chez les bivalves marins, les infections virales sont souvent mal connues en raison d'une certaine inadéquation des techniques de diagnostic (histologie) utilisés par les laboratoires impliqués dans l'étude des cas de mortalités anormales chez les coquillages. Les infections virales décrites chez les bivalves sont associées à des virus appartenant à différentes familles de virus (*Papovaviridae*, *Herpesviridae*, *Iridoviridae*, *Togaviridae*, *Retroviridae*, *Paramyxoviridae* et *Reoviridae*), (Farley, 1978 ; Matthews, 1982 ; Elston, 1997).

En France, diverses maladies infectieuses parmi lesquelles des épizooties d'origine virales ont marqué l'ostréiculture. Des mortalités massives ont été observées en 1967 chez l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, dans le bassin de Marennes-Oléron (Charente-Maritime, France). Elles ont gagné tout le territoire en 1968 et ont été rapportées jusqu'en 1970 (Alderman et Gras, 1969). Comps *et al.* (1976) ont alors montré que ces mortalités étaient associées à la détection d'un virus apparenté à la famille des *Iridoviridae* (Comps, 1970 ; Comps *et al.*, 1976 ; Comps et Bonami, 1977). Un second virus, a été associé à une nouvelle vague de mortalités de 1970 à 1973 conduisant à la disparition quasi totale de *C. angulata* sur le littoral atlantique français. Depuis 1975, l'ostréiculture française repose essentiellement sur l'exploitation de l'huître creuse, *C. gigas*, espèce de substitution de *C. angulata*. Cependant, apparemment moins sensible aux infections au virus de type iridovirus, elle ne semble pas être à l'abri d'infections virales et notamment par des virus de type herpes. La première infection à virus apparentés aux *Herpesviridae* touchant les bivalves marins a été décrite aux Etats-Unis, en 1972, chez l'huître américaine *C. virginica*. Depuis 1991, des mortalités massives associées à la détection de virus apparentés aux herpesvirus ont été à nouveau rapportées dans différentes régions du monde, chez plusieurs espèces de bivalves marins : *C. gigas*, *Ostrea edulis*, *Tiostrea chilensis*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* et *Pecten maximus*. Ces mortalités touchent principalement les stades larvaires et juvéniles et surviennent majoritairement en période estivale. Ceci démontre le caractère ubiquitaire de la

famille des *Herpesviridae* chez les bivalves marins dans la mesure où des particules de morphologie comparable à celle des herpesvirus ont été détectées chez différentes espèces de bivalves, à des stades de développement différents dans le monde entier.

II.2.3 Famille des Herpèsvirus

Les virus appartenant à la famille des *Herpesviridae* constituent les agents étiologiques de nombreuses maladies. Ils ont la faculté d'infecter un large spectre d'hôte : aussi bien les hommes, les mammifères, les oiseaux que les reptiles (Roizman *et al.*, 1992 ; Minson *et al.*, 2000) et récemment les mollusques bivalves (Renault, 1998 ; Arzul et Renault, 2002). Ce sont des virus à ADN double brin, enveloppés qui persistent de façon définitive dans l'hôte après une primo-infection. L'infection demeure sous forme latente, mais conduit à des réactivations qui correspondent à une reprise de la multiplication active du virus. Les herpèsvirus sont parmi les plus nombreux et les plus complexes de tous les virus (Roizman et Batterson, 1985). Leur spécificité d'hôte indique qu'ils ont évolué avec leur hôte durant de longues périodes (Davison, 2002).

Les différents virus de la famille des *Herpesviridae* présentent généralement quatre éléments de structure communs : un nucléoïde ou core contenant l'information génétique virale, une capside entourant le nucléoïde, un tégument et une enveloppe (Francki *et al.*, 1991) (Figure 7). La taille des particules virales matures est comprise entre 90 et 300 nm en fonction de l'épaisseur du tégument (Roizman et Batterson, 1985). L'information génétique des herpèsvirus est portée par un ADN double brin linéaire contenu dans le nucléoïde. La taille de cet ADN varie de 100 à 240 kpb et porte soixante-dix à deux cents gènes en fonction du virus considéré (Furlong *et al.*, 1972 ; Kieff et Shenk, 1998). La capside protéique de symétrie icosaédrique de 125 nm de diamètre environ est constituée par l'assemblage de 162 capsomères dont 12 pentamériques et 150 hexamériques (Minson *et al.*, 2000). Le tégument est contenu entre la capside et l'enveloppe virale, de façon asymétrique. Il correspond à une structure fibreuse composée de protéines spécifiques et dont la taille varie selon le type de virus (Roizman et Furlong, 1974). L'enveloppe de morphologie sphérique, dérive de la membrane du réticulum endoplasmique ou du Golgi de la cellule hôte. Elle est caractérisée par une double couche de phospholipides d'origine cellulaire et modifiée par l'insertion de protéines et de glycoprotéines virales. Elle est indispensable au pouvoir infectieux des particules virales et détermine la morphologie sphérique du virus.

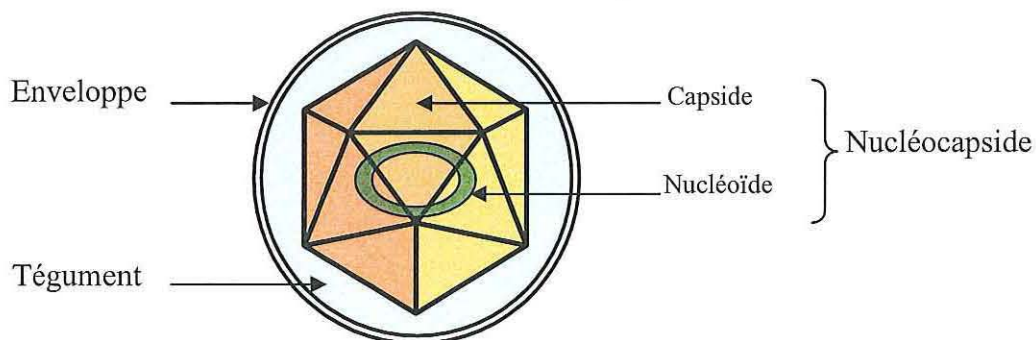


Figure 5 : Schéma représentant la structure générale d'une particule virale de type herpès (d'après RENAULT *et al.*, 1997)

Dans son hôte, lorsque les conditions sont favorables, le virus se multiplie induisant ainsi une lyse cellulaire. Le cycle viral aboutissant à la production de particules virales filles, se décompose en plusieurs étapes : pénétration du virus dans la cellule hôte, synthèses virales, réplication de l'ADN virale et assemblage et libération des particules virales filles. De plus, une des particularités des *Herpesviridae* réside dans leur capacité à persister sous forme latente pendant toute la vie de l'hôte, pour ainsi échapper à la réaction immunitaire. Dans ce cas, il n'y a pas de production de particules virales, mais le virus reste présent dans son hôte. Puis, la réactivation virale s'effectue sous l'influence de stimuli, permettant au virus de se multiplier et d'infecter de nouveaux individus.

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

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

Le génome du virus OsHV-1 est composé d'un ADN double brin linéaire de 207 kpb dont le pourcentage en G+C est de 39% (Arzul et Renault, 2002 ; Davison, 2002). La capsid, de symétrie icosaédrique, est un assemblage de 162 capsomères dont 12 pentamériques et 150 hexamériques (Arzul et Renault, 2002 ; Davison *et al.*, 2005). Cette structure est comparable à celle de HSV-1, virus de vertébrés de la sous-famille des alphaherpesvirus.

OsHV-1 est un nouveau membre de la famille des herpèsvirus. Il est le seul représentant décrit à ce jour chez les invertébrés. Cependant si OsHV-1 présente des homologies avec HSV-1 dans la structure et l'organisation de son génome, il n'en est pas de même quant aux séquences des gènes. En effet, seul un gène présentant des homologies avec une terminase est retrouvé chez OsHV-1 et les membres de la famille des *Herpesviridae*. La présence du gène codant une terminase ainsi que la structure de la capsid de symétrie icosaédrique issue d'assemblage de 162 capsomères, ont permis de conclure à l'appartenance de ce virus à la famille des *Herpesviridae*.

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

III. Matériel et méthodes

III.1 Animaux

Les expérimentations sont réalisées sur différents lots d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Les huîtres sont âgées de deux ans, de calibre 4-5 et d'origines différentes. Les huîtres proviennent :

- de l'écloserie de la station IFREMER La Tremblade (Charente-Maritime),
- de Bonne Anse (Charente-Maritime),
- d'un établissement ostréicole de La Tremblade (Charente-Maritime).

III.2 Traitement des animaux : effet de la température, de l'anesthésie et de l'injection

Des huîtres provenant d'un bassin extérieur des installations d'IFREMER La Tremblade à 18°C sont placés dans un aquarium à 23-24°C contenant 4L d'eau de mer. La mise en place d'un bullage permet l'oxygénation des aquariums. La mortalité est relevée quotidiennement.

Deux lots de 30 huîtres sont placés dans deux aquariums de 4L où l'eau est à une température de 23-24°C (lots Témoins). Cent-vingt huîtres du même lot sont mises en contact avec 250g de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) dans un mélange de 3L d'eau douce et 2L d'eau de mer, pendant une heure afin de les anesthésier. L'oxygénation du bac est assurée par un bullage. Après une heure passée dans les bacs à anesthésie, 30 ont leurs deux valves ouvertes, 50 μ L d'eau de mer stérile et filtrée à 0,22 μ m leur sont injecté, elles sont ensuite introduites dans un aquarium similaire aux autres. La mortalité est surveillée pendant une semaine tous les jours.

III.3 Prélèvement des hémocytes

L'huître est ouverte en effectuant un orifice à l'aide d'une pince dans la coquille au niveau du muscle adducteur. L'hémolymphe est ponctionnée dans le sinus hémolympatique du muscle adducteur en utilisant une seringue de 1 mL et une aiguille de 0,9*25 mm. Il est possible de prélever environ 1mL d'hémolymphe par huître. Celle-ci est ensuite récupérée et maintenue dans la glace afin d'éviter l'agrégation hémocytaire. Les prélèvements d'hémolymphe sont regroupés afin de limiter les variations inter-individuelles et centrifugés à 150g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est ensuite repris dans 1,5mL de Trizol et conservé à -20°C dans l'attente d'une extraction des ARN.

III.4 Préparation d'un broyat de naissain infecté (source de virus)

Cinq-cents mg de naissain issu d'un épisode de mortalité survenu au cours de l'été 2004 à l'écloserie IFREMER de La Tremblade (Charente-Maritime), conservé à -20°C et contrôlé comme positif par PCR est repris dans 300 μ L d'eau de mer filtrée et autoclavée, puis broyé à l'aide d'un Piston Pellet stérile jusqu'à obtenir un surnageant trouble. Le broyat est réalisé sur glace. Vingt-cinq mL d'eau de mer filtrée à 0,22 μ m et autoclavée sont ensuite ajoutés. Après une centrifugation (150g, 5 minutes à 4°C), le surnageant est récupéré, puis filtré à 0,45 μ m puis à 0,22 μ m. Des aliquots du surnageant non filtré et des surnageants filtrés (0,45 μ m et 0,22 μ m) sont prélevés et conservés à -20°C dans l'attente d'une analyse en PCR pour rechercher le virus OsHV-1.

