



IUT La Rochelle

Département Génie Biologique

15, rue F. de Vaux de Foletier

17026 LA ROCHELLE CEDEX 01

Ifremer

IFREMER

Laboratoire de Génétique et Pathologie

Avenue de Mus de Loup

17390 LA TREMBLADE

**« Mécanismes de défense anti-viraux chez
l'huître creuse : suivi de l'expression de gènes
interprétés comme impliqués dans l'immunité »**



TOURANCHEAU Alan

Deuxième Année DUT Génie Biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques

Rapport de stage

Stage effectué du 14 Avril au 19 Juin 2009

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Tristan Renault pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire Génétique et Pathologie et pour avoir passé du temps à relire mon rapport.

Un grand MERCI à Nicole Faury pour son accueil, pour les conseils qu'elle m'a donné tout au long de mon stage, pour l'aide qu'elle m'a apporté pour la rédaction de mon rapport ainsi que pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

Je remercie également le Dr. Shikorski pour l'intérêt qu'il a porté à mon rapport ainsi que pour nous avoir fourni en Carambar.

Merci à tous les stagiaires pour les soirées passées ensemble.

Je remercie aussi toutes les personnes de la station.

Sommaire

1. INTRODUCTION	1
2. MATERIEL ET METHODES	4
2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE	4
2.1.1. <i>L'huître creuse, Crassostrea gigas</i>	4
2.1.2. <i>Animaux utilisés pour l'expérimentation</i>	5
2.1.3. <i>Protocole expérimental d'infection</i>	5
2.1.4. <i>Echantillonnage</i>	7
2.2. EXTRACTION DE L'ADN ET DE L'ARN	7
2.2.1. <i>Acide DésoxyriboNucléique</i>	7
2.2.2. <i>Acide RiboNucléique</i>	8
2.3. QUANTIFICATION : DOSAGE DE L'ADN ET DE L'ARN	8
2.4. LA REVERSE TRANSCRIPTION (RT)	9
2.4.1. <i>Principe</i>	9
2.4.2. <i>Purification, traitement à la DNase et NoRT (no Reverse Transcription)</i>	9
2.4.3. <i>Reverse Transcriptase</i>	10
2.5. LA PCR EN TEMPS REEL	10
2.5.1. <i>Principe</i>	10
2.5.2. <i>Détection et quantification du virus OsHV-1</i>	12
2.5.3. <i>Suivi de l'expression des gènes</i>	12
2.5.4. <i>Validation des résultats</i>	12
2.5.5. <i>Choix des gènes</i>	13
3. RESULTATS	14
3.1. SUIVI DE LA MORTALITE	14
3.2. QUANTIFICATION DE L'ADN VIRAL ET SUIVI DANS LE TEMPS DANS DIFFERENTS COMPARTIMENTS	15
3.2.1. <i>Dans l'eau des bacs</i>	15
3.2.2. <i>Dans l'hémolymphe</i>	16
3.2.3. <i>Dans le manteau</i>	16
3.3. CINETIQUE DE L'EXPRESSION RELATIVE DES GENES INTERPRETES COMME IMPLIQUES DANS LES DEFENSES IMMUNITAIRES	18
3.3.1. <i>Extraction ARN et traitement Dnase des hémolymphes</i>	18
3.3.2. <i>Résultat de la NoRT</i>	19
3.3.3. <i>Glypican 6</i>	19
3.3.4. <i>Myeloid differentiation factor 88 : MyD88</i>	21
3.3.5. <i>Interferon Induced protein 44 : IFI44</i>	20
3.3.6. <i>Molluscan Defence Molecule precursor</i>	22
3.3.7. <i>Multicopper Oxidase</i>	22
4. DISCUSSION	24
4.1. MORTALITES	24
4.2. DETECTION D'ADN VIRAL DANS L'EAU DE MER.....	24
4.3. DETECTION D'ADN VIRAL DANS LES ANIMAUX	25
4.4. EXPRESSION DE GENES INTERPRETES COMME IMPLIQUES DANS L'IMMUNITE.....	26
5. CONCLUSION	28

1. Introduction

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, a été introduite dans de nombreuses régions du monde à des fins commerciales. En France, cette espèce non native a été introduite au début des années 70, suite aux mortalités massives ayant touché les stocks d'huîtres portugaises, *Crassostrea angulatum*. Elle représente aujourd'hui l'espèce d'huître la plus cultivée au monde. La France est le 4^{ème} producteur mondial d'huîtres creuses avec une production d'environ 110 000 tonnes par an.

Depuis la fin des années 80, l'espèce *Crassostrea gigas* subit en France des épisodes de mortalités récurrents en période estivale correspondant aux mois les plus chauds (entre mai et septembre). Différents travaux ont été mis en œuvre pour tenter de comprendre les causes de ces mortalités estivales. Ainsi, au début des années 90, il a été possible de mettre en évidence un virus de type herpès (Ostreid Herpes Virus 1 : OsHV-1) associé aux cas de mortalités (**Renault et al, 1994**). Par ailleurs, l'Ifremer a initié en 2001 pour une durée de cinq ans un programme multidisciplinaire appelé MOREST pour MORTalité ESTivale. Ce programme a permis de caractériser différents facteurs de risque en couplant des études en milieu naturel et en conditions expérimentales (**Samain et al, 2004a ; 2004b ; Soletchnik et al, 2005**). Les phénomènes de mortalités apparaissent comme multifactoriels et résulteraient de l'interaction entre trois composantes, l'environnement, l'hôte et des agents infectieux. Parmi les facteurs responsables de ces mortalités estivales sont avancés l'état de reproduction des animaux, l'élévation de la température au dessus de 19°C et l'abondance de nourriture. Il a aussi été montré que la proximité des huîtres du sédiment dans les zones d'élevage était un facteur de risque (**Samain et al, sous presse ; Gay, 2004**). Enfin, des microorganismes pathogènes (bactéries appartenant au genre *Vibrio* et un herpès virus) affectant les huîtres sont également impliqués dans les phénomènes de mortalité.

En 2008, des mortalités d'huîtres ont été observées avec une ampleur du phénomène sans précédent. En effet, depuis l'introduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, tous les bassins ostréicoles ont vu disparaître entre 40% et 60% de leurs stocks de juvéniles. L'herpès virus OsHV-1 et des bactéries appartenant au genre *Vibrio* (*V. splendidus*, *V. aestuarianus* et *V. harveyi*) ont été identifiés comme des agents infectieux impliqués dans les mortalités observées.

Le virus OsHV-1 fait partie de la famille des *Herpesviridae* (Fig. 1). Cette famille composée d'environ 80 membres différents, regroupe des virus enveloppés possédant un génome relativement complexe à ADN double brin. Ils se répliquent dans le noyau d'un large éventail d'hôtes vertébrés, le seul virus infectant des invertébrés étant le virus OsHV-1.

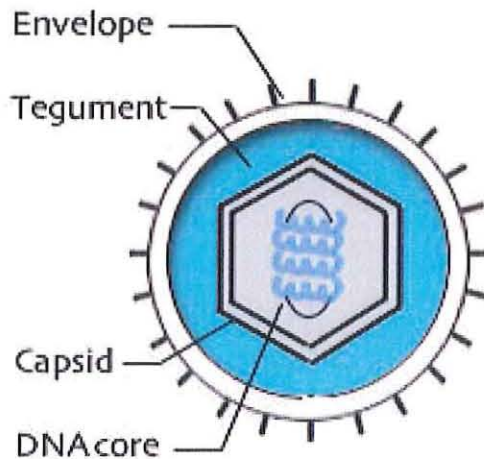


Figure 1 : Structure caractéristique des virus de la famille Herpesviridae

- Le nucléoïde, ou core, est un assemblage de protéines et d'ADN viral. Ce dernier est composé d'une molécule d'ADN double brin.
- La capsid est une enveloppe protéique icosaédrique recouvrant le core.
- Le tégument se situe entre la capsid et l'enveloppe. Il contient des protéines virales impliquées dans le contrôle des processus cellulaires pour la production du virion ou dans la défense vis à vis des réponses immédiates de la cellule hôte.
- L'enveloppe est la couche externe du virus. Elle est composée de la membrane modifiée de la cellule hôte intégrant des glycoprotéines virales qui confèrent au virus une forme ronde.

Le virus OshV-1 a été totalement séquencé (**Davidson et al, 2005**). Des travaux se sont attachés à comprendre le fonctionnement du système immunitaire de l'huître creuse en réponse à l'infection virale. La réponse immunitaire chez l'huître creuse, comme celle des autres invertébrés, est innée (pas de système adaptatif doué de mémoire). Les hémocytes sont les cellules clés de l'immunité. Ces dernières décennies, des recherches ont été focalisées sur les fonctions de ces cellules contribuant ainsi à la compréhension du rôle de ces dernières dans l'immunité des invertébrés (**Cheng, 1981**). Plus récemment, les développements de la génomique fonctionnelle ont permis l'acquisition d'importantes connaissances sur les effecteurs moléculaires immunitaires chez l'huître adulte (**Bachère et al, 2004**). Plusieurs outils ont été développés pour acquérir des données sur différents gènes exprimés lors de la réponse immunitaire de l'huître. Ils ont permis la construction de banques d'ADN génomiques (**Hedgecock et al, 2005**) et de banques d'ADN complémentaires conduisant à des collections d'EST (Expressed Sequences Tag) (**Gueguen et al, 2003 ; Saavedra et Bachère, 2006**).

Dans ce contexte, le Laboratoire de Génétique et de Pathologie (LGP La Tremblade) a développé depuis 2001 des travaux en hybridation suppressive soustractive (SSH) de manière à identifier certains gènes induits chez *Crassostrea gigas* suite à un contact avec le virus OshV-1. La banque

d'ADNc a été constituée à partir d'hémocytes de *Crassostrea gigas* stimulés *in vitro* ou non par le virus ce qui a permis d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'immunité.

De plus, le développement au LGP, ces dernières années, de la technique de PCR (Polymérase Chain Reaction) en temps réel a permis d'une part la mise au point d'un protocole de quantification du virus OsHV-1 (**Pepin *et al*, 2008**) et d'autre part l'étude de l'expression relative des gènes d'intérêts lors d'une stimulation par différents microorganismes pathogènes. Le protocole expérimental développé dans cette étude intègre ces deux aspects.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de défense anti-viraux chez l'huître creuse, une infection expérimentale a été réalisée en faisant cohabiter des huîtres infectées artificiellement et des huîtres « saines ». Cette approche par transmission horizontale du virus OsHV-1 a été développée récemment au laboratoire et constitue une formidable avancée dans la description des processus infectieux (données non publiées).

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

2.1.1. L'huître creuse, *Crassostrea gigas*

L'huître japonaise, *Crassostrea gigas*, est originaire du nord-ouest du Pacifique. C'est un mollusque bivalve pouvant mesurer jusqu'à 15 centimètres de long (Fig. 2). L'huître creuse se nourrit de phytoplancton (algues microscopiques) qu'elle extrait par filtration de l'eau de mer.