III.5 Essais d'infections d'animaux in vivo

Des huîtres provenant d'un établissement ostréicole de La Tremblade sont anesthésiées avec 250g de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) dans un mélange de 3L d'eau douce et 2L d'eau de mer. Après trois heures d'anesthésie, les deux valves des huîtres sont ouvertes donnant accès à la cavité péricardique. Trente-deux huîtres sont inoculées avec 50 μ L d'eau de mer filtrée à 0,22 μ m, à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille de 0,9*25 mm dans la cavité péricardique (lot Témoin). Un inoculum de 50 μ L de broyat de naissain infecté préparé précédemment (cf. Chapitre III.4) est injecté à trente-cinq huîtres (lot infecté). Chaque lot est mis dans un aquarium contenant un volume de 4L d'eau de mer. Un bullage assure l'oxygénation des aquariums. La mortalité des animaux est relevée tous les jours. Les hémocytes de dix animaux de chaque lot sont prélevés (cf. Chapitre III.3) 24h, 48h et 72h après l'inoculation. Les expériences sont réalisées en duplicat (Annexe I).

III.6 Essais d'infection d'hémocytes in vitro

Les hémolymphes prélevées dans le sinus hémolympatique du muscle adducteur d'une centaine d'huîtres (provenant d'un établissement ostréicole de La Tremblade) sont regroupées, filtrée à 60 μ m afin d'enlever les débris et maintenues dans la glace pour éviter que les hémocytes ne s'agrègent. La concentration en hémocytes est déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez. L'hémolymphe est distribué dans douze fioles de culture cellulaire de 25cm² à raison de 12,5.10⁶ cellules par flasque et le contenu de chacune d'elles est observé au microscope inverse. Après une heure d'incubation à 15°C, un tapis cellulaire s'est formé au fond de la fiole. L'hémolymphe est alors retirée, filtrée à 0,22 μ m et stockée dans la glace. Un volume de 3 mL d'eau de mer filtrée à 0,22 μ m est ajouté dans six fioles « Témoins ». Un volume de 3 mL de broyat de naissain infecté, utilisé également pour les essais d'infection *in vivo* (Cf. Chapitre III.4) est ajouté dans les six autres fioles. Après une incubation de 1h30 à 23°C, l'eau de mer et le broyat de naissain infecté sont éliminés, et l'hémolymphe filtrée est redistribuée dans chaque fiole. Après une incubation de 4h et de 12h à 15°C, les hémocytes subissent deux lavages au PBS IX filtré et à 4°C avant d'extraire l'ARN au Trizol (Annexe II).

III.7 Analyses moléculaires

III.7.1 Extraction d'ARN à partir d'hémocytes

Les ARN des hémocytes sont extraits suivant le protocole du fournisseur Gibco BRL et le protocole développé au laboratoire (Annexes III, IV). C'est une technique basée sur l'utilisation d'un réactif contenant du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine appelé Trizol®. Les ARN sont quantifiés par spectrophotométrie (Photometer Eppendorf) et la qualité est analysée par électrophorèse en gel d'agarose (1%).

III.7.2 Recherche d'ADN viral par PCR

Lors de l'essai d'infection avec le broyat de naissain infecté, le virus OsHV-1 est recherché en PCR avec des amorces spécifiques. Trois couples d'amorces sont utilisés : OHV1/OHV2, Gp1/Gp2 et IAP1/IAP2. Le premier couple permet d'amplifier une zone codant deux protéines de fonction inconnue, le deuxième couple, un fragment du gène Gp codant pour une glycoprotéine putative et le troisième couple un fragment d'un gène codant pour une protéine virale ayant des homologues avec une protéine inhibitrice de l'apoptose.

La technique de "Polymerase Chain Reaction" ou PCR nécessite la préparation d'un mélange réactionnel composé pour chaque échantillon de 5µL de tampon, de MgCl₂, de dNTP, d'1µL de chaque amorce, de 0,5µL de Taq polymérase et de 31,5µL d'eau bidistillée. Quarante-neuf µL de mélange réactionnel est mélangé à 1µL d'échantillon, puis deux gouttes d'huile sont ajoutées pour éviter l'évaporation. Les échantillons sont ensuite placés dans un thermo-cycler (PTC-100, MJ Research.Inc) (une phase de deux minutes à 94°C, 35 cycles composés de trois phases d'une minute chacune respectivement à 94°C, 50°C et 72°C et enfin une de cinq minutes à 72°C). Les échantillons sont préalablement dilués avec de l'eau DEPC, la concentration d'ARN utilisée est de 200ng/µL pour les échantillons correspondant aux essais *in vivo* et de 100ng/µL pour les essais *in vitro*.

III.7.3 Recherche d'ARN viraux par RT-PCR

La RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) est la technique la plus sensible pour détecter et quantifier l'ARNm, actuellement disponible. Pour réaliser une RT-PCR, il faut commencer par extraire les ARN et les recopier *in vitro* en ADNc simple brin. La synthèse d'ADNc est catalysée par des transcriptases inverses (Reverse Transcriptase : RT). Cette enzyme est une ADN polymérase ARN dépendante, capable d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire. La synthèse du second brin d'ADNc ainsi que la PCR sont effectués dans un deuxième temps par la Taq polymérase. Les couples d'amorces utilisés sont les mêmes que ceux utilisés pour la PCR (Cf. Chapitre III.6.2).

Le kit « Access RT-PCR system » de Promega est utilisé pour réaliser la RT-PCR. Le mix réactionnel pour un échantillon est le suivant : 10µL de tampon, 1µL de dNTP, 2µL de MgSO₄, 1µL de chaque amorce, de transcriptase inverse et de polymérase et 32µL d'eau. Quarante-neuf µL de mix réactionnel sont mélangés à 1µL d'échantillon, puis deux gouttes d'huile sont ajoutées pour éviter l'évaporation. Les échantillons sont placés dans un thermo-cycler (PTC-100, MJ Research.Inc) (Figure 6). Les échantillons sont également dilués avec de l'eau DEPC, la concentration d'ARN utilisée est de 200ng/µL pour les échantillons correspondant aux essais *in vivo* et de 100ng/µL pour les essais *in vitro*.

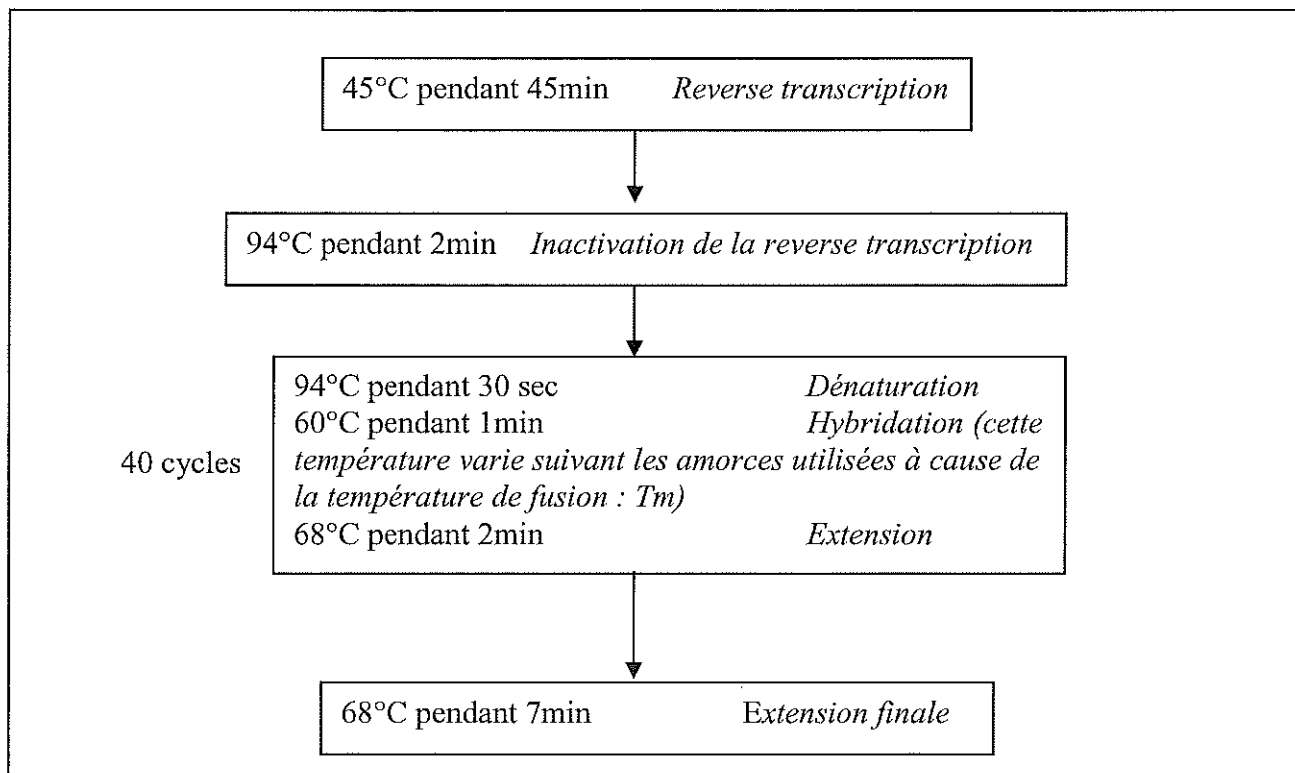


Figure 6 : Description des différentes étapes de la RT-PCR

III.7.4 Analyse électrophorétique

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

IV. Résultats

IV.1 Recherche d'ADN et d'ARN viraux dans différents échantillons d'hémocytes.

Différents lots d'huîtres ont donc été utilisés :

- un lot provenant de l'écloserie de la station IFREMER La Tremblade,
- un lot provenant de Bonne Anse
- un lot d'un établissement ostréicole de La Tremblade.

IV.1.1 Quantification et contrôle des ARN

Les concentrations d'ARN extrait sont comprises entre 713,0 μ g/mL et 993,4 μ g/mL. Des concentrations élevées sont observées pour chaque échantillon d'ARN obtenu que se soit avec le protocole du fournisseur Gibco BRL ou avec le protocole développé en laboratoire (protocole LGP). Cependant, l'utilisation de ce dernier donne des concentrations plus faibles mais acceptables. Les rapports r sont supérieurs à 1,60 compris entre 1,60 et 1,66 ; ils sont équivalents quel que soit le protocole utilisé (Tableau 2).

Le contrôle de la qualité de l'ARN extrait sur gel d'agarose (1%) démontre la présence d'ARN à 1000pb pour les deux protocoles utilisés et quelque soit l'origine des échantillons (Figure 7).

	Concentration des ARN en μ g/mL	Rapport $r = A_{\lambda=260nm} / A_{\lambda=280nm}$ $r > 1,60$
Lot IFREMER : protocole Gibco	801,7	1,64
Lot IFREMER : protocole LGP	736,7	1,62
Lot Bonne Anse: protocole Gibco	848,9	1,60
Lot Bonne Anse: protocole LGP	713,0	1,65
Lot C-M : protocole Gibco	993,4	1,66
Lot C-M: protocole LGP	719,9	1,66

Tableau 2 : Concentration en ARN dans les échantillons : méthode spectrophotométrique ; Protocole LGP : protocole développé au laboratoire ; lot IFREMER : lot provenant de l'écloserie de la station IFREMER La Tremblade ; lot C-M : lot provenant d'un établissement ostréicole de La Tremblade (Charente-Maritime).

IV.1.2 Recherche d'ADN viral par PCR

La recherche d'ADN par analyse PCR n'a pas permis la détection de bande de taille attendue pour tous les échantillons traités quel que soit le couple d'amorces utilisé. Le Témoin positif (ADN viral extrait de particules purifiées) a permis une amplification avec les couples d'amorces OHV1/OHV2, Gp1/Gp2 mais aucune amplification de ce témoin n'est observé avec le couple d'amorces IAP1/IAP2 (Tableau 3).