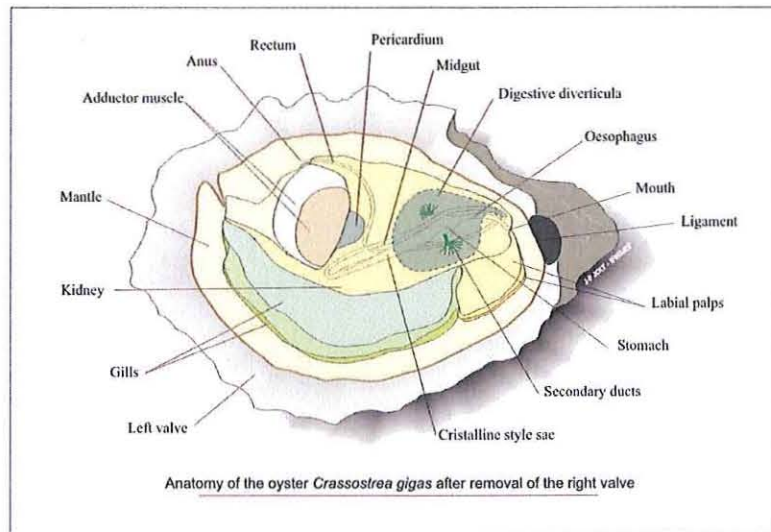


Figure 2 : Anatomie de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, après avoir enlevé la valve droite. www.ifremer.fr

Classification : Règne *Animalia*, Embranchement *Mollusca*, Classe *Bivalvia*, Sous-Classe *Pteriomorphia*, Ordre *Ostreoida*, Genre *Ostrea* (Thunberg, 1793).

L'huître creuse est hermaphrodite protandre, c'est-à-dire qu'elle est mâle, puis femelle. Sa période de reproduction s'étend de juin à septembre. La fécondation est externe : elle a lieu dans l'eau.

Du stade de larve trocophore à larve pédivéligère, l'huître creuse mène une vie pélagique (en pleine eau) et se déplace en tournoyant grâce à ses cils (Fig. 3). La trame de la coquille se forme environ 24h après la fécondation.

Autour du 20^{ème} jour, le pied apparaît permettant à la larve véligère de se fixer sur un support, c'est l'étape de la métamorphose. La larve pédivéligère devient alors une petite huître, le naissain, qui va poursuivre sa croissance jusqu'au stade adulte.

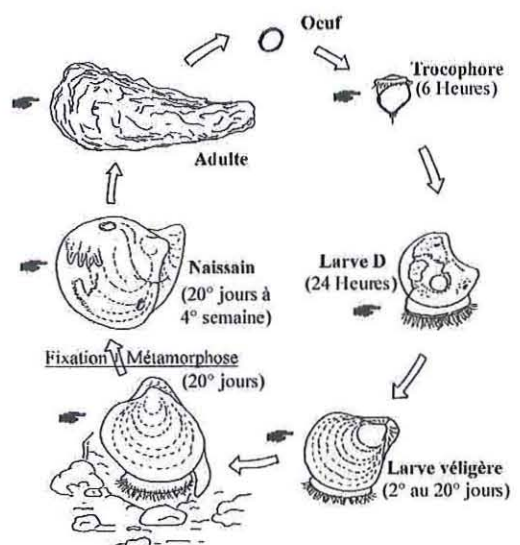


Figure 3 : Cycle de la vie de l'huître creuse. www.progig.fr

2.1.2. Animaux utilisés pour l'expérimentation

Les huîtres creuses utilisées pour l'expérimentation sont des animaux diploïdes âgés de deux ans. L'analyse biométrique réalisée sur 30 individus révèle que la masse totale moyenne des huîtres entières est de 27 g (écart type de 6), alors que la masse moyenne de l'animal décoquillé et égoutté est de 2,5 g (écart type de 0,8). Le portage initial en OsHV-1 pour ce lot d'animaux a été déterminé par PCR quantitative (§ 2.5.2.), 6 % des animaux sont porteurs mais ils présentent des charges virales faibles (détection positive mais non quantifiable).

2.1.3. Protocole expérimental d'infection

Afin de suivre l'expression de gènes impliqués dans les processus de défense de l'huître creuse, des expérimentations d'infections réalisées à partir de suspensions virales d'OsHV-1 ont été réalisées. Les infections ont été effectuées en faisant cohabiter des huîtres saines avec des individus de la même population infectés expérimentalement par le virus OsHV-1 (par inoculation de matériel infectieux dans le muscle adducteur). Ce type d'expérimentation permet de s'approcher davantage des conditions d'infections survenant dans le milieu naturel.

Dans un premier temps, la totalité des huîtres utilisées a été acclimatée dans un « raceway ». L'eau a été progressivement chauffée de 15°C à 22°C (2°C/J) à l'aide de résistances chauffantes. Au cours de cette période d'acclimatation, l'eau est renouvelée quotidiennement et les huîtres sont nourries par ajout journalier de phytoplancton.

Les animaux destinés à être injectés (100 individus) sont mis à sec (afin de maximiser les effets de l'anesthésie), à 22°C, 24 heures avant l'anesthésie. Une solution anesthésiante contenant du MgCl₂ (Fig. 4) est alors préparée et les animaux y sont immergés. L'anesthésie entraîne un relâchement du muscle adducteur laissant s'ouvrir l'animal ce qui permet l'inoculation, par injection dans le muscle adducteur, de 200 µL de matériel infectieux contenant 2,5.10⁵ copies de particules virales par µL.

Une fois l'infection déclarée (48 heures post-injection), 20 huîtres (expérimentalement infectées) moribondes ou mortes sont disposées dans un panier dans le bac Expérimental. Le virus présent dans les animaux infectés est alors relargué dans l'eau des bacs et peut ainsi potentiellement contaminer les huîtres « saines ».

Des d'animaux « sains » ouverts mécaniquement (section du muscle adducteur) ont été introduits dans le bac Témoin. Chaque bac de 40 L d'eau constamment aérée contient 100 huîtres « saines ». Un bac destiné à évaluer la mortalité en absence de prélèvement contient 50 huîtres « saines » et 10 huîtres expérimentalement infectées dans 20 L d'eau de mer avec bullage. L'expérimentation se déroule sur une période de 48 heures. La nature des prélèvements pour chacun des bacs est détaillée dans le schéma suivant.

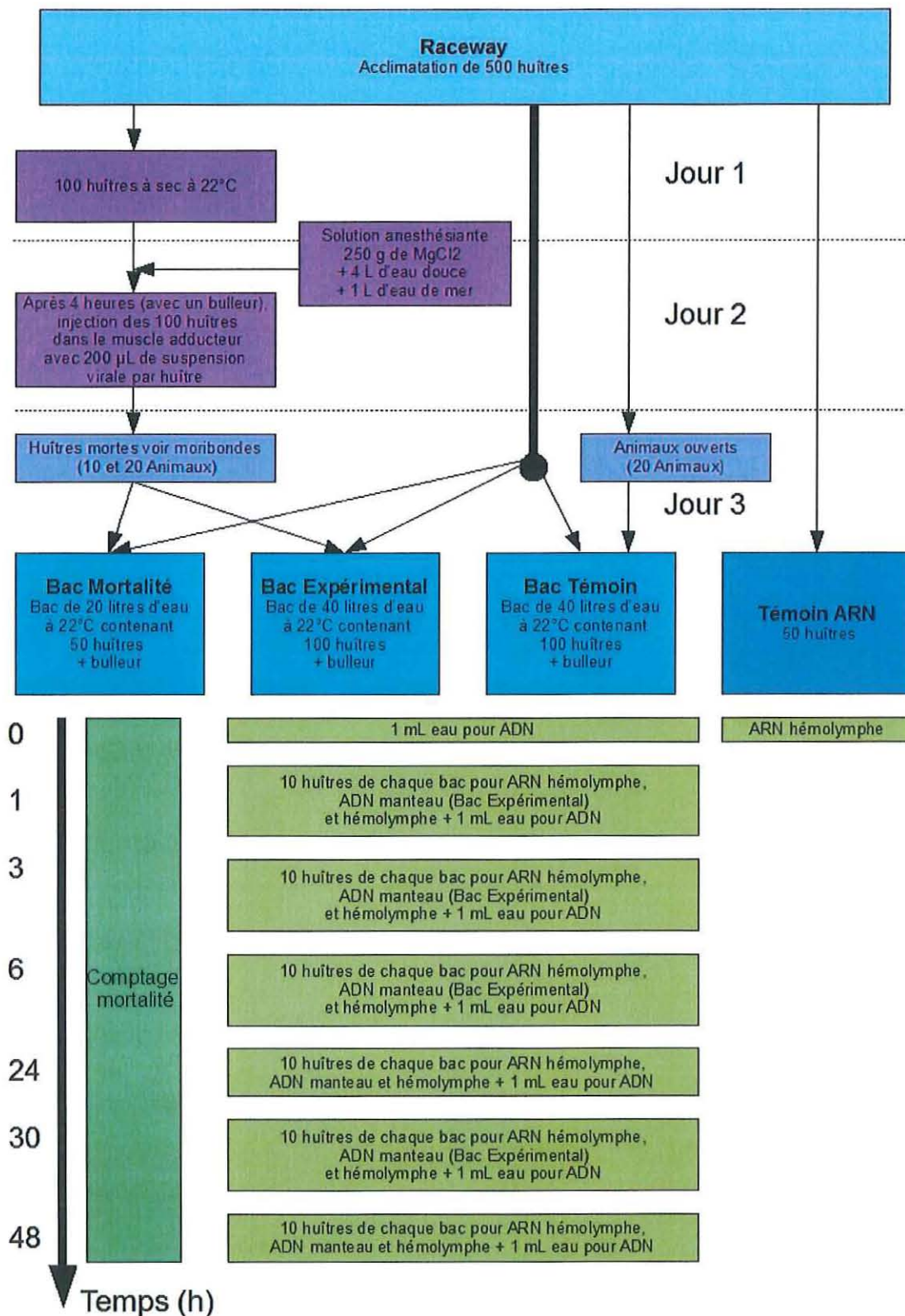


Figure 4 : Schéma de l'expérimentation

2.1.4. Echantillonnage

Prélèvements d'eau : Aux temps définis, 1 mL d'eau de chacun des deux bacs est prélevé à l'aide d'une pipette stérile, les échantillons sont congelés à -20°C.

Prélèvements d'hémolymphe : La coquille des animaux est légèrement brisée à l'aide d'une pince au niveau du muscle adducteur où la ponction est réalisée à l'aide d'une aiguille et d'une seringue. L'hémolymphe prélevée des dix individus est « poolée » et le volume ponctionné est noté. Pour la quantification par PCR quantitative d'OsHV-1, 200 µL d'hémolymphe sont réservés et congelés à -20°C. Le reliquat de l'échantillon destiné à l'extraction d'ARN est conservé à -80°C dans du Trizol® (Invitrogen). Pour valider le témoin ARN T0 de l'expérience, 50 huîtres voient leur hémolymphe ponctionnée, elles ne subissent aucun traitement

Prélèvements du manteau : Le muscle adducteur est intégralement sectionné et les deux valves sont séparées. A l'aide d'une lame de scalpel stérile, environ 0,5 cm² du manteau (environ 30 mg de tissu) est découpé. Les prélèvements sont regroupés par pool de dix individus et congelés à -20°C.

2.2. Extraction de l'ADN et de l'ARN

2.2.1. Acide DésoxyriboNucléique

L'extraction d'ADN est effectuée afin de réaliser la quantification de l'ADN viral présent dans les différents tissus (manteau et hémolymphe) et dans l'eau des bacs expérimentaux. Le kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) est utilisé.

Principe de l'extraction d'ADN :

- L'échantillon est mis en présence de tampon de lyse qui en lysant les membranes cellulaires libère l'ADN. De la protéinase K est aussi ajoutée, elle permet la destruction des protéines. Ces réactions biochimiques sont activées par un chauffage à 56°C.
- La protéinase K est ensuite inactivée grâce à l'ajout d'un nouveau tampon ainsi que par un chauffage à 70°C.
- L'ADN est ensuite précipité par l'ajout d'alcool absolu froid. La solution est chargée dans la micro-colonne à gel de silice.
- L'ADN est retenu dans la colonne où deux tampons de lavage contenant de l'alcool sont ajoutés.
- L'élution est réalisée avec de l'eau bidistillée. Étant hydrophile, l'ADN s'élue dans l'eau et passe à travers la membrane en gel de silice. Les échantillons d'eau et d'hémolymphe sont élués dans 50 µL d'eau bidistillée et les échantillons de manteau dans 200 µL d'eau bidistillée.

2.2.2. Acide RiboNucléique

Les ARNs sont extraits afin de réaliser la quantification de gènes interprétés comme impliqués dans l'immunité chez l'huître creuse.

Principe de l'extraction d'ARN à partir d'hémocytes :

- Les hémocytes sont culottés par centrifugation, le surnageant est retiré et le culot est repris avec du Trizol[®], un réactif commercial permettant la séparation entre les protéines, l'ADN et l'ARN (**Chomczynski et Sacchi, 1987**).
- Le lysat de cellules est récupéré dans un tube DNase RNase Free.
- Un mélange de chloroforme alcool isoamylique correspondant au 1/5 du volume de Trizol[®] initial est ajouté. Les tubes sont vortexés pour favoriser le contact des différentes solutions et ils sont centrifugés. Différentes phases se forment.
- La phase supérieure, translucide, contient les ARNs et généralement peu d'ADN. Elle est récupérée dans un tube DNase RNase Free. Le pipetage doit être précis car cette phase est au dessus d'une pellicule de protéines précipitées.
- Les acides ribonucléiques sont précipités par ajout d'isopropanol froid (1/2 du volume de Trizol[®] initial), incubés à température ambiante puis culottés par centrifugation.
- Le culot est débarrassé des dernières impuretés par ajout d'éthanol à 75% puis il est centrifugé.
- L'éthanol est éliminé et le culot est ensuite séché à l'air de manière à éliminer les résidus d'éthanol. En effet, il nuit à la lecture au spectrophotomètre et interfère dans la réaction de PCR.
- Le culot est remis en suspension dans de l'eau DEPC (eau distillée traitée à 0.1% de diéthylpyrocarbonate puis stérilisée). Le DEPC est une molécule utilisée pour sa capacité à réagir spécifiquement avec les acides aminés, l'histidine et, dans une moindre mesure, la tyrosine des protéines. Cette particularité permet d'utiliser cette molécule pour inactiver certaines protéines, comme les RNases qui détruiraient l'ARN extrait.
- La qualité des ARNs est contrôlée sur gel d'agarose (§ 2.4.2).

2.3. Quantification : Dosage de l'ADN et de l'ARN

Cette étape permet de normaliser les quantités d'acides nucléiques dans les échantillons. Le dosage de l'ADN total et des ARNs extraits des échantillons est réalisé grâce à un spectrophotomètre (Eppendorf BIOphotometre). Une mini cuve en quartz est utilisée. Les échantillons sont dilués au 50^{ème} (ARN) ou au 20^{ème} (ADN) pour un volume final de 100 µL.

L'appareil exécute automatiquement la conversion de la densité optique en concentration selon la relation suivante :

ADN : 1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à 50 µg/mL

ARN : 1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 µg/mL

De plus, le spectrophotomètre affiche le rapport Absorbance 260/280 nm qui est un indicateur de la pureté des produits d'extraction. En effet, les protéines susceptibles de contaminer les échantillons

d'ADN ou d'ARN absorbent à 280 nm. Les résultats sont considérés comme satisfaisants si le rapport est compris entre 1,7 et 2. Dans le cas contraire, le rapport indique une contamination de l'échantillon par des protéines pouvant inhiber la réaction de PCR.

2.4. La Reverse Transcription (RT)

2.4.1. Principe

La RT ou transcription inverse permet de synthétiser, grâce à une polymérase ARN dépendante, le brin complémentaire d'un ARN en présence de désoxyribonucléotides. L'ADNc (ADN complémentaire) ainsi obtenu est destiné à être amplifié par PCR (l'ADNc est plus stable).

2.4.2. Purification, traitement à la DNase et NoRT (no Reverse Transcription)

La DNase est une enzyme hydrolysant des liaisons phosphodiester transformant ainsi les acides désoxyribonucléiques en nucléotides ou polynucléotides. Son action permet de détruire les ADNs qui auraient pu être extraits en même temps que les ARNs. Ce traitement est indispensable avant la réalisation de la reverse transcription car l'amplification des ADNs viendrait s'ajouter à l'amplification des ADNc alors que seuls les ARNs traduisent le niveau d'expression des gènes.

Un dosage avant et après le traitement à la DNase permet d'évaluer les pertes et/ou la qualité de l'extraction.

La destruction des ADNs contaminants par la DNase est vérifiée par une NoRT (no Reverse Transcription)

L'échantillon ne subit pas de reverse transcription, cependant la PCR en temps réel se déroule dans les mêmes conditions que des échantillons ayant subi une RT. En effet, il est possible que le traitement à la DNase ne détruise pas tous les fragments d'ADN présents en fin d'extraction.

Les échantillons sont analysés en duplicata. Afin que ces derniers soient validés, aucun signal ne doit apparaître au cours de la PCR en temps réel. Si des produits se sont formés le T_m (melting Temperature) est vérifié et la taille des amplicons est contrôlée par électrophorèse.

Séparation des produits de PCR sur gel d'électrophorèse :

L'électrophorèse en gel est utilisée pour séparer les macromolécules biologiques en fonction de leur taille et de leur charge électrique. Le gel est constitué d'une matrice de polymère d'agarose baignant dans un tampon conducteur, le TAE (Tris/Acétone/EDTA). Sachant que, dans ce tampon, les acides nucléiques sont chargés négativement, la migration a lieu de la cathode vers l'anode.

L'agarose est utilisé à la concentration de 1% dans le TAE.

Afin de visualiser les molécules d'ADN et d'ARN, le bromure d'éthidium, un agent intercalant des acides nucléiques, est ajouté dans l'agarose à la concentration de 0,5 µg/mL. Il réagit à l'excitation par des ultraviolets (U.V.) et devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée.

2.4.3. Reverse Transcriptase

La reverse transcription s'opère à l'aide de la SuperScript III Reverse Transcriptase (INVITROGEN). C'est une enzyme capable de convertir l'ARN en ADNc. Elle est réalisée à partir de 500 ng d'ARN traité à la DNase extrait à partir de l'hémolymphe.

- Dans un premier temps, des randoms primers (hexamères de nucléotides) et des dNTP (nucléotides libres) sont ajoutés aux échantillons. Le mélange est ensuite chauffé à 65°C puis refroidi sur glace. Ces étapes facilitent la fixation des randoms primers sur les brins d'ARN. Celle-ci est indispensable car la SuperScript III RT ne peut ajouter des nucléotides qu'à la suite d'un brin d'ADN pré-existant. Les primers sont des points de départ pour le travail de l'enzyme.
- Après une brève centrifugation, du tampon, du dithiothreitol (DTT) et une solution RNases Out sont ajoutés. Le tampon permet de fixer le pH du mélange à la valeur optimale de la SuperScript III RT. Le DTT favorise la réaction. La solution RNases Out est un inhibiteur des RNases.
- La SuperScript III RT est ajoutée (200 U) et opère une heure à 50°C.
- L'enzyme est ensuite inactivée thermiquement par un chauffage de 15 minutes à 70°C.
- Les ADNcs obtenus sont dilués au 1/30 pour être utilisés en PCR en temps réel.

2.5. La PCR en temps réel

2.5.1. Principe

Le développement de la PCR quantitative en temps réel a éliminé les variabilités traditionnelles associées à la PCR quantitative et permet la quantification du produit de la PCR de façon fiable et routinière. Au début de la réaction PCR, les réactifs sont en excès mais en concentration assez faible afin d'éviter que la renaturation des amplicons n'entre en compétition avec l'hybridation des amorces (primers). L'amplification est alors réalisée de façon constante à un taux exponentiel à l'aide d'une ADN polymérase thermostable. Après la phase exponentielle, la réaction d'amplification entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable, même au niveau de replica d'un même échantillon, à cause d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. Suit ensuite une phase plateau où le taux d'amplification décroît à près de zéro générant très peu d'amplicons.

Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR. En PCR en temps réel, le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction est réalisé avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus. La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il

devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (template).

Plusieurs technologies de détection existent mais seule la technologie SYBR-Green a été utilisée dans cette expérimentation. Son principe réside dans la capacité à émettre une lumière si et seulement si le SYBR-Green s'intercale entre deux brins d'ADN (Fig. 5). La fluorescence émise est mesurée en fin de phase d'élongation grâce à un capteur au moment où l'ADN se trouve sous sa forme double brin.

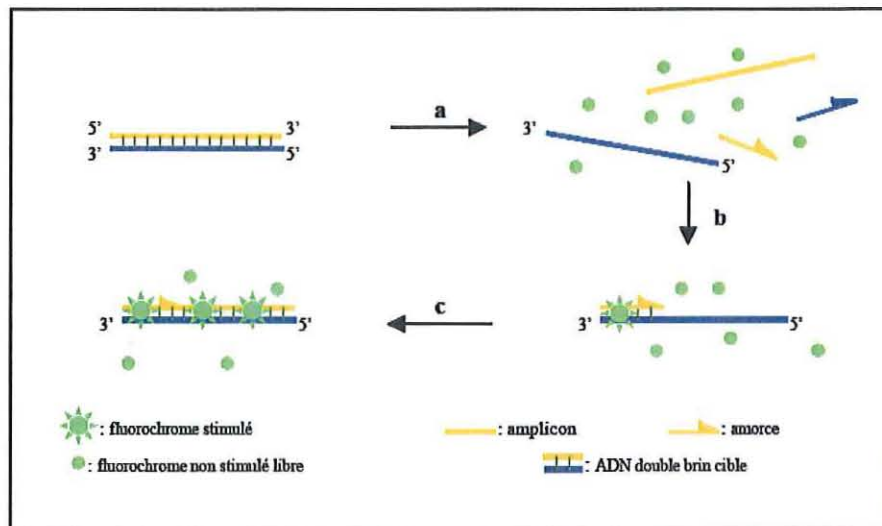


Figure 5 : Agents se liant à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes). (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel (Poitras et Houde, 2002).