IV.1.3 Recherche d'ARN viral par RT-PCR

Pour la recherche d'ARN viraux, aucune bande de taille attendue n'a été observée à partir des échantillons traités en RT-PCR. Mais dans ce cas, aucune amplification n'est observée avec les couples d'amorces Gp1/Gp2 et IAP1/IAP2 pour le témoin positif (Tableau 3 ; Figure 8).

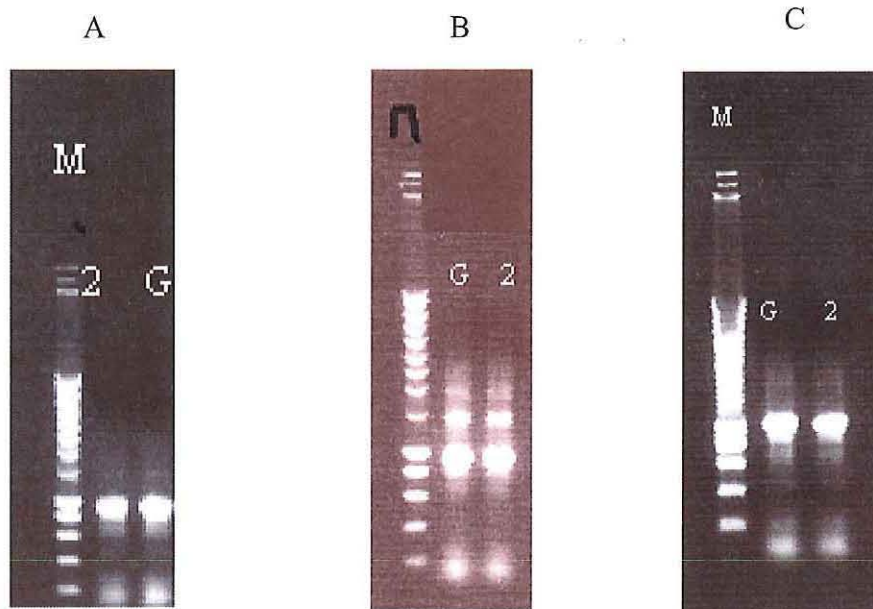


Figure 7 : Contrôle qualité des ARN extraits sur gel d'agarose ; M : Marqueur à 200pb du fournisseur eurogentec ; G : extraction avec le protocole Gibco ; 2 : extraction avec le protocole développé en laboratoire ; A : Echantillons de l'écloserie d'IFREMER La Tremblade ; B : Echantillons de Bonne Anse ; C : Echantillons de l'établissement ostréicole de La Tremblade.

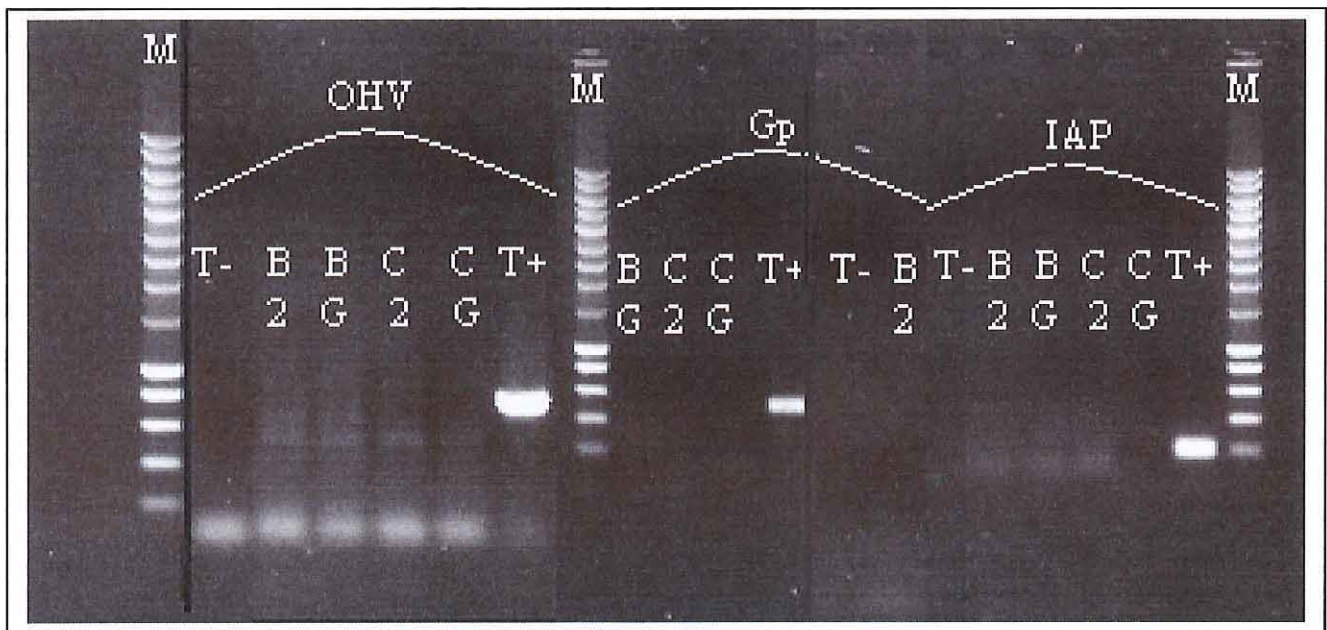


Figure 8 : Résultats sur gel de la RT-PCR des échantillons de Bonne Anse et de l'établissement ostréicole de La Tremblade. M : Marqueur à 200pb eurogentec ; B : Echantillons de Bonne Anse ; C : Echantillons de l'établissement ostréicole de La Tremblade ; G : extraction avec le protocole Gibco ; 2 : extraction avec le protocole développé au laboratoire ; T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif.

Nom échantillons Couples d'amorces	Lot IFREMER		Lot Bonne Anse		Lot La Tremblade		Témoin positif (ADN viral extrait de particules purifiées)	
	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR
OHV1/OHV2	-	-	-	-	-	-	+	+
Gp1/Gp2	-	-	-	-	-	-	+	-
IAP1/IAP2	-	-	-	-	-	-	-	-

- : absence de bande de taille attendue
+ : présence de bande de taille attendue

Tableau 3 : Détection d'ADN et d'ARN viraux dans différents lots d'huîtres par PCR et RT-PCR

IV.2 Effets de la température, de l'anesthésie et de l'injection d'eau de mer sur les huîtres

IV.2.1 Température

Une expérience préliminaire a été réalisée afin d'étudier l'effet d'un changement soudain de température sur des huîtres creuses, adultes. La mortalité est relevée quotidiennement.

En neuf jours, trois huîtres sont mortes sur un total de 30 (10%) (Tableau 4).

Temps	Mortalité
24h	1
48h	0
5 jours	0
6 jours	1
7 jours	0
8 jours	1
9 jours	0
Total: 3 huîtres mortes sur 30	

Tableau 4 : Effets d'un changement de température sur un lot d'huîtres

IV.2.2 Anesthésie et Injection d'eau de mer

Une seconde expérience a permis d'étudier les effets d'une anesthésie et d'une injection d'eau de mer. La mortalité est surveillée tous les jours : à 24h, 48h, et à 72h. Dans les lots Témoins, une mortalité de 3% est observé (une huître sur 30 est morte). La mortalité dans le lot anesthésié et inoculé est de 10%, 3 huîtres mortes sur 30 au total (Tableau 5).

	Mortalité au bout de 24h	Mortalité au bout de 48h	Mortalité au bout de 72h	Mortalité cumulée
Lot Témoin 1	0	1	0	1 huître morte sur 30
Lot Témoin 2	0	0	1	1 huître morte sur 30
Lot anesthésié et inoculé 4	0	2	1	3 huîtres mortes sur 30

Tableau 5 : Effet sur la mortalité des huîtres de l'anesthésie et de l'injection d'eau de mer filtrée à 0,22µm

IV.3 Contrôle de la présence de virus dans le broyat de naissain infecté

Après avoir broyé le naissain, les surnageants sont analysés par PCR en utilisant les couples d'amorces OHV1/OHV2, Gp1/Gp2 et IAP1/IAP2. Des bandes de taille attendue sont détectées dans les surnageants de broyat avant filtration et après filtration (Figure 9).

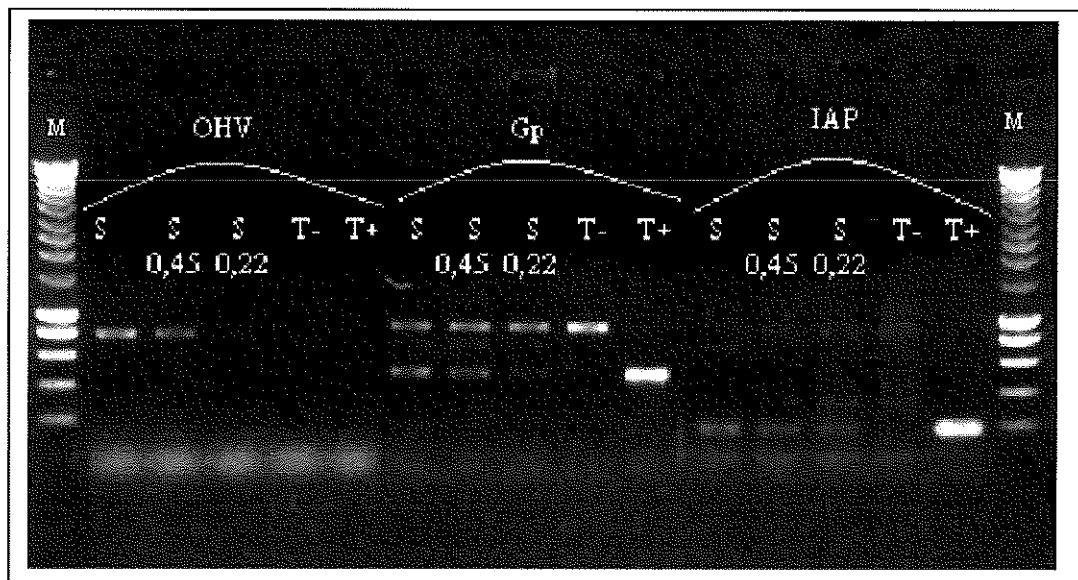


Figure 9 : Contrôle de la présence de virus OsHV-1 dans les surnageants non filtrés et filtrés (0,45 et 0,22µm) du broyat de naissain infecté ; M : Marqueur à 200 pb eurogentec ; S : Surnageant ; S_{0,45} : Surnageant filtré à 0,45 ; S_{0,22} : Surnageant filtré à 0,22 ; T- : Témoin négatif ; T+ : Témoin positif.

IV.4 Essai d'infection d'animaux *in vivo*

IV.4.1 Quantification et contrôle des ARN

Après extraction des ARN à partir d'hémocytes d'animaux infectés ou non, les ARN sont quantifiés et la qualité est analysée sur gel d'agarose (1%). Les concentrations d'ARN sont comprises entre 622,6µg/mL et 8513,9µg/mL ; Les concentrations pour les lots « Virus » sont supérieures aux valeurs obtenues pour les lots « Témoin ». Les rapports, r, sont tous supérieurs à 1,60 (Tableau 6).

En électrophorèse, une bande à 1000pb, d'intensité variable, est observée pour chaque échantillon (Figure 10).

	Concentration des ARN en $\mu\text{g/mL}$	Rapport $r = A_{\lambda=260\text{nm}} / A_{\lambda=280\text{nm}}$ $r > 1,60$
24h :Témoïn 1	1237,0	1,61
24h : Virus 1	1692,7	1,72
48h :Témoïn 1	1442,5	1,77
48h : Virus 1	2171,8	1,81
72h :Témoïn 1	1240,7	1,60
72h : Virus 1	2271,8	1,73
24h :Témoïn 2	622,6	1,83
24h : Virus 2	1509,5	1,76
48h : Témoïn 2	1885,6	1,61
48h : Virus 2	2587,3	1,79
72h : Témoïn 2	8513,9	1,87
72h : Virus 2	1887,9	1,67

Tableau 6 : Concentration en ARN dans les échantillons : méthode spectrophotométrique

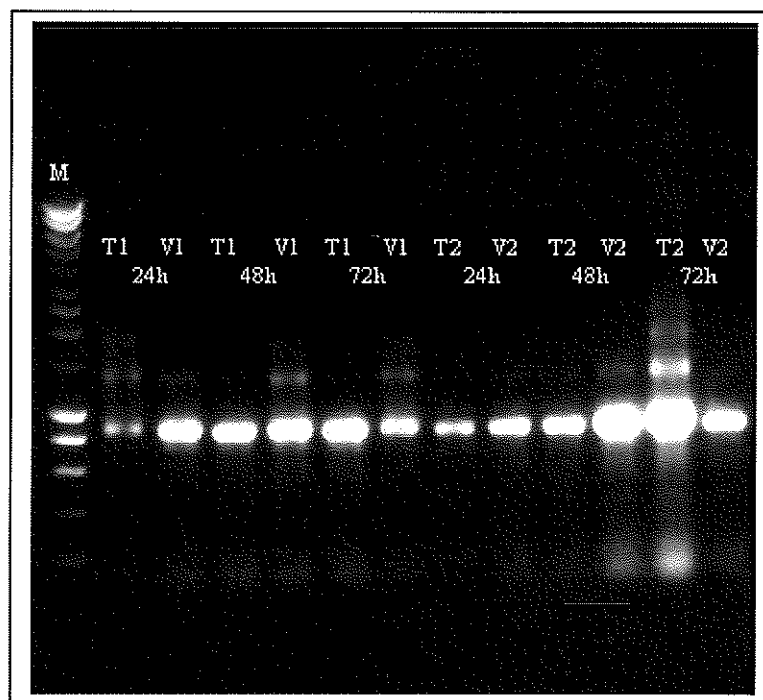


Figure 10 : Contrôle de la qualité des ARN : électrophorèse sur gel d'agarose à 1% ; M : Marqueur à 200pb eurogentec ; T : lot « Témoïn » ; V : lot infecté par le virus ; 1 : premier essai ; 2 : second essai.

IV.4.2 Recherche d'ADN viral par PCR

Pour tous les échantillons, quel que soit le couple d'amorces utilisé (OHV1/OHV2, Gp1/Gp2, IAP1/IAP2), aucune bande de taille attendue n'est observée en gel d'agarose. L'amplification du Témoin positif permet d'obtenir pour les trois couples d'amorces, une bande de taille attendue (Figures 11 et 12) .

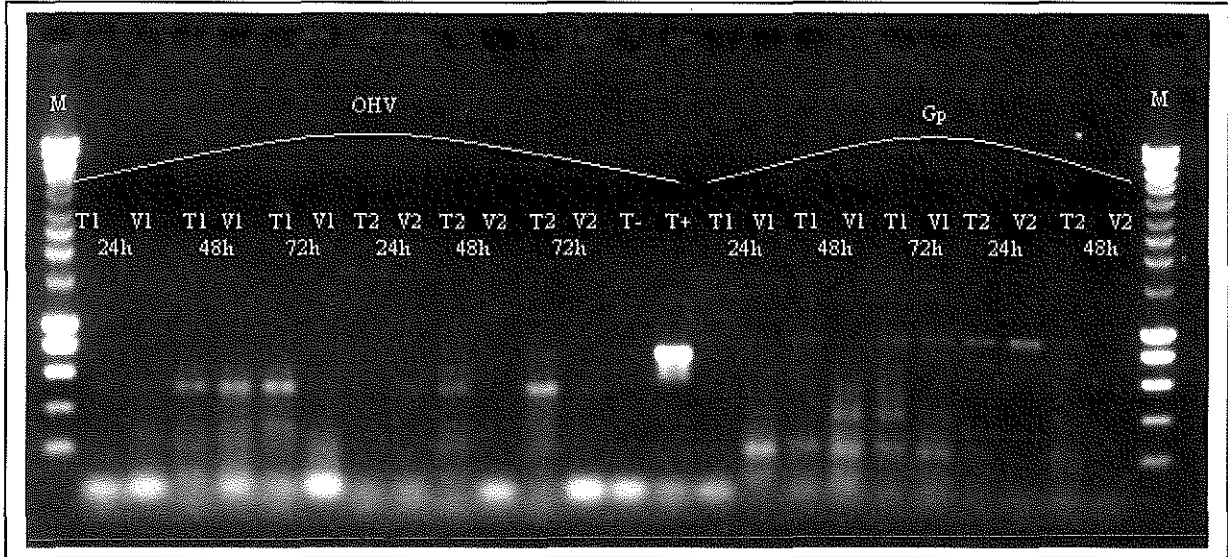


Figure 11 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits de PCR des échantillons d'essais d'infection *in vivo* ; M : Marqueur à 200pb eurogentec ; T1 24h : échantillon du lot Témoin 1, 24h après injection ; V2 48h : échantillon du lot « Virus » 2, 48h après injection.

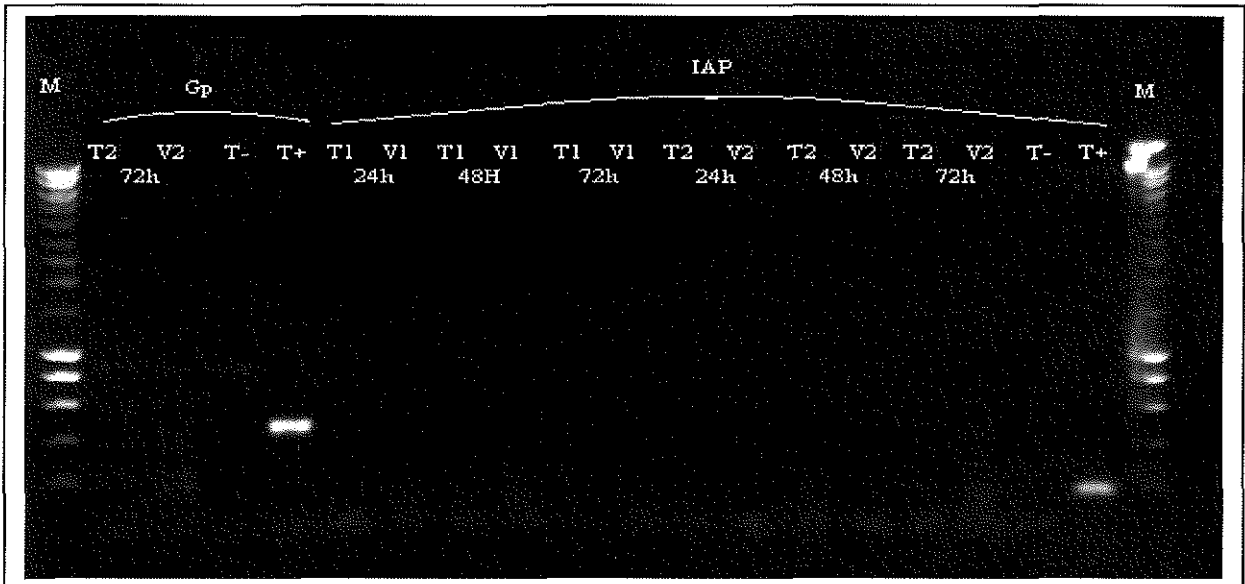


Figure 12 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits de PCR des échantillons d'essais d'infection *in vivo* ; M : Marqueur à 200pb du fournisseur eurogentec ; T1 24h : échantillon du lot Témoin 1, 24h après injection ; V2 48h : échantillon du lot « Virus » 2, 48h après injection.

IV.4.3 Recherche d'ARN viral par RT-PCR

Quel que soit les échantillons, aucune bande de taille attendue n'est observée en gel d'agarose (1%). Une amplification de taille attendue est observable pour le Témoin positif pour les trois couples d'amorces utilisés (Figures 13 et 14).

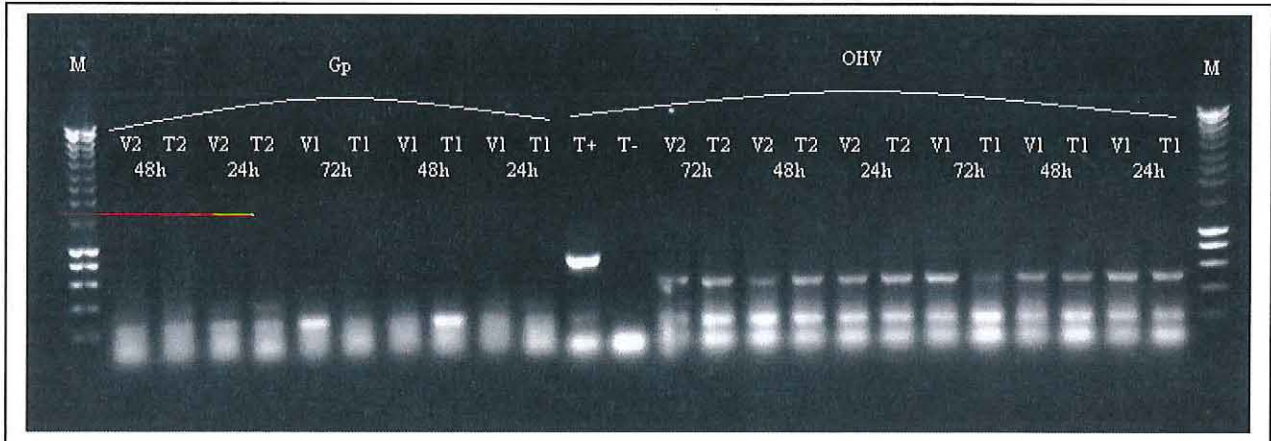


Figure 13 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits de RT-PCR des échantillons d'essais d'infection *in vivo* ; M : Marqueur à 200pb eurogentec ; T1 24h : échantillon du lot Témoin 1, 24h après injection ; V2 48h : échantillon du lot « Virus » 2, 48h après injection.

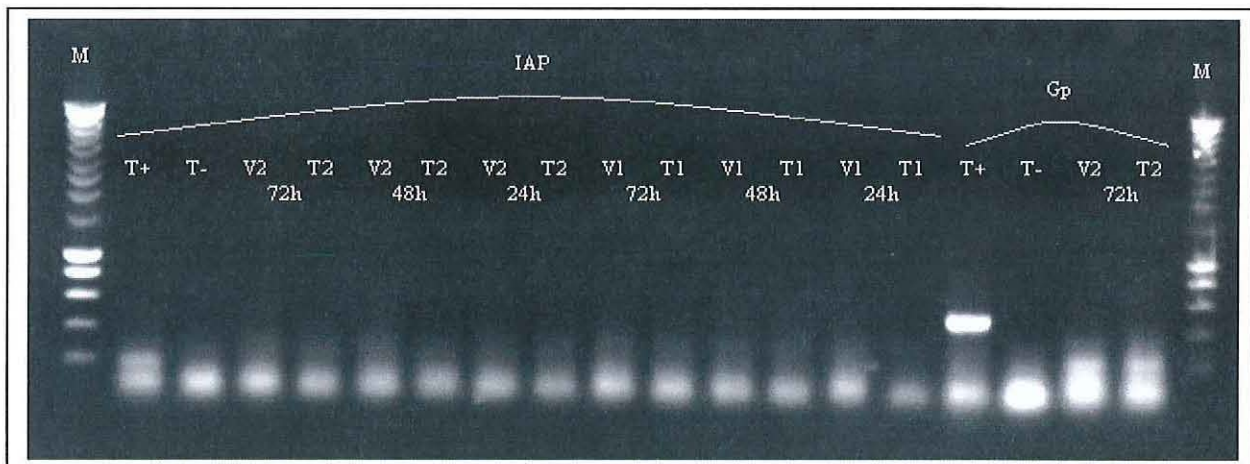


Figure 14 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits de RT-PCR des échantillons d'essais d'infection *in vivo* ; M : Marqueur à 200pb eurogentec ; T1 24h : échantillon du lot Témoin 1, 24h après injection ; V2 48h : échantillon du lot « Virus » 2, 48h après injection.