Un seuil de fluorescence est établi par le programme de la machine de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil, on obtient un numéro de cycle PCR appelé "Ct" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. Il est important de connaître l'efficacité « E » de la PCR. Pour cela, on effectue une PCR en temps réel sur des échantillons de dilution croissante pour obtenir une courbe étalon correspondant au couple d'amorces utilisé (spécifiques du locus d'intérêt). Le programme de la machine de PCR en temps réel calcule l'efficacité E de la réaction. L'équation de la régression linéaire passant par ces points donne l'efficacité (c'est le coefficient directeur).

La totalité des analyses par PCR en temps réel ont été effectuées sur l'appareil MX 3005P Stratagene®.

2.5.2. Détection et quantification du virus OsHV-1

Un couple d'amorces appelé C9-C10 dessiné d'après la région C du génome du virus OsHV-1 permet l'amplification d'un fragment de 197 pb (Tm 75,5°C). Le couple d'amorce est utilisé à 2 µM.

Les valeurs des Ct mesurés pour les échantillons testés à 5 ng/µL sont comparées à celles d'une gamme étalon allant de 10⁵ à 10 copies de virus par µL et préparée à partir d'une solution de particules virales purifiées. Chaque « run » de PCR en temps réel est accompagné de sa propre gamme afin de garantir la validité des résultats et de permettre leur comparaison entre les différentes plaques.

Pour la PCR en temps réel, la quantité d'ADN utilisé dans chaque réaction (25 µL) doit se situer entre 5 et 50 ng par tube avec une prise d'essai de 5 µL. Le dosage de l'ADN est donc nécessaire sous peine de compromettre l'efficacité de la PCR en temps réel.

2.5.3. Suivi de l'expression des gènes

Les ADNc sont amplifiés lors de la PCR en triplicata. Afin d'évaluer le niveau d'expression des gènes étudiés ou gènes d'intérêt, il est nécessaire de le comparer à l'expression d'un gène de référence dont l'expression est constitutive. En effet, ce gène permet d'estomper les différences de concentration subsistante entre les échantillons même après leur normalisation. Dans le cadre de cette expérimentation, le gène du Facteur d'Elongation, responsable de l'élongation de la chaîne polypeptidique lors de la traduction des protéines chez les eucaryotes, a été choisi comme gène de référence.

L'expression du gène de ménage et l'expression du gène d'intérêt à T0 constituent les calibrateurs de l'expérience (absence de stimulation). En effet, le modèle mathématique suivant permet au logiciel MxPro de calculer l'expression relative en incluant la correction de l'efficacité (Pfaffl *et al*, 2002) :

$$\text{Ratio} = E_{\text{intérêt}}^{\Delta Ct_{\text{intérêt}}(\text{calibreur} - \text{échantillon})} / E_{\text{ref}}^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{calibreur} - \text{échantillon})}$$

Cette méthode met en évidence les variations d'expression des gènes étudiés par rapport à la valeur normale (T0). Un ratio inférieur à 1 indique une répression et inversement.

2.5.4. Validation des résultats

Pour qu'un résultat rendu soit fiable, plusieurs étapes de vérification sont nécessaires :

- Les Non-Template Control (NTC), ou contrôles négatifs, correspondent à des puits où de l'eau est ajoutée à la place de l'échantillon. Cela permet de vérifier que la réaction d'amplification n'a pas lieu automatiquement (dimère de primers).
- La concordance des Ct et des courbes d'amplification (phase exponentielle) au sein des triplicatas d'un même échantillon doit être contrôlée. Les puits dont les résultats sont trop éloignés (la PCR en temps réel étant sensible) sont éliminés.

- La courbe de dissociation (fluorescence en fonction de la température) est aussi vérifiée. L'appareil mesure la fluorescence émise dans chaque puit pour des températures croissantes de 0,5 en 0,5°C. Lorsqu'un produit a été amplifié, un pic de fluorescence apparaît. Celui-ci doit être net, preuve qu'un seul produit a été amplifié, et à la même température pour un couple d'amorces données. Le Tm de chacun des puits est comparé à la valeur de la standardisation. Si ces deux conditions ne sont pas vérifiées pour un puit alors il est éliminé de l'étude.

2.5.5. Choix des gènes

Nous avons retenu pour cette étude cinq gènes d'intérêt :

- **Le Glypican 6** (EU678311) code pour un corecepteur cellulaire de surface de basse affinité impliqué dans un large spectre d'activités biologiques et dans certaines voies de signalisation associées défenses de l'hôte (**Shafti-Keramat et al, 2003**).
- **Le Myeloid differentiation factor 88 ou MyD88** (DQ336108) code pour une protéine faisant office d'adaptateur universel à la base de la cascade de signalisation associée à l'activation des TLRs. Ces récepteurs interviennent au cours des mécanismes de l'immunité innée en reconnaissant des motifs moléculaires conservés à la surface des microorganismes aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF-κB (Nuclear Factor-kappa B).
- **L'Interferon Induced protein 44 ou IFI44** (non accessible sous GenBank) code pour une molécule de fonction inconnue. Cependant chez les primates, elle serait associée aux infections virales de l'hépatite C où la surexpression d'IFI 44 induit, *in vitro*, un état antiprolifératif des cellules infectées (**Hallen et al, 2007**).
- **Le Molluscan Defence Molecule precursor** (EU678312) code pour la protéine Molluscan Defence Molecule (MDM) identifiée chez la limnée, *Lymnaea stagnalis*, un gastéropode d'eau douce. Cette molécule présente des homologues avec l'Hémolin, une protéine décrite chez les insectes appartenant à la super famille des immunoglobulines. L'expression de celle-ci est fortement induite par les composants bactériens mais aussi par les virus (**Hoek et al, 1996**).
- **Le Multicopper Oxidase ou laccase** (EU678320) est impliqué dans le système pro phénol oxydase/phénol.

3. Résultats

3.1. Suivi de la mortalité

Chaque jour, les huîtres du bac dédié au suivi de la mortalité sont inspectées et les individus morts sont comptabilisés et retirés. Les premières huîtres meurent après cinq jours de cohabitation avec les individus expérimentalement infectés (Tab. 1 ; Fig. 6). Après sept jours, 24% des huîtres sont mortes.

Dans le bac Expérimental, la mortalité se manifeste aussi au 5^{ème} jour et au terme de sept jours, il est comptabilisé huit huîtres mortes. Aucune mortalité n'est constatée dans le bac Témoin.

Tableau 1 : Cinétique de mortalité des huîtres suivi sur 50 individus « sains » mis en contact avec 10 animaux expérimentalement infectés.

Temps (J)	Nombre d'huître morte
1	0
2	0
3	0
4	0
5	2
6	6
7	4
Total	12
% mortalité	24

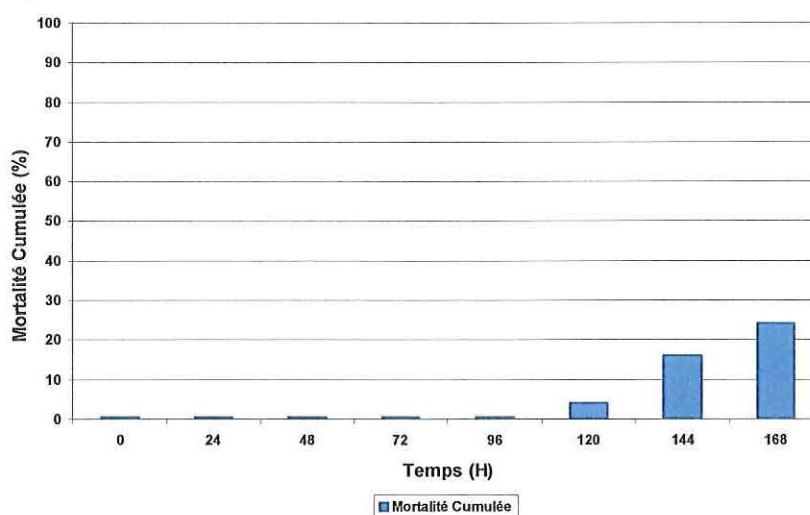


Figure 6 : Cinétique de mortalité des huîtres dans le bac destiné à évaluer la mortalité.

3.2. Quantification de l'ADN viral et suivi dans le temps dans différents compartiments

L'herpès virus OsHV-1 est quantifié grâce à la détection par PCR quantitative en temps réel de son ADN (amorces C9 et C10) dans l'eau des bacs, dans l'hémolymphe des huîtres ainsi que dans leur manteau aux temps définis (Fig. 4).

3.2.1. Dans l'eau des bacs

Dès T0, le virus OsHV-1 est détecté à un très faible niveau dans l'eau du bac Témoin (Tab. 2 ; Fig. 7). La quantité d'ADN viral tend à augmenter et atteint 17 copies du virus par μL d'eau 30 heures après la mise en cohabitation. Puis, à 48 heures, la quantité de virus diminue jusqu'à 8 copies par μL d'eau. Aux temps 1 et 6 heures la présence d'OsHV-1 n'est pas détectée.

Initialement, le virus n'a pas été mis en évidence pour le bac Expérimental. Sa concentration augmente ensuite très rapidement et dépasse 400 copies par μL d'eau seulement 1 heure après ajout des individus infectés expérimentalement par le virus OsHV-1. A 6 heures, la quantité d'ADN viral continue à croître légèrement jusqu'à près de 600 copies par μL . Puis cette dernière diminue ensuite. À 48 h, 1 μL d'eau du bac Expérimental contient environ 350 copies d'ADN viral.

Tableau 2 : Nombre de copies d'OsHV-1 par μL d'Eau au cours du temps. « N.D. : Non Détecté ».

Temps (H)	Bac Exp	Bac Témoin
0	N.D.	1,50E+00
1	4,26E+02	N.D.
3	5,70E+02	1,50E+00
6	5,93E+02	N.D.
24	5,17E+02	2,12E+00
30	4,91E+02	1,70E+01
48	3,45E+02	8,33E+00

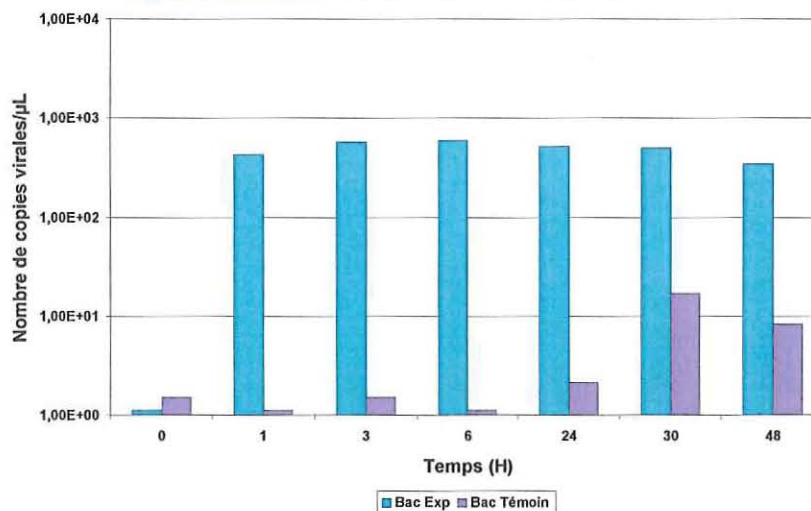


Figure 7 : Cinétique de quantification de l'ADN viral dans l'eau de mer prélevée dans le bac Expérimental et dans le bac Témoin (en nombre de copies d'OsHV-1 par μL d'eau). Pour la lisibilité du graphique, les valeurs N.D. sont représentées à 1.10^0 .

3.2.2. Dans l'hémolymphe

Dans l'hémolymphe des huîtres du bac Témoin, la présence du virus n'est pas vérifiée entre 0 et 1 heure (Tab. 3 ; Fig. 8). Celui-ci est détecté à partir de 3 heures puis sa concentration augmente continuellement jusqu'à environ 70 copies d'OshV-1 par μL d'hémolymphe à 48 heures.

Le virus n'est pas détecté à T0 dans l'hémolymphe des huîtres du bac Expérimental. Après une heure de cohabitation, l'hémolymphe de ces animaux contient plus de 100 copies virales par μL . La concentration en virus reste relativement stable jusqu'à 30 heures. Puis, entre 30 et 48 heures, la charge virale augmente nettement pour dépasser 2500 copies par μL .

Tableau 3 : Nombre de copies d'OshV-1 par μL d'Hémolymphe au cours du temps. « N.D. : Non Détecté »

Temps (H)	Bac Exp	Bac Témoin
0	N.D.	N.D.
1	1,12E+02	N.D.
3	1,68E+02	1,47E+00
6	1,85E+02	3,29E+00
24	1,29E+02	5,72E+00
30	1,44E+02	2,82E+01
48	2,62E+03	6,91E+01

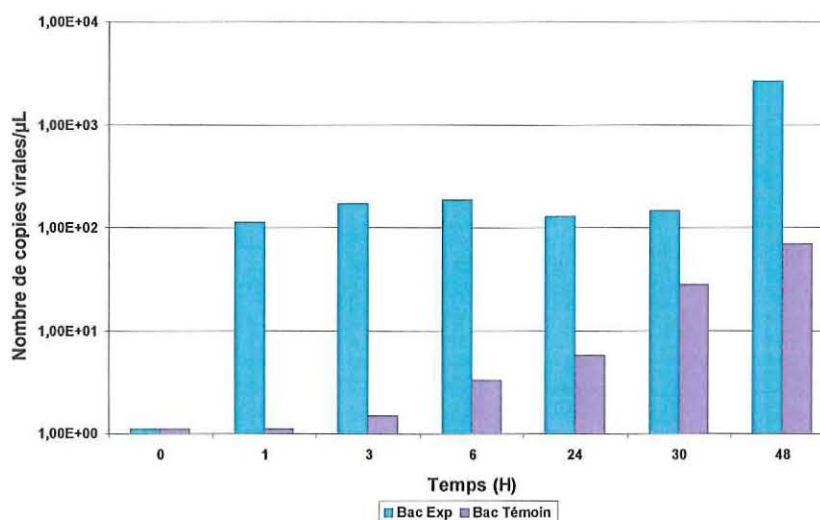


Figure 8 : Cinétique de quantification de la charge virale dans l'hémolymphe des huîtres issues du Bac Expérimental et du Bac Témoin (en nombre de copies d'OshV-1 par μL d'eau). Pour la lisibilité du graphique, les valeurs N.D. sont représentées à 1.10^0 .

3.2.3. Dans le manteau

A T0, le virus OshV-1 n'est détectable dans aucun échantillon de manteau provenant d'huître des deux bacs (Tab. 4 ; Fig. 9). A 1 heure, le virus est observé dans les échantillons du bac Expérimental et sa concentration varie de 3 à 5 copies par ng d'ADN jusqu'à 30 heures. Une forte augmentation est notée dans le bac Expérimental où la charge virale par ng d'ADN passe de 5 à plus de 4000 copies de virus entre 30 et 48 heures.

Parallèlement, dans le bac Témoin, le virus n'est toujours pas détecté à 24 heures. C'est seulement à 48 heures que la PCR en temps réel met en évidence de très faibles quantités d'OshV-1 avec 4 copies détectées par ng d'ADN.

Il est toutefois important de noter que l'échantillonnage des manteaux du bac Témoin n'a eu lieu qu'à 24 et 48 heures.

Tableau 4 : Nombre de copies d'OshV-1 par ng d'ADN du manteau au cours du temps. « N.D. : Non Détecté »

	Temps (H)	Dosage ADN (ng/μL)	Nombre de copies/ ng ADN
	0	218	N.D.
Bac Exp	1	123	4,49E+00
	3	130	3,16E+00
	6	122	3,31E+00
	24	120	3,10E+00
	30	132	5,53E+00
	48	163	4,40E+03
Bac Témoin	24	133	N.D.
	48	157	4,41E+00

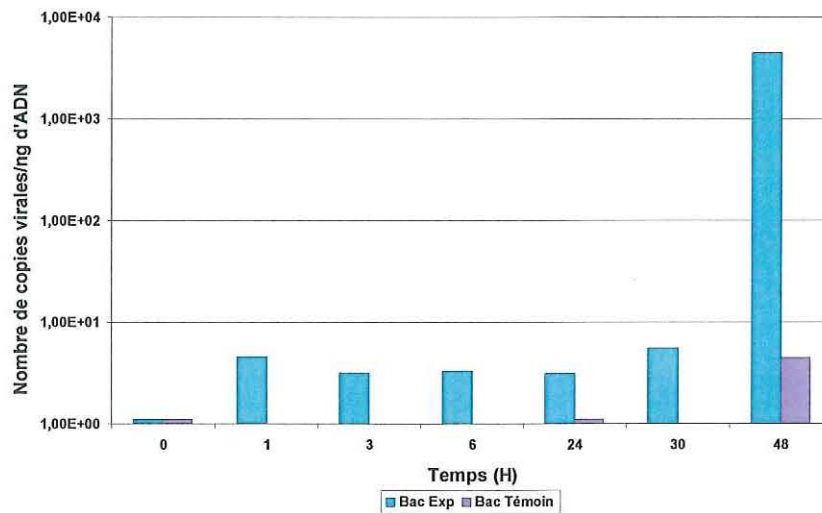


Figure 9 : Cinétique de la charge virale, en nombre de copies d'OshV-1 par ng d'ADN du manteau des huîtres issues du Bac Expérimental et du Bac Témoin. Pour la lisibilité du graphique, les valeurs N.D. sont représentées à 1.10^0 .

3.3. Cinétique de l'expression relative des gènes interprétés comme impliqués dans les défenses immunitaires

3.3.1. Extraction ARN et traitement Dnase des hémolymphes

Le premier dosage révèle des concentrations en ARN disparates, elles sont comprises entre 150 ng/μL et 2330 ng/μL (Tab. 5). Ces différences entre les échantillons peuvent être liées à la quantité de cellules par mL d'hémolymphes ainsi qu'à la qualité de la ponction.

Le traitement à la DNase est réalisé sur 1 μg d'ARN de chaque échantillon pour un volume final de 10 μL. Malgré cette normalisation, la concentration en ARN après le traitement est variable d'un échantillon à l'autre. Les pertes sont évaluées entre 8 et 20% sauf pour quelques échantillons où les concentrations sont anormalement fortes. Cela peut être dû à des niveaux de contamination en ADN différents entre les échantillons, à l'éventuelle imprécision du spectrophotomètre et aussi aux erreurs de pipetage.

Tableau 5 : Concentration en acide nucléique des échantillons d'extraction d'ARN, avant et après traitement à la DNase.

	Temps (H)	Dosage ARN avant traitement (en ng/μL)	Dosage ARN après traitement, dilué au 1/10e (ng/μL)
	0	1673,6	131,7
Bac Exp	1	155,8	82,7
	3	278,5	108,9
	6	257,6	130,0
	24	736,2	80,5
	30	784,9	144,9
	48	152,8	83,4
Bac Témoin	1	842,8	109,9
	3	636,7	82,8
	6	623,4	91,5
	24	2322,8	133,0
	30	342,2	84,3
	48	156,1	92,0

La qualité des échantillons est contrôlée sur gel (Fig. 10). Comme l'illustre la figure 10, les échantillons 1, 7 et 8 présentent simplement une bande peu intense de 1000 à 1500 pb. Cela indique qu'ils sont relativement purs et qu'ils contiennent des ARN en faible concentration. De la même façon, les échantillons 3 et 4 sont purs mais plus concentrés.

Sur le trajet de migration des autres dépôts, il y a des smears. Elles indiquent que ces échantillons d'ARN sont certainement contaminés par de l'ADN. Des bandes sont quand même visibles au même niveau que précédemment, ils contiennent bien de l'ARN.

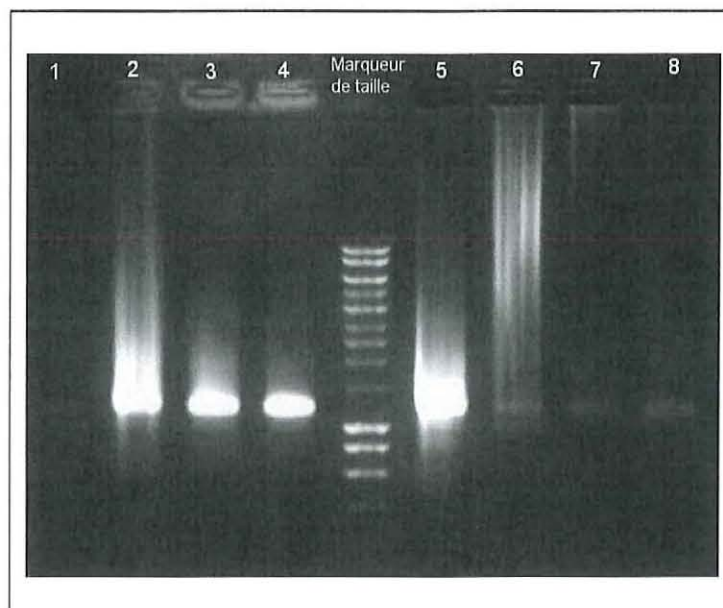


Figure 10 : Gel d'électrophorèse exposé au U.V. ; Dépôts de 2 μ L pour les échantillons et 5 μ L pour le marqueur de taille.