IV.5 Essai d'infection d'hémocytes *in vitro*

IV.5.1 Quantification et contrôle des ARN

Après avoir extrait les ARN des hémocytes ayant été mis en contact avec du broyat de naissain infecté ou non, les échantillons d'ARN sont quantifiés par spectrophotométrie, les concentrations varient entre 202,5µg/mL et 2114,1µg/mL, les rapports sont compris entre 1,41 et 1,89 (Tableau 7). L'analyse sur gel d'agarose (1%) permet d'observer une bande à 1000pb de faible intensité pour chaque échantillon (Figure15).

	Concentration d'ARN en µg/mL	Rapport $r = A_{\lambda=260nm} / A_{\lambda=280nm}$ $r > 1,60$
4h :Témoïn 1	655,9	1,53
4h : Virus 1	335,9	1,89
4h :Témoïn 2	376,7	1,80
4h : Virus 2	483,3	1,54
4h :Témoïn 3	392,2	1,59
4h : Virus 3	438,0	1,48
12h :Témoïn 4	351,9	1,64
12h : Virus 4	2114,1	1,43
12h : Témoïn 5	226,8	1,41
12h : Virus 5	202,5	1,50
12h : Témoïn 6	223,6	1,56
12h : Virus 6	225,5	1,67

Tableau 7 : Concentration en ARN dans les échantillons : méthode spectrophotométrique

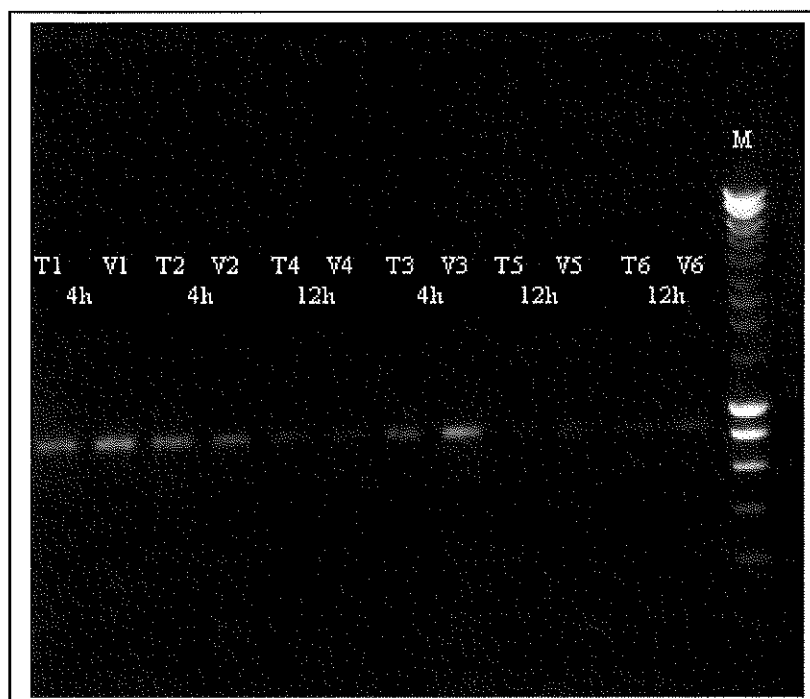


Figure 15 : contrôle de la qualité des ARN extraits sur gel d'agarose (1%) ; M : Marqueur à 200pb eurogentec ; T1 4h : échantillon du lot Témoïn 1 après 4h d'incubation ; V2 12h : échantillon du lot Virus 2 après 12h d'incubation.

IV.5.2 Recherche d'ADN viral par analyse PCR

L'analyse PCR ne montre aucune bande de taille attendue pour l'ensemble des échantillons testés (hémocytes au contact d'un broyat de naissain infecté pendant 4h ou 12h). Une bande de taille attendue est observée pour le Témoin positif, constitué d'ADN viral extrait de particules purifiées, pour l'ensemble des trois couples d'amorces utilisés (Figures 16 et 17).

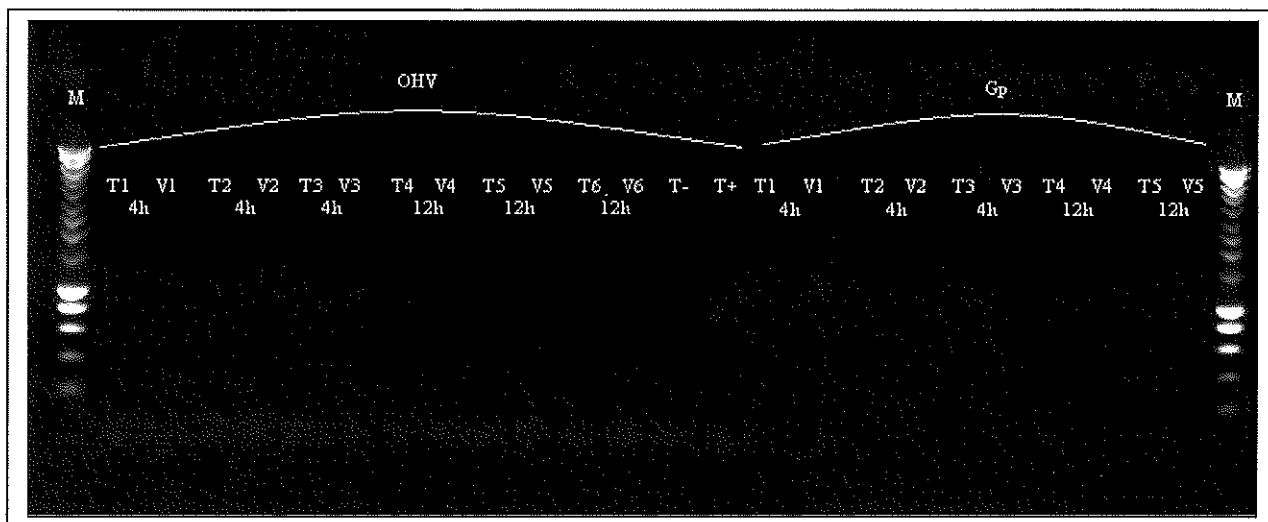


Figure 16 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits de PCR des échantillons d'essais d'infection d'hémocytes *in vitro* ; M : Marqueur à 200pb eurogentec ; T1 4h : échantillon du lot Témoin 1 après 4h d'incubation ; V2 12h : échantillon du lot Virus 2 après 12h d'incubation.

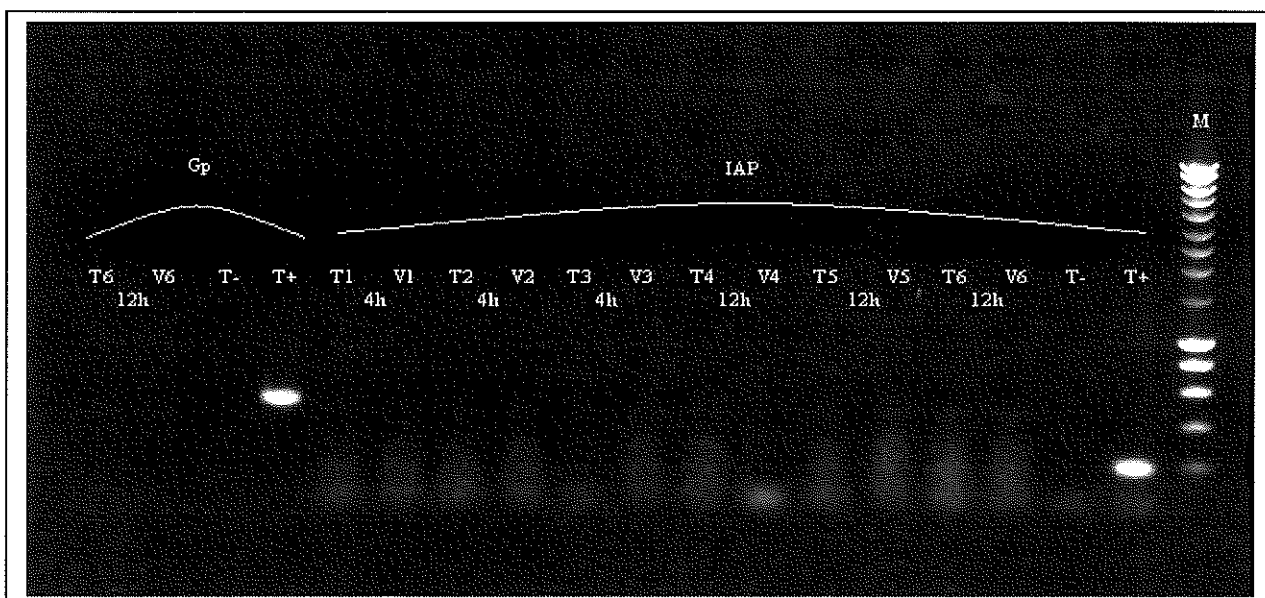


Figure 17 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits de PCR ; M : Marqueur à 200pb eurogentec ; T1 4h : échantillon du lot Témoin 1 après 4h d'incubation ; V2 12h : échantillon du lot Virus 2 après 12h d'incubation.

IV.5.3 Recherche d'ARN viral par RT-PCR

Aucune bande de taille attendue n'est observée, en gel d'agarose, pour les échantillons analysés. Une amplification du Témoin positif est observée pour les trois couples d'amorces utilisés (OHV/1OHV2, Gp1/Gp2, IAP1/IAP2) (Figures 18 et 19).