3.3.2. Résultat de la NoRT

Après chaque PCR en temps réel, les différents paramètres de contrôle (NTC ; Concordance ; Courbe de Dissociation ; T_m) sont vérifiés sur le logiciel MxPro. Les produits ne respectant pas ne serait-ce que l'un de ces paramètres sont déposés sur gel d'électrophorèse.

Pour l'ensemble des gènes étudiés et l'ensemble des échantillons, le gel de contrôle ne présente aucune bande (Fig. 11). Durant la NoRT, aucune séquence ADN spécifique n'a été amplifiée excepté pour un échantillon correspondant au temps 3 heures du bac Expérimental mais uniquement sur le gène IFI44. Cet ARN est malgré tout conservé car les no RT sont validés pour les autres gènes.

Le traitement à la DNase est donc correct pour l'ensemble des autres échantillons, la RT et la détermination de l'expression relative sont alors possibles.

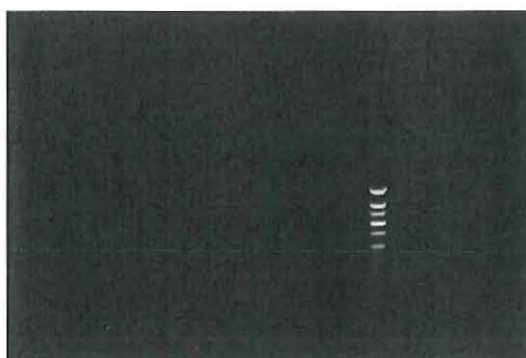


Figure 11 : Gel d'électrophorèse exposé au U.V. ; Dépôts de 2 μ L pour les échantillons d'ARN et 5 μ L pour le marqueur de taille.

3.3.3. Glypican 6

Entre 1 et 3 heures, le gène Glypican 6 est sous exprimé dans les deux bacs (Fig. 12). L'expression relative diminue dès 1 heure pour le bac Témoin et à 3 heures pour le bac Expérimental. La phase de

répression continue pour les animaux du bac Témoin jusqu'à 24 heures alors que l'expression relative déterminée dans le bac Expérimental est 3 fois supérieure à 24 heures qu'à T0 (Fig. 12). À 30 heures, le gène est de nouveau sous exprimé chez les huîtres en contact avec les animaux infectés tandis que l'expression relative atteint 1,5 et se stabilise jusqu'à 48 heures chez les huîtres Témoin (Fig. 12)

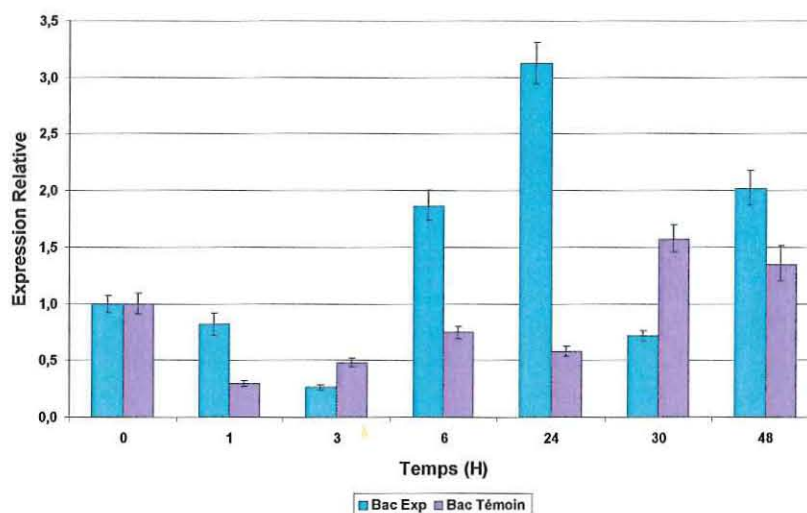


Figure 12 : Cinétique de l'expression relative du gène Glypican 6 dans le bac Expérimental et le bac Témoin. L'analyse est réalisée en triplicata (trois mesures) pour un même échantillon, l'écart type est symbolisé par la barre d'erreur.

3.3.4. Interferon Induced protein 44 : IFI44

Les résultats obtenus indiquent que, pour le bac Témoin, le gène Interferon Induced protein 44 est légèrement surexprimé à 1 heure puis son expression diminue pour finalement être réprimé à 48 heures (Fig. 14). Quant au bac Expérimental, la figure montre que l'expression relative reste normale jusqu'à 30 heures et à 48 heures elle est 4 fois plus forte qu'initialement.

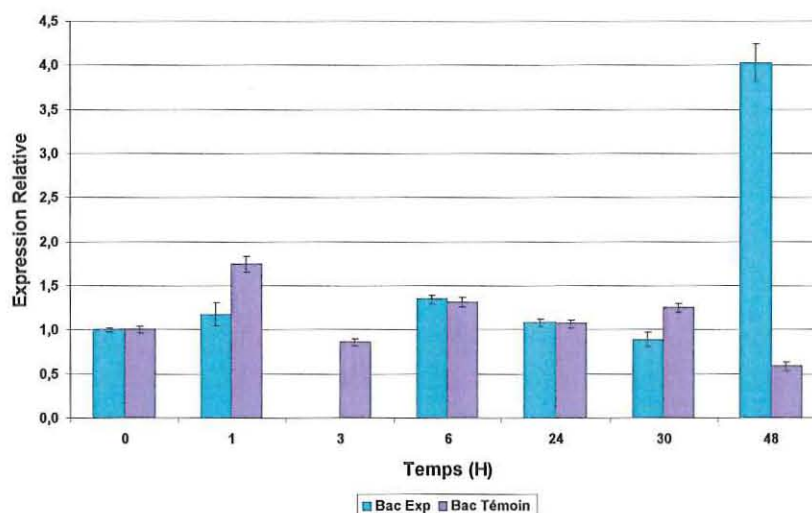


Figure 14 : Cinétique de l'expression relative du gène Interferon Induced protein 44 dans le bac Expérimental et le bac Témoin. L'analyse est réalisée en triplicata (trois mesures) pour un même échantillon, l'écart type est symbolisé par la barre d'erreur.

Nota bene : l'échantillon du bac Expérimental au temps 3 heures a été supprimé de l'analyse (§ 3.3.2)

3.3.5. Myeloid differentiation factor 88 : MyD88

L'expression relative calculée dans les deux bacs est sous exprimé après 1 heure de cohabitation et perdure jusqu'à 30 heures. À 48 heures, le niveau d'expression du gène MyD88 est 2 fois plus forte qu'à T0 pour les individus du bac Expérimental et au moins 25 fois plus forte pour le bac Témoin (Fig. 13 et 13 bis).

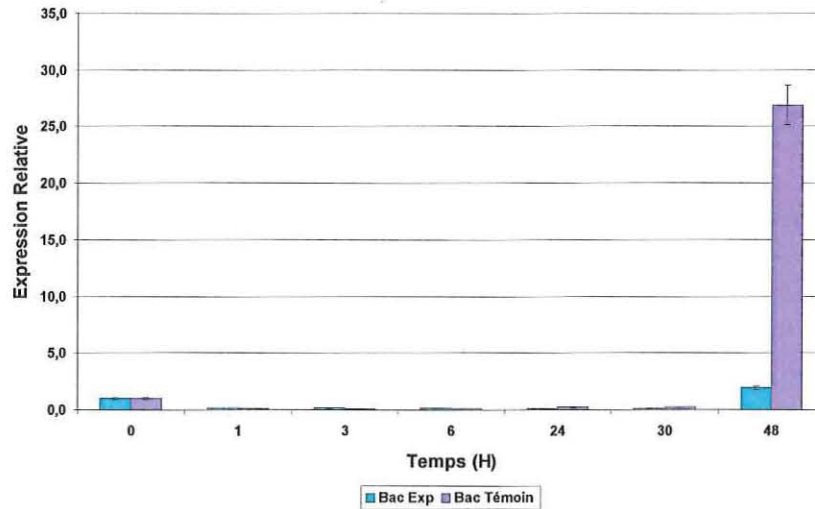


Figure 13 : Cinétique de l'expression relative du gène Myeloid differentiation factor 88 dans le bac Expérimental et le bac Témoin. L'analyse est réalisée en triplicata (trois mesures) pour un même échantillon, l'écart type est symbolisé par la barre d'erreur.

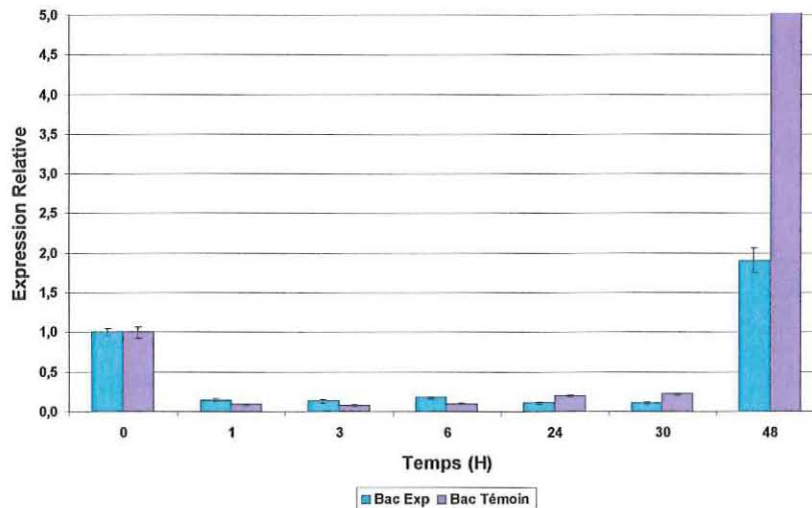


Figure 13 bis: Cinétique de l'expression relative du gène Myeloid differentiation factor 88 dans le bac Expérimental et le bac Témoin (échelle différente). L'analyse est réalisée en triplicata (trois mesures) pour un même échantillon, l'écart type est symbolisé par la barre d'erreur.

3.3.6. Molluscan Defence Molecule precursor

De 0 à 6 heures, l'expression relative du gène Molluscan Defence Molecule precursor est semblable pour les animaux stimulés ou non par le virus (Fig. 15). Elle augmente progressivement pour atteindre 1,5 après 6 heures. Au temps 24 heures, l'expression relative pour le bac Témoin diffère significativement de celle du bac Expérimental et atteint un maximum de 3,0 à 30 heures contre 1.6 pour le bac Expérimental. Cependant, elle diminue jusqu'à 2,5 à 48 heures (Fig. 15). La quantité relative de transcrits pour les échantillons du bac augmente également mais plus tardivement atteint 2 fois la valeur normale à 48 heures.