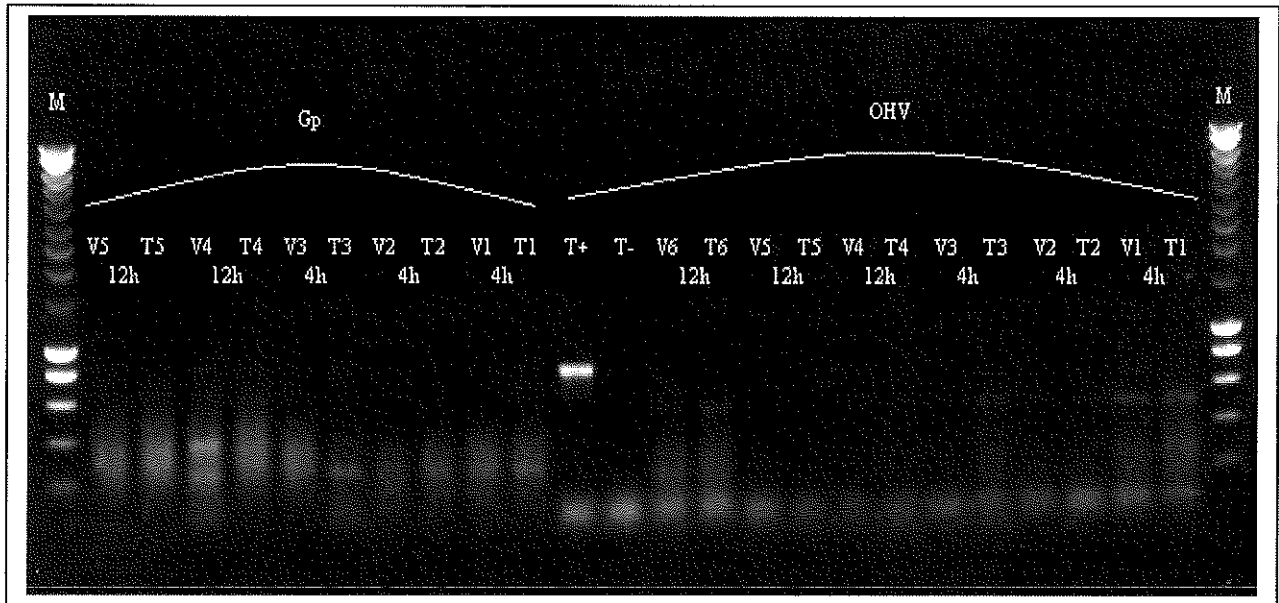


Figure 18 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits de RT-PCR ; M : Marqueur à 200pb eurogentec ; T1 4h : échantillon du lot Témoin 1 après 4h d'incubation ; V2 12h : échantillon du lot Virus 2 après 12h d'incubation.

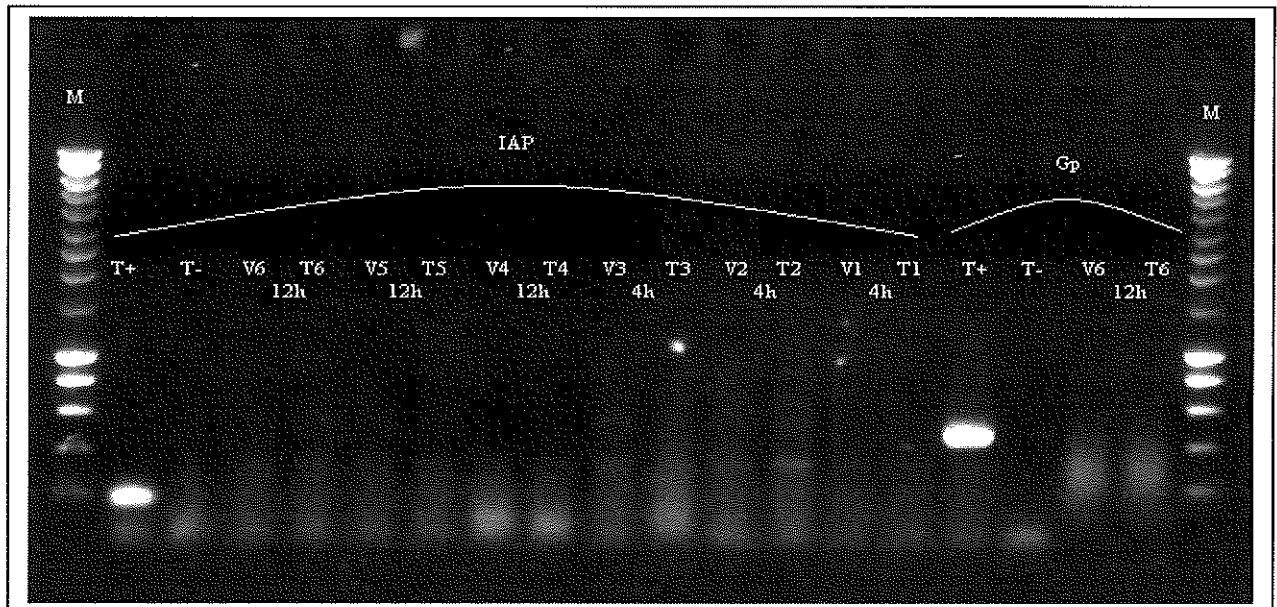


Figure 19 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) des produits de RT-PCR ; M : Marqueur à 200pb eurogentec ; T1 4h : échantillon du lot Témoin 1 après 4h d'incubation ; V2 12h : échantillon du lot Virus 2 après 12h d'incubation.

V. Discussion

La recherche d'ADN et d'ARN viraux, dans des échantillons d'hémocytes prélevés dans trois lots d'huîtres adultes d'origines différentes, a été réalisée avec trois couples d'amorces spécifiques d'OsHV-1 : OHV1/OHV2, Gp1/Gp2 et IAP1/IAP2. Il n'a pas été détecté dans ces trois lots d'hémocytes d'ADN et d'ARN viraux. Cependant pour les amorces Gp1/Gp2 et IAP1/IAP2 se pose le problème d'une absence d'amplification des témoins positifs. La détection du virus OsHV-1 n'est donc pas observée, les résultats sont en contradiction avec ce qui a été obtenu précédemment lors d'une analyse RT-PCR où il a été montré la présence d'ARN viraux dans ce type cellulaire (Moreau K, communication personnelle).

Des expériences préliminaires ont été réalisées pour analyser les effets d'un changement soudain de température (passage d'une eau de 18°C à 24°C). Ce changement n'a pas induit de mortalité significative. L'intérêt de maintenir les huîtres dans une eau à 24°C est d'augmenter la capacité du virus (OsHV-1) à se développer (Farley *et al.*, 1972 ; Le Deuff *et al.*, 1996). Un essai d'injection d'eau de mer dans la cavité péricardique chez des huîtres adultes ayant été anesthésiées montre qu'il n'existe pas de différence significative avec le lot témoin en terme de mortalité. Un changement de température suivi d'une anesthésie et d'une injection semble être bien supporté par les animaux, ce qui permet d'intégrer ces étapes dans les protocoles d'infection *in vivo*.

Un essai d'infection d'huîtres adultes avec le virus OsHV-1 a été réalisé. La source de virus utilisée correspond à du naissain naturellement infecté et conservé à -20°C. Pour suivre le succès de l'infection expérimentale chez les animaux adultes, il a été choisi de rechercher le virus dans les hémocytes par PCR et RT-PCR. Les analyses effectuées n'ont pas permis la mise en évidence d'ADN viral et d'ARN viraux dans les hémocytes. Des travaux réalisés au préalable au LGP (La Tremblade, Charente-Maritime) ont montré la difficulté à obtenir un protocole reproductible d'infection expérimentale au stade naissain et adulte chez l'huître creuse, *C. gigas* (Arzul, 1997 ; Arzul, 1998). En effet, chez les huîtres adultes, aucune mortalité et aucune lésion n'ont pu être observées après essais d'infection expérimentale. Cependant, les outils moléculaires permettant une recherche spécifique du virus n'étaient alors pas disponibles. Les résultats négatifs obtenus dans ce travail pourraient s'expliquer de différentes manières :

- une absence de particules virales infectieuses (intègres) dans le broyat de naissain : source de virus utilisé aboutissant à une absence d'infection expérimentale ;
- un défaut de détection du virus du fait d'une inadéquation des couples d'amorces utilisées et des gènes viraux ciblés ;
- un choix des cellules sélectionnées (hémocytes) non adapté au suivi de l'infection viral.

Ces observations traduisent les difficultés pour s'approvisionner en virus OsHV-1. L'absence de lignée cellulaire de bivalves marins ainsi que l'impossibilité d'infecter des lignées cellulaires existantes avec OsHV-1 ne permet pas de produire le virus *in vitro* (Le Deuff *et al.*, 1994 ; Renault *et al.*, 1995 ; Deniau, 2000). La technique de production de larves axéniques infectées comme système de multiplication du virus, a été établie pour permettre de remédier à ces difficultés, (Le Deuff *et al.*, 1994 ; Le Deuff *et al.*, 1996 ; Arzul *et al.*, 2001a et 2001b). Le pouvoir infectieux du virus peut être perdu dans du matériel biologique conservé à -20°C (animaux naturellement infectés conservés congelés). La congélation peut avoir un

effet destructeur sur l'enveloppe virale, composant indispensable à la pénétration du virus dans les cellules cibles. L'absence de système cellulaire permettant la multiplication du virus *in vitro* empêche toute évaluation *a priori* du pouvoir infectieux des particules virales contenues dans du matériel infecté, archivé.

La recherche d'ADN et d'ARN viraux est réalisée en utilisant trois couples d'amorces spécifiques du virus OsHV-1 : OHV1/OHV2, Gp1/Gp2 et IAP1/IAP2. L'extraction d'ARN des hémocytes des huîtres est effectuée 24 heures, 48 heures et 72 heures après l'inoculation du broyat de naissain infecté. Le cycle de réplication viral n'étant pas connu, les gènes viraux ciblés pourraient ne pas permettre de détecter une infection précoce. Le gène Gp code pour une glycoprotéine d'enveloppe. Chez HSV-1, la formation de l'enveloppe se fait à la fin du cycle de réplication, aux alentours de 18 heures (Hureauux *et al.*, 2003). Le gène OHV code pour deux protéines de fonction inconnue et le gène IAP code pour une protéine inhibitrice de l'apoptose. Aujourd'hui, les gènes d'expression précoce et tardive n'ont pas été identifiés chez le virus OsHV-1. Le ciblage de gènes précoces permettrait de détecter la multiplication du virus dans les premières heures après l'inoculation.

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

Les résultats négatifs observés en PCR peuvent par ailleurs aussi s'expliquer par le fait que les analyses PCR ont été réalisées sur des échantillons ayant subi une extraction d'ARN et non d'ADN. Cependant les ARN extraits contiennent également de l'ADN viral (absence de traitement des ARNs par DNase). Ce procédé n'est donc pas optimal pour la détection d'ADN viral. Les mêmes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence de détection d'ADN et d'ARN viraux lors de l'essai d'infection des hémocytes.

Par ailleurs, pour l'essai d'infection des hémocytes *in vitro*, le broyat de naissain infecté a été retiré trop tôt ce qui a pu gêner l'infection, une modification du protocole, c'est à dire laisser en contact le virus et les cellules pendant 4h et 12h pourraient faciliter l'infection. Des essais réalisés au préalable, au laboratoire (Moreau, 2004) ont en effet permis de détecter des ARN viraux dans des hémocytes d'huîtres, après un contact de 13 heures entre les cellules et le broyat de matériel infecté.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMKEWICZ S.L., M.G. HARASEWYCH, J. BLAKE, D. SAUDEK and C.J. BULT (1997). A molecular phylogeny of the bivalve mollusks. *Mol. Biol. Evol.*, 14(6), 619-629.
- ALDERMAN D.J. and P. GRAS (1969). Gill disease of Portuguese oyster. *Nature*, 224, 616-617.
- AMICHE M., A.A. SEON, H. WROBLEWSKI and P. NICOLAS (2000). Isolation of dermatoin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4583-4592.
- ARASON G.J. (1996). Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish and Shellfish Immunology*, 6, 277-289.
- ARZUL I. (1997). Essais de transmission de l'infection à virus de type herpes chez les huîtres creuses, *Crassostrea gigas*. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. Rapport de stage. 48pp.
- ARZUL I. (1998). Transmission expérimentale du virus de type herpes chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Diplôme d'Etudes Approfondies d'Océanologie Biologique. 33pp.
- ARZUL I., J.L. NICOLAS, A.J. DAVINSON and T. RENAULT (2001a). French scallops: a new host for Ostreid Herpesvirus-1. *Virology*, 290, 342-349.
- ARZUL I., RENAULT T. and A. J. DAVINSON (2001b). Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology*, 82, 865-870.
- ARZUL I., RENAULT T. and LIPART C. (2001c). Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46(1) : 1-6.
- ARZUL I. et RENAULT T. (2002). Herpèsvirus et bivalves marins. *Virologie*, 6 : 169-74.
- AUFFRET M. (1985). Morphologie comparative des types hématocytaires chez quelques mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse de 3^{ème} cycle, d'Océanographie mention Biologie. Université de Bretagne Occidentale (Brest). 153 pp.
- AUFFRET M. and R. OUBELLA (1997). Hemocyte aggregation in the oyster, *Crassostrea gigas*: *in vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A, 705-712.
- AZUMI K., H. YOKOSAWA and S-I. ISHII (1990). Halocyanins: Novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biochemistry*, 29, 159-165.
- BEAUMONT A. et P. CASSIER (1990). Biologie animale. Tome 1. *édition Dunod, Paris*, 3^{ème} édition, pp.459.
- CHENG T.C. (1981). Bivalves. In: *Invertebrate Blood Cells (édition N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley)*, 233-299. Academic Press, London.