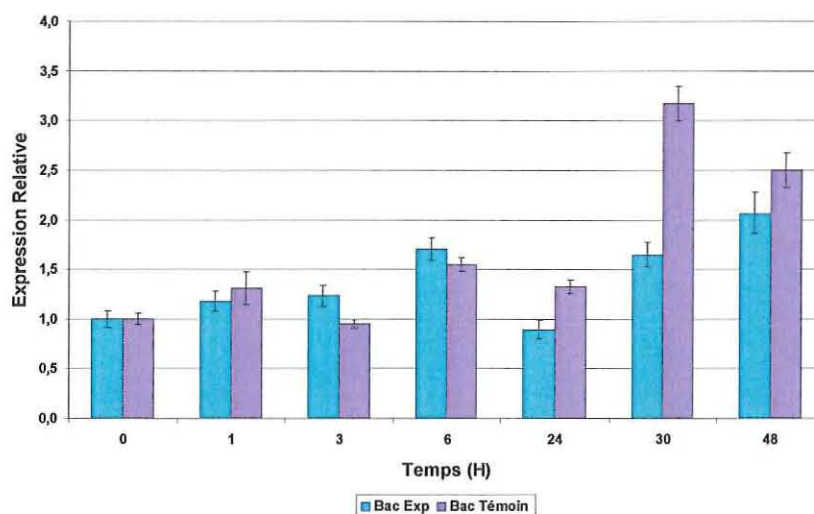


Figure 15 : Cinétique de l'expression relative du gène Molluscan Defence Molecule Precursor dans le bac Expérimental et le bac Témoin. L'analyse est réalisée en triplicata (trois mesures) pour un même échantillon, l'écart type est symbolisé par la barre d'erreur.

3.3.7. Multicopper Oxidase (Laccase)

Après avoir respectivement déposé les huîtres mortes et les huîtres ouvertes dans le bac Expérimental et le bac Témoin, le niveau d'expression relative du gène Multicopper Oxidase est diminué. Entre 3 et 6 heures, après avoir légèrement augmenté, l'expression relative dans l'hémolymphe pour les animaux des deux bacs est sous exprimé (Fig. 16). Alors que la quantité relative d'ADNc correspondant au gène Multicopper Oxidase des animaux du bac Expérimental ne varie pas, celle du bac Témoin dépasse le niveau de référence à 24 heures et augmente de 50% à 30 et 48 heures. C'est seulement à 48 heures que le gène d'intérêt s'exprime davantage dans le bac Expérimental pour sensiblement égaler le niveau d'expression de ce gène dans le bac Témoin (Fig. 16).

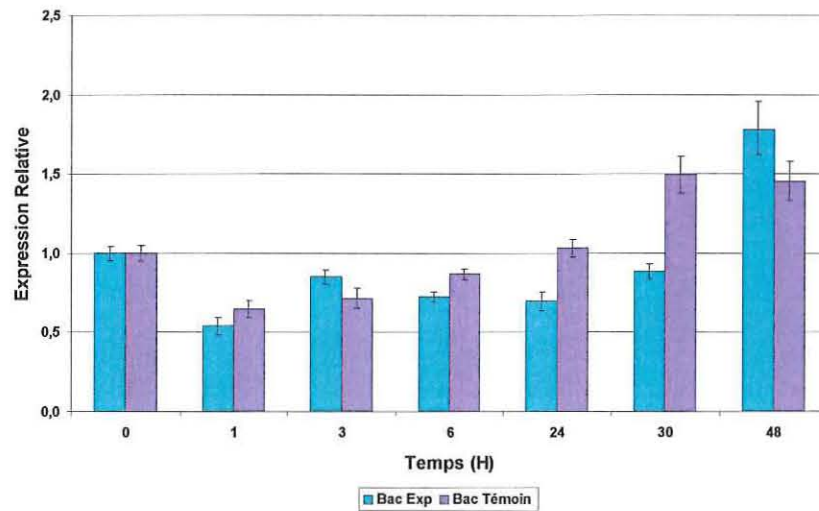


Figure 16 : Cinétique de l'expression relative du gène Multicopper Oxidase dans le bac Expérimental et le bac Témoin. L'analyse est réalisée en triplicata (trois mesures) pour un même échantillon, l'écart type est symbolisé par la barre d'erreur.

4. Discussion

4.1. Mortalités

Alors qu'aucune mortalité n'est constatée dans le bac Témoin, la mortalité dans le bac Expérimental apparaît au bout du 5^{ème} jour. Le pourcentage de mortalité est de 24 % dans le bac dédié au suivi de la mortalité. Ces résultats confirment des essais faits préalablement et qui ont permis de démontrer la transmission du virus OsHV-1 par contact entre animaux infectés et animaux « sains » avec l'observation de mortalité suite à l'infection expérimentale.

4.2. Détection d'ADN viral dans l'eau de mer

Les animaux moribonds et morts expérimentalement infectés (injectés) semblent libérer rapidement des particules virales dans l'eau du bac Expérimental. De plus, la quantité d'ADN viral détectée dans les échantillons d'eau reste stable durant toute l'expérimentation.

Dans le bac Témoin, il est possible également de détecter de l'ADN viral dans les échantillons d'eau au cours de l'expérience avec cependant de plus faibles niveaux. Cette observation peut laisser suspecter d'une part une contamination initiale de l'eau utilisée dans le cadre de l'expérience et d'autre part la présence du virus chez les animaux considérés comme « sains ». Cette seconde hypothèse apparaît comme la plus probable en prenant en considération l'augmentation progressive des quantités d'ADN viral tant dans l'eau que dans les animaux (hémolymphe et manteau) au cours de l'expérience dans ce bac. Il semble que les animaux ont pu exprimer une infection virale faisant suite à des conditions stressantes liées à l'expérimentation. Certains animaux considérés comme « sains » étaient à l'origine porteurs du virus (6%). Bien que la charge virale détectée par PCR quantitative soit très faible, il est possible que le virus ait rencontré des conditions favorables à sa multiplication (22°C). La réactivation du virus chez des animaux porteurs a été observée à plusieurs reprises lors de précédentes expérimentations. Cet aspect souligne le rôle majeur que peut jouer une population porteuse du virus dans les processus de dissémination de celui-ci dans le milieu.

Les quantités d'ADN viral détectées dans le bac Témoin restent cependant inférieures (30 fois moins) à celles rapportées dans l'eau du bac Expérimental. Dans le bac Témoin, aucune mortalité n'ayant été détectée, il est possible d'imaginer que mêmes si certains animaux sont en cours d'infection, les quantités de virus libérées dans l'eau restent limitées (maximum de 17 copies par μL d'eau). Dans ces conditions, les animaux moribonds et morts suite à l'infection virale apparaissent comme les sources majeures de libération du virus OsHV-1 dans l'eau.

Pour le bac Expérimental, la quantité maximale d'ADN viral détectée est d'environ 600 copies d'ADN par μL , soit 600 millions de copies par litre d'eau de mer (avec 20 huîtres moribondes ou mortes dans 40 litres d'eau). Il apparaît que cette quantité permet une contamination effective des huîtres se traduisant par une détection du virus dans les animaux et des mortalités. Cependant, des travaux complémentaires sont nécessaires afin de définir la quantité minimale d'ADN viral présente dans l'eau pour induire une infection. Les quantités totales de virus (tous virus confondus) ont été estimées comme variant de 2,6 à 300 milliards par litre dans les eaux estuariennes de surface (**Wait & Sobsey,**

2001) et de 1 à 30 milliards par litre dans les claires ostréicoles (**Montanié et al, 2002**). Dans ce contexte, **Vigneron et al, (2004)** ont montré que l'ADN du virus OsHV-1 devait représenter plus de 3 à 12,5 % de l'ensemble des ADN viraux présents dans l'eau pour être détectable dans un échantillon de terrain. La recherche d'ADN viral et surtout la quantification du virus désormais possible grâce à la PCR quantitative apparaît donc comme applicable à l'environnement et pourrait être utilisée pour définir un risque en terme de dissémination de l'infection virale.

4.3. Détection d'ADN viral dans les animaux

La détection de l'ADN viral dans l'hémolymphe des animaux « sains » est observée très rapidement (1 heure) après la mise en contact avec les animaux expérimentalement infectés et cela à des niveaux assez élevés (100 à 200 copies par μL). Entre 30 et 48 heures, la charge virale augmente nettement pour dépasser 2500 copies par μL . Pour le bac Expérimental, la détection du virus dans le manteau chez les animaux « sains » est possible dès 1 heure après contact avec les huîtres expérimentalement infectées mais présente de très faibles niveaux jusqu'à la 30^{ème} heure. La charge virale par ng d'ADN passe de 5 à plus de 4000 copies entre 30 et 48 heures.

Ces résultats suggèrent que l'hémolymphe pourrait jouer un rôle important dans la distribution des particules virales dans les tissus et les organes, tout particulièrement le manteau. Même si des particules virales ont pu rarement être observées dans les hémocytes, il semblerait que ce type cellulaire ne soit pas un site préférentiel de réplication virale. Par ailleurs, des condensations de la chromatine dans les noyaux d'hémocytes d'huîtres ont été observées en microscopie électronique à transmission (**Renault et al, 2000**). Ces changements sont caractéristiques des cellules apoptotiques. Ces observations semblent confirmer que les hémocytes ne sont pas un site privilégié de réplication virale. En effet, le phénomène d'apoptose ou de mort cellulaire programmée, pourrait empêcher les hémocytes de servir de sites de production de particules virales. Par contre, la réplication virale a pu être observée dans les cellules de type fibroblastique, présentes dans tous les tissus conjonctifs, et tout particulièrement dans le manteau. Ce tissu apparaît comme un tissu cible (**Lipart et Renault, 2001**). Les résultats obtenus dans la présente étude apparaissent en adéquation avec ces observations. Le virus OsHV-1 après une pénétration rapide dans l'animal serait véhiculé et distribué dans l'ensemble des tissus et organes par le biais de l'hémolymphe. Il atteindrait de cette manière le manteau (présence de nombreux sinus hémolymphatiques). La forte détection à 48 heures dans le manteau correspondrait au développement du virus dans un de ses tissus cibles. Cette réplication active se traduirait par une libération massive de particules virales avec pour conséquence, une augmentation de la quantité d'ADN dans l'hémolymphe. Les faibles quantités d'ADN viral détectées avant 48 heures semblent confirmer ce scénario de processus infectieux. Le manteau ne serait pas un lieu d'entrée direct du virus. L'hémolymphe pourrait jouer le rôle de transporteur, le virus pouvant être libre dans l'hémolymphe, fixé à la surface des hémocytes ou bien à l'intérieur des cellules elles-mêmes.

Le bac Témoin voit une augmentation progressive de la charge virale tant dans l'hémolymphe que dans le manteau à 48 heures mais à des niveaux de détection beaucoup plus faible que dans le bac Expérimental. Dans son ensemble, le phénomène est moins prononcé que dans le bac Expérimental où l'apport de virus est important. Dans le bac Expérimental, la multiplication possible du virus lié au portage initial peut être masquée par l'apport externe de virus (animaux moribonds ou morts expérimentalement infectés).

4.4. Expression de gènes interprétés comme impliqués dans l'immunité

La présence de particules virales dans l'hémolymphe dès les premières heures suggère que le système immunitaire est rapidement stimulé. Le processus infectieux est cependant moins avancé dans le bac Témoin que dans le bac Expérimental.

La base de la protéine du glypican 6 est attachée à la surface des cellules via le glycoposphatidylinositol. Le glypican 6 appartenant à la famille des heparan sulfate proteoglycan (HSPG) intervient dans la modulation des voies signalétiques (**O'Connell et al, 2007**). Les HSPG sont utilisés par de nombreux virus enveloppés ou non comme fixation primaire (corécepteurs) permettant l'ancrage de virus (**Shafti-Keramat et al, 2003**).

Le glypican 6 pourrait être un corécepteur permettant l'entrée d'OsHV-1 dans les cellules. Ce gène est l'un des plus précocement surexprimé dans le bac Expérimental au cours de cette étude (dès 6 heures) et de manière significative par rapport au bac Témoin. Dans de précédentes études, l'implication du gène du Glypican 6 n'avait pu être démontré. Il semble que le mode d'infection (par cohabitation) pourrait être plus approprié à révéler l'implication de ce gène dans le processus infectieux. La surexpression observée pourrait être liée à un turn-over supérieur de la molécule chez les huîtres infectées par le virus avec une internalisation et une dégradation accrue.

Le caractère inductible de l'expression du MyD88 a été mis en évidence au stade larvaire et naissain de *Crassostrea gigas* après stimulation par des bactéries, l'augmentation de transcrit intervient également à 48 heures (**Tirapé Bajana, 2007**). De plus Tirapé Bajana (2007) dans la même étude démontre chez le naissain de *C. gigas* que l'augmentation de l'expression de ce gène est précédée par une diminution significative des transcrits. L'ensemble de ces observations se vérifie également ici comme dans des études précédentes. La surexpression est tardive. Cette observation en relation avec les informations concernant la détection de l'ADN viral dans l'hémolymphe semble indiquer que la surexpression du gène MyD88 ne survient que lorsque des quantités importantes de virus sont présentes chez l'huître (après réplication active). Cela ne semble pas un traceur précoce de l'infection.

Le gène IFI44 de *Crassostrea gigas* découvert récemment par le laboratoire a été peu étudié. Dernièrement, il a été identifié chez *Saccostrea glomerata* (Sydney rock oyster) soumise à une infection naturelle par un parasite protozoaire *Marteilia sydneyi* (**Green et al, 2009**). Cependant son rôle dans les hépatites C (HCV) a été avancé et l'activité antiproliférative de la protéine sur des

cellules infectées par le virus HCV *in vitro* démontrée (**Hallen et al, 2007**). L'expression de ce gène a déjà été observée dans des études précédemment menées au laboratoire et notamment après 48 heures de stimulation par le virus. Comme le gène MyD88, il s'exprime lorsque l'infection est installée.

Le gène codant pour la Molluscan Defence Molecule (MDM) fait partie de la famille des immunoglobulines. Cette molécule partage une homologie significative avec l'hémolin des insectes jouant un rôle crucial dans les réactions de défense (**Hoek et al, 1996**). C'est le gène de l'immunité le plus fortement induit chez les lépidoptères. L'hémolin est induit par les bactéries et par les virus. Des travaux ont montré que les baculovirus induisent une surexpression de ce gène chez les insectes.

L'hémolin agirait comme une molécule opsonisante et être un médiateur entre les microorganismes et les hémocytes en favorisant la phagocytose. Il interviendrait aussi dans la cascade prophenoloxidase lors de réponses anti-virales. L'hémolin, sous sa forme transmembranaire, pourrait être utilisé comme point d'entrée du virus dans les cellules hôtes. Chez certaines espèces, il serait exprimé sous forme soluble et pourrait se fixer aux microorganismes avant qu'ils ne pénètrent dans une cellule hôte (**Terenius, 2007**). Dans notre étude, ce gène s'exprime de manière relativement progressive jusqu'à 48 heures pour atteindre une expression relative de l'ordre de 2 dans le bac Témoin.

La laccase n'a pas encore été décrite chez d'autres bivalves que *Crassostrea gigas*. Il est rapporté chez les insectes, les nématodes et les mollusques. Les laccases sont des enzymes oxydo-réductrices contenant du cuivre capable de catalyser l'oxydation d'un électron pour un large éventail de substrats polyphénol et aromatique (**Claus, 2004**). Les phénoloxidasés ont un rôle important dans les défenses immunitaires des invertébrés. Récemment, un lien entre l'hémolin et le système prophenoloxidase a été démontré (**Terenius, 2007**) suggérant que la MDM pourrait être chez l'huître creuse une protéine de reconnaissance capable de se fixer au virus OsHV-1. Les résultats obtenus laisse imaginer que l'induction du gène de la laccase pourrait être impliquée dans les phénomènes de protection contre les infections à OsHV-1.

5. Conclusion

La description de la transmission de la maladie a pu être abordée soit par coinfection par des animaux morts infectés soit par réplication du virus au sein d'animaux initialement porteur du virus. Les animaux porteurs constituent des réservoirs de virus et ils peuvent largement contribuer aux phénomènes de mortalité rencontrés en milieu ouvert.

Ces résultats s'avèrent intéressants pour l'étude du rôle du système immunitaire inné de *C. gigas* dans la réponse à l'OsHV-1. Pour la première fois, l'expression des gènes est décrite dans le cadre d'une transmission horizontale de l'infection virale. L'infection nécessitant près de 2 jours pour s'installer, il apparaît intéressant de poursuivre cette étude en se focalisant sur des temps d'infection plus long(30 heures et 48 heures voir au-delà).

Enfin, la recherche de nouveaux gènes impliqués dans la défense immunitaire doit être poursuivie. S'appuyant sur ces travaux et ceux à venir, il est possible d'imaginer la sélection d'animaux présentant de meilleures résistances aux agents infectieux tels que OsHV-1 (**Sauvage, 2008**). Cet objectif est en cours d'exploration au laboratoire afin de tenter d'apporter des solutions aux mortalités estivales massive que rencontre l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Bibliographie

- Bachère E., Gueguen Y., Gonzalez M., de Lorgeril J., Garnier J., Romestand B. (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates : the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 198 : 149-168.
- Cheng T.C. (1981) *Bivalves*. Academic Press, London.
- Chomczynski P. et Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162 : 156-159.
- Claus H. (2004) Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35 : 93-96.
- Davidson A.J., Trus B.L., Cheng N., Steven A.C., Watson M.S., Cunningham C., Le Deuff R.M., Renault T. (2005) A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* 86 : 41-53.
- Gay M. (2004) Infection expérimentale chez *Crassostrea gigas* : étude de deux souches pathogènes apparentées à *Vibrio splendidus*. Thèse de doctorat. Université de la Rochelle. 214 p.
- Green T.J., Dixon T.J., Devic E., Adlard R.D., Barnes A.C. (2009) Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol.* 26 : 799-810.
- Gueguen Y., Cadoret J.P., Flament D., Barreau-Roumiguière C, Girardot A.L., Garnier J., Hoareau A., Bachère E., Escoubas J.M. (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene.* 303 : 139-145.
- Hallen L.C., Burki Y., Ebeling M., Broger C., Siegrist F., Oroszlan-Szovik K., Bohrmann B., Certa U., Foser S. (2007) Antiproliferative activity of the human IFN-alpha-inducible protein IFI44. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 27 : 675-680.
- Hedgecock D., Gaffney P., Goulettquer P., Gou X., Reece K. and Warr G. (2005) The case for sequencing the pacific oyster genome. *Journal of Shellfish Research.* 24 : 429-441
- Hoek R.M., Smit A.B., Frings H., Vink J.M., de Jong-Brink M., Geraerts W.P. (1996) A new Ig-superfamily member, molluscan defence molecule (MDM) from *Lymnaea stagnalis*, is down-regulated during parasitosis. *Eur. J. Immunol.* 26 : 939-944.
- Lipart C., Renault T. (2002) Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *Journal of Virological Methods.* 101 : 1-10

Montanié H., Hartmann H.J., Crottereau C., Trichet C. (2002) Virus-like particle analysis in a seston-rich coastal pond using transmission electron microscopy. *Aquat. Microb. Ecol.* 28 : 105-115.

O'Connell M.P., Billings P.C., Fiori J.L., Deirmengian G., Roach H.I., Shore E.M., Kaplan F.S. (2007) HSPG Modulation of BMP Signaling in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva Cells. *Journal of Cellular Biochemistry.* 102 : 1493–1503

Pepin J.F., Riou A., Renault T. (2008) Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods.* 149 : 269–276

Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research.* 30 No. 9.

Poitras E. et Houde A. (2002) La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology.* 2 No. 2 : 2-11.

Renault T., Le Deuff R.M., Cochennec N. et Maffart P. (1994) Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France – Comparative study. *Revue Méd. Vét.* 145 10 : 735-742.

Renault T., Le Deuff R.M., Chollet B., Cochennec N., Gérard A. (2000) Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis Aquat Organ.* 42 : 173-83.

Saavedra C. et Bachère E. (2006) Bivalve genomics. *Aquaculture.* 256 : 1-14.

Samain J.F., Boudry P., Dégremont L., Soletchnik P., Ropert M., Bédier E. *et al.* (2004a) Summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, over view of 3-year results of the cooperative "MOREST" Project. *Journal of Shellfish Research.* 23 : 309-310.

Samain J.F., Boudry P., Dégremont L., Soletchnik P., Ropert M., Bédier E. *et al.* (2004b) The programme MOREST Summer mortality of *Crassostrea gigas* oyster Plouzane (France). *Actes de colloques. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer.* p 23-30.

Samain J.F., Dégremont L., Soletchnik P., Haure J., Bédier E., Ropert M., *et al.* Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Sous presse.*

Sauvage C. (2008) Développement de marqueurs moléculaires liés à la résistance à la mortalité estivale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* – Approche QTL, Thèse Université La Rochelle, 272 p.

Shafti-Keramat S., Handisurya A., Kriehuber E., Meneguzzi G., Slupetzky K. et Kirnbauer R. (2003) Different Heparan Sulfate Proteoglycans Serve as Cellular Receptors for Human Papillomaviruses. *Journal Of Virology*. 13125–13135

Soletchnik P., Lambert C., et Costil K. (2005) Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to rearing environment conditions. *J Shellfish Res.* 24 : 197-207.

Terenius O. (2007) Hemolin—A lepidopteran anti-viral defense factor? *Developmental and Comparative Immunology*. 32 : 311–316

Tirapé Bajaña A. (2007) Contribution à l'étude de l'ontogenèse du système immunitaire chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse Université Montpellier II.

Vignerot V., Sollic G., Montanié H., Renault T. (2004) Detection of Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) DNA in seawater by PCR: influence of water parameters in bioassays. *Dis Aquat Organ.* 62 : 35-44.

Wait D.A., Sobsey M.D. (2001) Comparative survival of enteric viruses and bacteria in Atlantic Ocean seawater. *Water Sci. Technol.* 43 : 139-42.

Центральный банк

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России

Сбербанк России