CHENG T.C. (1983). The role of lysosomes in molluscan inflammation. *American Zoology*, 23 : 129-44.

CHENG T.C. and DOWNS J.C.U. (1988). Intracellular acid phosphatase and lysosome levels in subpopulations of oyster, *Crassostrea virginica*, hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52 : 163-7.

CHENG T.C. and RODRICK G.E. (1975). Lysosomal and other enzyme in the hemolymph of *Crassostrea virginica*, and *Merceneria merceneria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 52 part B : 443-7.

COHEN J.J. (1994). Apoptosis: physiologic cell death. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 124(6) : 761-5.

COMPS M. (1970). La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*, caractéristiques et évolution des altérations, processus de cicatrisation. *Revue des Travaux de l'institut des pêches maritimes*, 34(1), 23-44.

COMPS M. and J.R. BONAMI (1977). Infection virale associée à des mortalités chez l'huître *Crassostrea angulata*. *CR de l'Académie des Sciences Paris*, 285, 1139-1140.

COMPS M. and COCHENNEC N. (1993). A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62 : 201-3.

COMPS M., J.R. BONAMI and C. VAGO (1976). La mise en évidence d'une infection virale chez l'huître portugaise à l'occasion de l'épizootie de 1970-1974. *CR de l'Académie des Sciences Paris*, 282, 1991-1993.

COMPS M., BONAMI J.R., VAGO C. et CAMPILLO A. (1976). Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 282 : 1991-3.

DAVISON A.J. (2002). Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol.*, 86(1-2) : 69-88. Review.

DAVINSON A.J, TRUS B.L., CHENG N., STEVEN A.C., WATSON M.S., CUNNINGHAM C., LE DEUFF R.M and RENAULT T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalves host. *J. Gen. Virol.*, 86: 41-53.

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 pour l'obtention du diplôme de l'école pratique des Hautes Etudes, Science de la Vie et de la Terre*, pp. 189.

DU PASQUIER L. (2001). The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 129, 1-15.

ELSTON R.A. (1997). Special topic review: bivalve mollusc viruses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 393-403.

FARLEY C.A. (1978). Virus and viruslike lesion in marine molluscs. *Marine Fisheries Review*, 40(10), 18-20.

FARLEY C.A., BANFIELD W.G., KASNIC J.R.G. and FOSTER W.S. (1972). Oyster herpes-type virus. *Science*, 178 : 759-60.

FRANCKI R.I.B., C.M. FAUQUET, D.L. KNUDSON and F. BROWN (1991). Classification and nomenclature of viruses. *Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses*, 103-110.

FURLONG D., SWIFT H. and ROIZMAN B. (1972). Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *Journal of virology*, 10(5) : 1071-4.

GARRETT R.H. and C.M. GRISHAM (2000). *Biochimie. édition De Boeck Université, Bruxelles*, 2ème édition, pp. 1254.

GOULLETQUER P. and LE MOINE O. (2003). Shellfish farming and coastal zone management (CZM) development in the Marennes-Oléron Bay and Charentais Sounds (Charente Maritime, France). *Aquaculture*, 10 : 507-25.

GOURDON I., M-C GUERIN and J. TORREILLES (1998). Mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse aux stress chez les bivalves marins. *CR de l'Académie des Sciences Paris*, 192, 749-774.

HAMANN M.T., C.S. OTTO and P.J. SCHEUER (1996). Kahalalides: bioactive peptides from a marine mollusk *Elysia rufescens* and its algal diet *Bryopsis* sp.. *J. Org. Chem.*, 61, 6594-6600.

HERAL M. (1989). L'ostréiculture française traditionnelle. In : *Aquaculture*, Vol 1 (ed G Barnabé), pp 346-397. Lavoisier, Paris.

HINE P.M., WESNEY B. and HAY B.E. (1992). Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12(2) : 135-42.

HINE P.M., WESNEY B. and BESANT P. (1998). Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Triostrea chilensis* at ambient temperatures. *Diseases of Aquatic Organisms*; 32 : 161-71.

ISAACSON T., A.M. SOTO, S. IWAMURO, F. C. KNOOP and J.M. CONLON (2002). Antimicrobial peptides with atypical structural features from the skin of the japonese brown frog *Rana japonica*. *Peptides*, 23, 419-425.

JANEWAY C.A. and P. TRAVERS (1997). *Immunobiologie. édition De Boeck Université, Bruxelles*, 2^{ème} édition, pp. 582.

LACOSTE A., F. JALABERT, S.K. MALHAM, A. CUEFF and S.A. POULET (2001). Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile

oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2304-2309.

LE DEUFF R.M. (1995). Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux *Iridoviridae* et aux *Herpesviridae*. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux II. 234 pp.

LE DEUFF R.M., LIPART C, and RENAULT T. (1994). Primary culture of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, heart cells. *Journal of Tissue Culture Methodology*, 16 : 67-72.

LE DEUFF R.M., T. RENAULT and A. GERARD (1996). Effects 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 (1998). Isolation of HIV-1 protease-inhibiting peptides from thermolysin hydrolysate of oyster proteins. *Biochemical and Biophysical research communications*, 253, 604-608.

LORTEAU C., AUFFRET M. et LE BRIS H. (1995). Le système d'immuno-défense des mollusques bivalves II : Effets modulateurs des facteurs environnementaux. *Médecine Vétérinaire*, 171 : 423-9.

LUNA-GONZALEZ A., A.N. MAEDA-MARTINEZ, F. VARGAS-ALBORES, F. ASCENCIO-VALLE and M. ROBLES-MUNGARAY (2003). Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology*, 15, 275-282.

KIEFF E. and T. SHENK (1998). Modulation of Apoptosis by Herpes viruses. *Seminars in Virology*, 8, 471-480.

KOBAYASHI J., G.C. HARBOUR, J. GILMOR and K.L. Jr. RINEHART (1984). *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 1526.

MAIER M.S., A.J. ROCCATAGLIATA, A. KURISS, H. CHLUDIL, A.M. SELDES, C.A. PUJOL and E.B. DAMONTE (2001). Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the antartic sea cucumber *Straurocucumis liouvillei*. *J. Nat. Prod.*, 64(6), 732-736.

MATTHEWS (1982). Classification and nomenclature of viruses. The families and groups. *Fourth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses Intervirology*, 17 (1-3), 41-178.

MINSON A.C., DAVISON A.J., DESROSIERS R.C., FLECKENSTEIN B., MCGEOCH D.J., PELLETT P.E., ROIZMAN B. and STUDDERT M.J. (2000). *Herpesviridae*. In *Virus Taxonomy*, 7th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ed M.H.V. VAN REGENMORTEL, C.M. FAUQUET, D.H.L. BISHOP, E.B. CARSTENS, M.K. ESTES, S.M. LEMON, J. MANILOFF, M.A. MAYO, D.J. MCGEOCH, C.R. PRINGLE and R.B. WICKNER), pp 203-25. Academic Press.

MITTA G., F. HUBERT, T. NOËL and P. ROCH (1999). Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.*, 265, 71-78.

MITTA G., F. VANDENBULCKE, F. HUBERT and P. ROCH (1999). Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Science*, 112, 4233-4242.

NICOLAS J.L., COMPS M. and COCHENNEC N (1992). Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of European Associated Fish Pathologists*, 12(1) : 11-3.

OLICARD C., RENAULT T., TORHY C., BENMANSOUR A. and BOURGOUGNON N. (2005). Putative antiviral activity in hémolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Res.*, 66(2-3): 147-152.

OTTAVIANI E., L.R. PAEMEN, P. CADET and G.B. STEFANO (1993). Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. *Eur. J. Pharmacol. Exp. Toxicol. Pharmacol. Section*, 248, 319-324.

RENAULT T. (1998). Infections herpétiques chez les invertébrés : détection de virus de type herpes chez les mollusques bivalves marins. *Virologie*, 2(5) : 401-3.

RENAULT T., COCHENNEC N., LE DEUFF R.M. and CHOLLET B. (1994). Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 14(2) : 64-6.

RENAULT T., FLAUJAC G. and LE DEUFF R.M. (1995). Isolation and culture of heart cells from the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Methods of Cellular Science*, 17 : 199-205.

RENAULT T., LE DEUFF R.M., CHOLLET B., COCHENNEC N. and GERARD A. (2000). Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of aquatic organisms.*, 42(3):173-83.

RENAULT T., LIPART C. and ARZUL I. (2001). A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Diseases of aquatic organisms*, 45(1):1-7.

RENAULT T., XUE Q-G and S. CHILMONCZYK (2001). Flow cytometric analysis of european flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 11, 269-274.

RENAULT T., T., R.M. LE DEUFF, C. LIPART, B. CHOLLET et P. HAFFNER (1997). Programme herpesvirus : Synthèse des travaux réalisés au laboratoire IFREMER de La Tremblade. Mars 1996/février 1997. Note IFREMER.

RINEHART K.L. Jr, J.B. GLOER, R.G. Jr HUGHES, H.E. RENIS, J.P. McGOVREN, E.B. SURYNENBERG, D.A. STRINGFELLOW, S.L. KWENTZEL and L.H. LI (1981). Didemnins: antiviral and antitumor despeptides from caribbean tunicate. *Science*, 212(4497), 933-935.

ROIZMAN B. and W BATTERSON (1985). Herpesvirus and their replication. *In: Virology (edition BN Fields and al.)*, 497-526. Raven Press, New York.

ROIZMAN B., R.C. DESROSIERS, B. FLECKENSTEIN, C. LOPEZ, A.C. MINSON and M.J. STUDDERT (1992). *Archives of Virology*, 123(3-4), 425-449.

ROIZMAN B. and D. FURLONG (1974). The replication of herpesvirus. *In: Comprehensive Virology*, vol 3 (edition H Fraenkel-Conrat and RR Wagner), 29-403. Plenum Press, New York.

SALZET M. (2001). Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends in Immunology*, 22(6), 285-288.

SMITH V.J. and K. SÖDERHÄLL (1991). A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Developmental and Comparative Immunology*, 15(4), 251-261.

SÖDERHÄLL K. (1992). Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Bollettina di zoologica*, 59, 141-151.

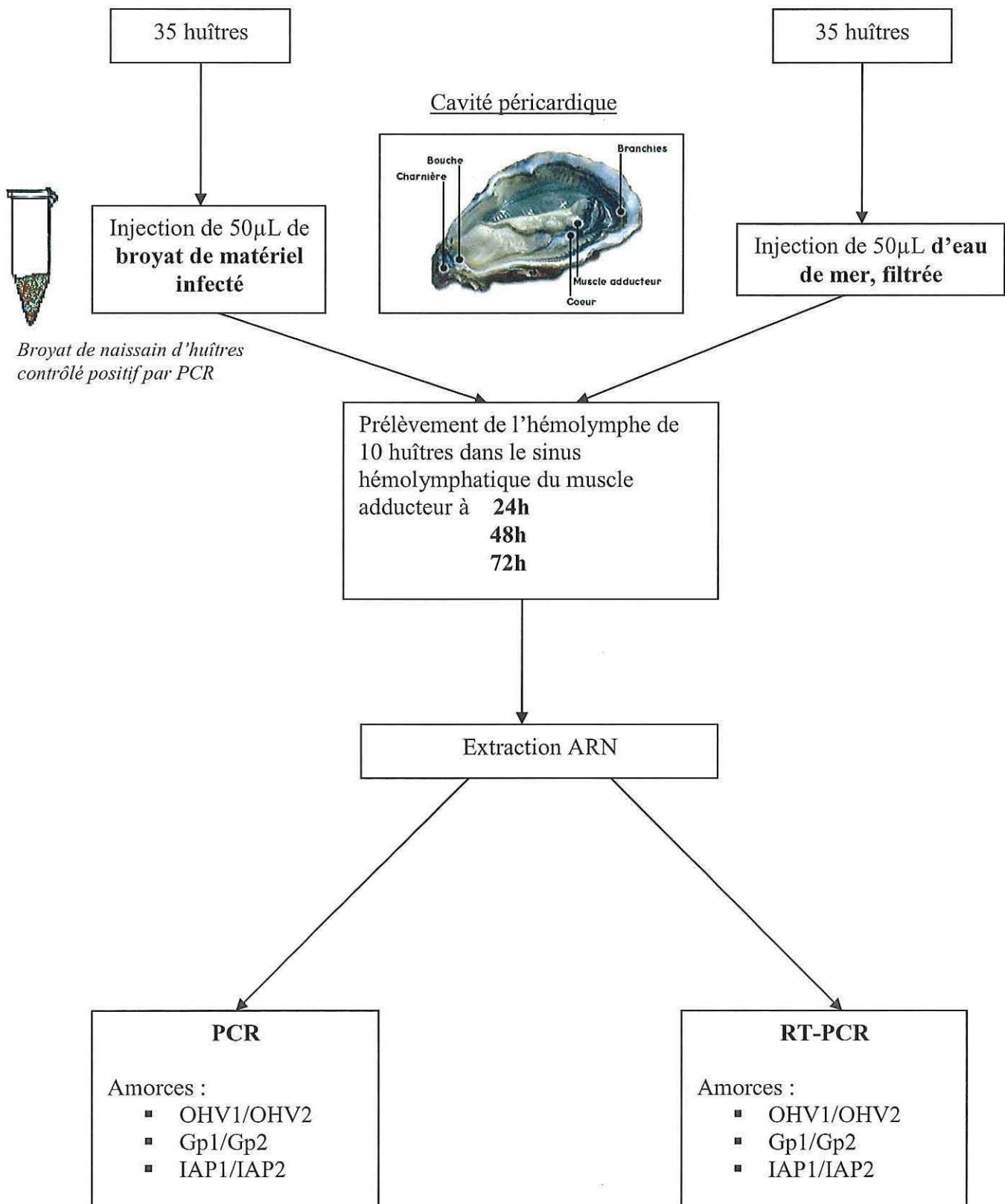
TAMAMURA H., M. KURODA, M. MASUDA, A. OTAKA, S. FUNAKOSHI, H. NAKASHIMA, N. YAMAMOTO, M. WAKI, A. MATSUMOTO, J.M. LANCELIN, D. KOHDA, S. TATE, F. INAGAKI and N. FUJII (1993). A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T22 ([Try 5,12, Lys 7]-polyphemusin II), determined by nuclear magnetic resonance. *Biochemica and Biophysica Acta*, 1163, 209-216.

TERAHARA K., K.G. TAKAHASHI and K. MORI (2003). Apoptosis by RGD-containing peptides observed in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 27, 521-528.

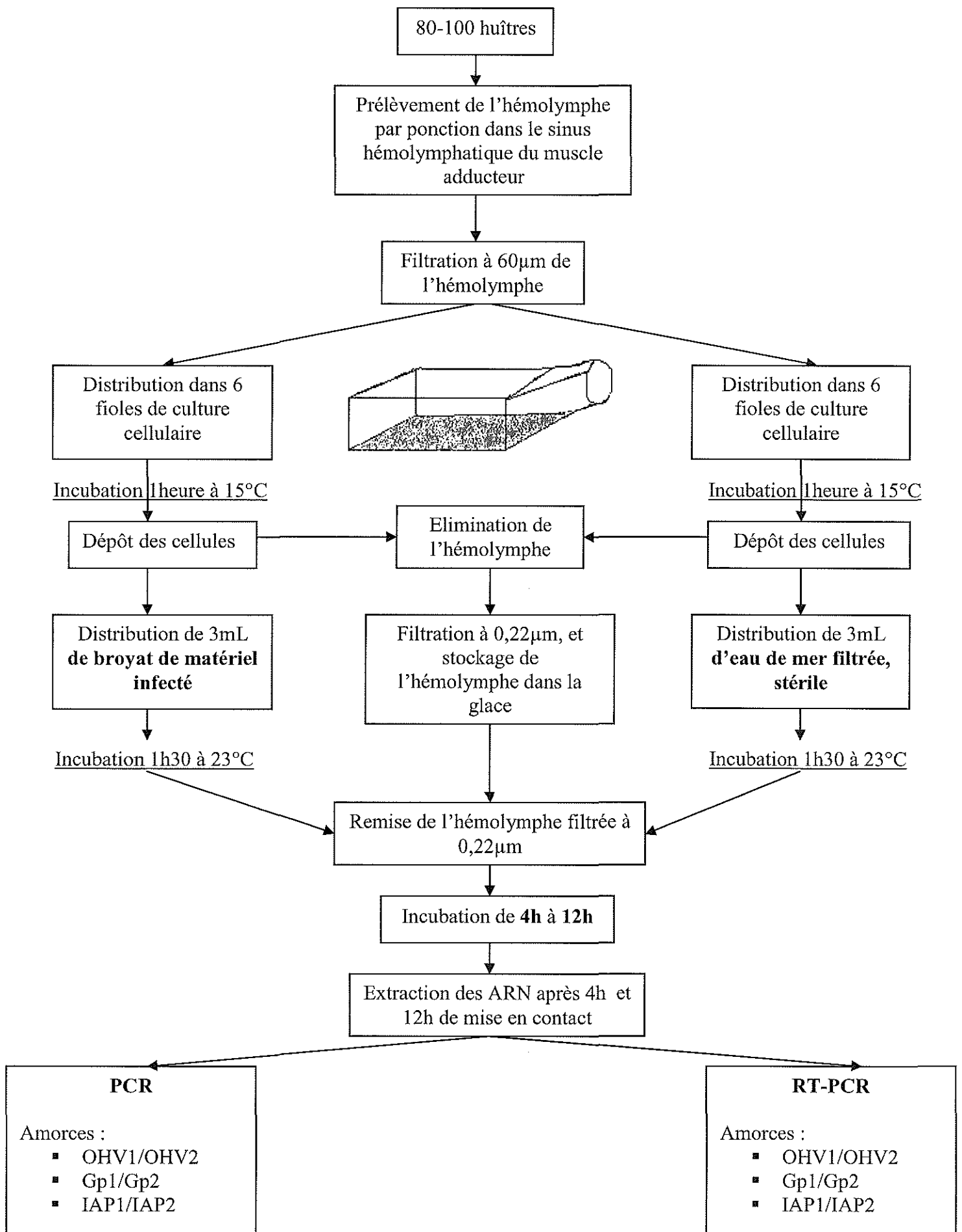
XUE Q. (1998). Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes chez l'huître plate *Ostrea edulis*. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale. 324 pp.

YASIN B., M. PANG, J.S. TURNER, Y. CHO, N-N. DINH, A.J. WARING, R.I. LEHRER and E.A. WAGAR (2000). Evaluation of the inactivation of infectious *Herpes simplex* virus by host-defense peptides. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 19, 187-194.

Infection *in vivo* d'hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*



Infection *in vitro* d'hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*



Extraction des ARN (Gibco)

- ✦ Ajouter 1,5mL de Trizol pour 10 millions de cellules dans le tube Falcon
- ✦ Agiter en aspirant et refoulant : la lyse s'effectue immédiatement
- ✦ Récupérer le lysat dans un tube eppendorf stérile
- ✦ Laisser 5 minutes à température ambiante pour permettre une dissociation complète des complexes nucléoprotéines.
- ✦ Ajouter 200 μ L de chloroforme pour 1mL de Trizol
- ✦ Agiter vigoureusement 15 secondes
- ✦ Incuber à température ambiante pendant 2-3minutes
- ✦ Centrifuger 15 minutes à 12000g à 4°C
- ✦ Transférer la phase aqueuse (environ 60% du volume de Trizol) dans un tube eppendorf stérile
- ✦ Ajouter 0,5mL d'isopropanol pour 1mL de Trizol (0,75mL) pour précipiter l'ARN contenu dans cette phase.
- ✦ Incuber 10 minutes à température ambiante
- ✦ Centrifuger à 12000g pendant 10 minutes à 4°C
- ✦ Ajouter 1,5mL d'éthanol à 70% pour laver l'ARN
- ✦ Centrifuger à 7500g pendant 5 minutes à 4°C
- ✦ Sécher à l'air pendant 10 minutes
- ✦ Remettre en suspension dans 22 μ L d'eau DEPC
- ✦ Pour faciliter la dissolution, placer la suspension au bain-marie 10 minutes à 50°C
- ✦ Réaliser une dilution au 1/100^{ème} avec de l'eau distillée.

Extraction des ARN (LGP)

Extraction ARN

- ✦ Ajouter 1,5mL de Trizol pour 10 millions de cellules dans le falcon
- ✦ Agiter en aspirant et refoulant : la lyse s'effectue immédiatement
- ✦ Récupérer le lysat dans un tube eppendorf stérile
- ✦ Laisser 5 minutes à température ambiante
- ✦ Ajouter du chloroforme IsoAmylique(49 :1) : $1/5^{\text{ème}}$ du volume de Trizol
- ✦ Homogénéiser méthodiquement 15 secondes puis laisser reposer 10 minutes à température ambiante
- ✦ Centrifuger 10 minutes à 4°C à 12000g
- ✦ Récupérer la phase aqueuse (mettre dans la glace)

Précipitation

- ✦ Ajouter 0,5 mL d'Isopropanol froid (4°C) pour 1mL de Trizol (0,75mL)
- ✦ Mélanger, incuber 30 minutes à 4°C.
- ✦ Centrifuger 30 minutes à 4°C à 12000g
- ✦ Eliminer doucement le surnageant, laver le culot avec 1,5mL d'éthanol à 70%
- ✦ Centrifuger 10 minutes à 4°C à 12000g
- ✦ Eliminer doucement le surnageant
- ✦ Centrifuger 2 minutes à 4°C à 12000g
- ✦ Eliminer doucement les dernières gouttes d'éthanol et sécher 10minutes
- ✦ Remettre en suspension dans 22 μ L d'eau DEPC
- ✦ Pour faciliter la dissolution, placer la suspension au bain-marie 10 minutes à 50°C
- ✦ Réaliser une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ avec de l'eau distillée.